

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 861**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00 (2006.01)

C12P 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2012 PCT/EP2012/071096**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13064411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2012 E 12778111 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2773751**

54 Título: **Citocromo p450 y su uso para la oxidación enzimática de terpenos**

30 Prioridad:

01.11.2011 EP 11187409

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

20.07.2017

73 Titular/es:

**FIRMENICH SA (100.0%)
1, route des Jeunes, P.O. Box 239
1211 Geneva 8, CH**

72 Inventor/es:

**SCHALK, MICHEL y
DEGUERRY, FABIENNE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 625 861 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

Citocromo p450 y su uso para la oxidación enzimática de terpenos

Campo de la Invención

5 La presente invención proporciona las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de un citocromo P450 capaz de oxidar moléculas de terpeno. También proporciona un procedimiento de oxidación de moléculas de terpeno que comprende poner en contacto el citocromo P450 de la invención con la molécula del terpeno que se pretende oxidar. En particular, dicho procedimiento puede realizarse in vitro o in vivo para producir moléculas de terpeno oxidadas, que pueden utilizarse en campos técnicos diferentes tales como por ejemplo la perfumería y la industria de los aromatizantes. La presente invención también proporciona un vector de expresión que contiene el
10 ácido nucleico. También es un objeto de la invención un organismo hospedador no humano o una célula transformada con el ácido nucleico.

Antecedentes de la invención

15 Los terpenos se encuentran en la mayoría de los organismos (microorganismos, animales y plantas). Estos compuestos están compuestos de cinco unidades de carbono llamadas unidades de isopreno y se clasifican por el número de estas unidades presente en su estructura. De este modo, los monoterpenos, los sesquiterpenos y los diterpenos, son terpenos que contienen 10, 15 y 20 átomos de carbono respectivamente. Los diterpenos, por ejemplo, se encuentran ampliamente en el reino vegetal y se han descrito más de 2500 estructuras de diterpeno (Connolly y Hill, *Dictionary of terpenoids*, 1991, Chapman & Hall, London). Las moléculas de terpeno y sus derivados oxidados han sido de interés durante miles de años debido a sus propiedades de fragancia y sabor y a sus efectos
20 cosméticos, medicinales y antimicrobianos. Los extractos vegetales obtenidos por diferentes medios tales como la destilación en fase vapor o la extracción con disolventes se utilizan como una fuente de derivados oxidados de moléculas de terpeno. Como alternativa, las moléculas de terpeno que se encuentran en los extractos vegetales u obtenidas por procedimientos biosintéticos se oxidan utilizando procedimientos químicos y enzimáticos.

25 La oxidación enzimática de los terpenos involucra frecuentemente las enzimas llamadas citocromos P450 (P450), que normalmente son capaces de catalizar la transformación de un sustrato hidrófobo, tal como una molécula de terpeno, en uno más hidrófilo. Las enzimas del Citocromo P450 forman una superfamilia de hemoproteínas que se encuentran en las bacterias, las arqueas y los eucariotas. En una de las actividades más comunes, el citocromo P450 actúa como una monooxigenasa, por la inserción de un átomo de oxígeno del oxígeno molecular en una molécula del sustrato, mientras que el otro átomo de oxígeno se reduce a agua.

30 Esta reacción catalítica requiere dos electrones para la activación del oxígeno molecular. Los P450 de los eucariotas utilizan el NADPH como reductor externo y fuente de electrones. Los dos electrones se transfieren uno a la vez al sitio activo del citocromo P450 y esta transferencia requiere una proteína donadora de electrones, una citocromo P450 reductasa (CPR). Una CPR no es específica para un citocromo P450. Una CPR es la proteína donadora de electrones para varios P450 en un organismo dado. Además, una CPR de un organismo puede actuar como la
35 proteína donadora de electrones para los P450 de otros organismos. En algunos casos los P450 también pueden acoplarse a una proteína del citocromo b5 que puede actuar como la proteína donadora de electrones o puede mejorar la eficiencia de la transferencia de electrones desde la CPR al P450. En las células eucarióticas y particularmente en las plantas, los P450 y las CPR son generalmente proteínas unidas a la membrana y están asociadas al retículo endoplasmático. Estas proteínas se fijan a la membrana por una hélice transmembrana N-terminal.

40 Muchos P450 tienen una especificidad baja de sustrato y por tanto son capaces de catalizar la oxidación de muchas estructuras diversas tales como por ejemplo diferentes moléculas de terpeno. La mayoría de estas enzimas tienen una regio y estereoselectividad particular con un sustrato dado pero con frecuencia producen una mezcla de diversos productos de un sustrato particular. Dichos P450 están implicados por lo general en el desdoblamiento y la
45 destoxicación de las moléculas tales como los xenobióticos y generalmente se encuentran en las bacterias y los animales. Por otra parte, los P450 implicados en las rutas biosintéticas muestran por lo general una especificidad hacia ciertos tipos de sustratos y regio y estereoselectividad. Este es el caso para la mayoría de los P450 de plantas.

50 Puede encontrarse un gran número de P450 en la naturaleza y en particular en las plantas. Un genoma de una planta puede contener varios cientos de genes que codifican los P450. Muchos P450 de las plantas se han caracterizado pero considerando el número extremadamente grande de P450 presente en las plantas, la mayoría de sus funciones permanecen desconocidas.

Por tanto, es deseable buscar nuevos P450 capaces de catalizar nuevas reacciones enzimáticas, para proporcionar una producción enzimática de nuevos compuestos oxigenados o para producir compuestos oxigenados a través de diferentes tipos de reacciones, por ejemplo de diferentes sustratos, que pueden ser más fácilmente accesibles.

55 Ya se han caracterizado varios P450. En particular, se han notificado citocromos P450 que tienen un cierto porcentaje de identidad de secuencia con el citocromo P450 de la presente invención que utilizan moléculas de terpeno como sustratos.

Los P450 más cercanos a los de la presente invención son los P450 del sorgo bicolor, entre los cuales la secuencia más cercana comparte el 67 % de identidad con las secuencias de aminoácidos que se describen en el presente documento (Número de Referencia EER94164).

5 Entre los terpenos oxigenados producidos por el citocromo P450 de la presente invención, algunos son muy útiles en el campo de la perfumería y de los aromatizantes. En particular el kusimol, que es producido por la hidroxilación del zizaeno, es uno de los componentes claves del aceite de vetiver y por sí mismo es un ingrediente perfumante valioso. La oxidación del zizaeno utilizando el citocromo P450 de la presente invención proporciona una alternativa ventajosa al aislamiento del kusinol del aceite de vetiver, que es un procedimiento difícil y costoso. Hasta donde se
10 tiene conocimiento, no se conoce ningún procedimiento enzimático para la producción de kusimol. Varios otros ingredientes perfumantes y aromatizantes, para los que no se conoce ninguna síntesis enzimática hasta la fecha, pueden prepararse utilizando el citocromo P450 de la presente invención como se describirá a continuación.

Otros terpenos oxigenados producidos por el citocromo P450 de la presente invención son útiles para otros fines tales como fármacos o productos agroquímicos. El citocromo P450 de la presente invención, por tanto, abre una nueva vía biosintética para diversas moléculas que tienen propiedades interesantes útiles en varios campos de la
15 industria y que son difíciles o incluso imposibles de aislar de la naturaleza y difíciles o imposibles de producir por síntesis orgánica.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar procedimientos para fabricar terpenos oxigenados, en particular kusimol, de una manera económica. En consecuencia, la presente invención tiene el objetivo de producir terpenos oxidados que al mismo tiempo tengan pocos desechos, un procedimiento más eficiente en cuanto a recursos y
20 energía que al mismo tiempo reduzca la dependencia de los combustibles fósiles. Es un objetivo adicional proporcionar enzimas capaces de oxidar moléculas de terpeno, siendo útiles dichos productos oxidados como ingredientes de perfumería y/o aromáticos.

Abreviaturas utilizadas

25	pb	pares de bases
	DMAPP	difosfato de dimetilalilo
	ADN	ácido desoxirribonucleico
	ADNc	ADN complementario
	CPR	citocromo P450-reductasa
	dNTP	desoxi nucleótido trifosfato
30	DTT	ditiotreitól
	EDTA	ácido etilendiamintetraacético
	FAD	dinucleótido de flavina adenosina
	FMN	mononucleótido de flavina
	FPP	pirofosfato de farnesilo
35	CG	cromatografía de gases
	IPP	difosfato de isopentenilo
	IPTG	isopropil-D-tiogalacto-piranósido
	LB	caldo para lisogenia
	EM	espectrómetro de masa
40	mvaK1	mevalonato cinasa
	MvaK2	mevalonato difosfato cinasa
	NADP	fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina
	NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina, forma reducida
	P450	citocromo P450
45	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	3'-/5'-RACE	amplificación rápida 3' y 5' de extremos del ADNc
	RMCE	intercambio del casete mediado por recombinasa
	RT-PCR	transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa
	ARN	ácido ribonucleico
50	ARNm	ácido ribonucleico mensajero
	RBS	sitio de unión al ribosoma.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para oxidar enzimáticamente terpenos de una manera económica, confiable y reproducible.

55 Como se pretende en la presente solicitud, todos los compuestos citados en la presente solicitud se definen por medio de su fórmula como se representa en la figura 1.

Un "citocromo P450" o un "polipéptido que tiene una actividad de citocromo P450" se pretende para el fin de la presente solicitud como un polipéptido capaz de catalizar la oxidación de una molécula de terpeno para formar un

compuesto oxigenado tal como un alcohol, un aldehído, una cetona o un ácido carboxílico. De acuerdo con una realización preferida, el citocromo P450 actúa como una mono-oxigenasa por la adición solamente de un átomo de oxígeno a un compuesto de terpeno. La capacidad de un polipéptido para catalizar la oxidación de un terpeno particular puede confirmarse simplemente mediante la realización del ensayo enzimático como se detalla en el Ejemplo 8.

De acuerdo con la presente invención, los "polipéptidos" también pretenden incluir polipéptidos truncados a condición de que los mismos mantengan su actividad citocromo P450 como se define en cualquiera de las realizaciones de la invención y que compartan al menos el porcentaje de identidad definido con el fragmento correspondiente de la SEQ. ID NO: 1 o 2.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias peptídicas o nucleotídicas es una función del número de restos de aminoácidos o de ácidos nucleicos que son idénticos en las dos secuencias cuando se ha generado una alineación de estas dos secuencias. Los restos idénticos se definen como restos que son iguales en las dos secuencias en una posición dada de la alineación. El porcentaje de identidad de secuencia, como se utiliza en el presente documento, se calcula a partir de la alineación óptica tomando el número de restos idénticos entre dos secuencias dividiéndolo entre el número total de restos en la secuencia más corta y multiplicando por 100. La alineación óptima es la alineación en la que el porcentaje de identidad es el más elevado posible. Pueden introducirse huecos en una o ambas secuencias en una o más posiciones de la alineación para obtener la alineación óptima. Estos huecos entonces se tienen en cuenta como restos no idénticos para el cálculo del porcentaje de identidad de secuencia.

La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos puede conseguirse de varias maneras utilizando programas de ordenador y, por ejemplo, programas de ordenador disponibles públicamente en Internet. Preferentemente, puede utilizarse el programa BLAST (Tatiana y col., *FEMS Microbiol Lett.*, 1999, 174:247-250, 1999) ajustado a los parámetros por defecto, disponible del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/b12seq/wblast2.cgi>, para obtener una alineación óptima de las secuencias peptídicas o nucleotídicas y para calcular el porcentaje de identidad de secuencia.

Un objeto de la presente invención es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85 % a la SEQ. ID NO: 1 o 2 y que tiene una actividad de citocromo P450, caracterizado porque el polipéptido capaz de catalizar la oxidación de al menos un compuesto de terpeno seleccionado entre monoterpenos y sesquiterpenos mono o policíclicos.

En una realización preferida, dicho sesquiterpeno o monoterpeno comprende al menos un grupo de metilo como sustituyente sobre un resto cíclico. De acuerdo con una realización más preferida, el citocromo P450 de la invención oxida dicho sustituyente de metilo para proporcionar un alcohol primario.

De acuerdo con una realización preferida, el compuesto de terpeno se selecciona entre el grupo que consiste en zizaeno, alfa-cedreno, alfa-longipineno, alfa-funebreno, tujopseno, valenceno, beta-chamigreno, aloaromadendreno, alfa-neocloveneno, isosativeno, ledeno, s-limoneno, alfa-humuleno, alfa-gurjuneno, alfa-pineno, beta-funebreno, R-limoneno y beta-pineno. Más preferentemente, dicho compuesto de terpeno se selecciona entre zizaeno, alfa-cedreno, alfa-funebreno, valenceno y tujopseno. Mucho más preferentemente, dicho compuesto de terpeno es zizaeno.

En una realización preferida, un átomo de oxígeno se añade al grupo metilo para proporcionar un alcohol primario, un aldehído y/o un ácido carboxílico. En una realización mucho más preferida, el zizaeno se oxida al kusimol, zizanal y/o ácido zizanoico.

En el caso en el que se forma un aldehído y/o un ácido carboxílico, dicho aldehído y/o un ácido carboxílico se forma por oxidación adicional del alcohol primario ya sea por el P450 de la invención por una o más enzimas de otras familias tales como por ejemplo las alcohol deshidrogenasas, las aldehído reductasas, las aldehído oxidasas. Estas últimas enzimas están presentes por ejemplo en cualquier organismo hospedador o célula en los que se pueda expresar el polipéptido de la invención.

De acuerdo con una realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 89%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95% e incluso más preferentemente al menos el 98% idéntica a la SEQ. ID NO: 1 o 2. De acuerdo con una realización más preferida, el polipéptido comprende la SEQ. ID NO: 1 y 2. Incluso más preferentemente comprende la SEQ. ID NO: 1 y 2.

En una realización preferida de la invención la secuencia también comprende una secuencia de fijación a la membrana. La secuencia representada por la SEQ. ID NO: 1 o 2, o el derivado de la misma que tenga el porcentaje requerido de identidad, es la parte del polipéptido que proporciona la actividad de P450. La secuencia de fijación a la membrana no está implicada en la actividad catalítica de la enzima. La secuencia de fijación permite la unión a la membrana. Las secuencias de fijación adecuadas dependen del organismo en el que el polipéptido se expresa y las secuencias diseñadas para tipos conocidos de organismos hospedadores son conocidas para los expertos en la materia. Cualquier secuencia de fijación adecuada puede utilizarse en combinación con el polipéptido de la presente invención. Por tanto, de acuerdo con una realización preferida, el polipéptido comprende la SEQ. ID NO: 1 o 2,

combinada con una secuencia de fijación a la membrana.

Más preferentemente, el polipéptido de la invención consiste en la SEQ. ID NO: 1 o 2, opcionalmente combinada con una secuencia de fijación a la membrana.

5 Cuando el polipéptido no se combina con una secuencia de fijación, dicho polipéptido no se unirá a la membrana de la célula. En este caso, el polipéptido de la SEQ. ID NO: 1 o 2 puede modificarse preferentemente con el fin de mejorar su solubilidad en el citoplasma.

10 De acuerdo con otra realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es una variante de la SEQ. ID NO: 1 o 2 obtenida por ingeniería genética. En otros términos, dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que se ha obtenido mediante la modificación de la SEQ. ID NO: 3, 4 o el complemento de las mismas. De acuerdo con una realización más preferida, el polipéptido que tiene una actividad de citocromo P450 consiste en una secuencia de aminoácidos que es una variante de la SEQ. ID NO: 1 o 2 obtenida por ingeniería genética, es decir una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que se ha obtenido por la modificación de una cualquiera de las SEQ. ID NO: 3, 4 o el complemento de las mismas.

15 Los polipéptidos codificados por un ácido nucleico obtenido por mutación natural o artificial de un ácido nucleico de la invención, como se describe a continuación, también están abarcadas por la invención.

20 Las variantes del polipéptido que son resultado de una fusión de las secuencias de péptidos adicionales en los extremos amino y carboxilo terminales también están abarcadas por los polipéptidos de la invención. En particular, una fusión de este tipo puede mejorar la expresión de los polipéptidos, puede ser útil en la purificación de la proteína, puede mejorar la manera en la que el polipéptido puede fijarse a una membrana o puede mejorar la actividad enzimática del polipéptido en un entorno o sistema de expresión deseado. Dichas secuencias peptídicas adicionales pueden ser un péptido señal, por ejemplo. En consecuencia, la presente invención abarca las variantes de los polipéptidos de la invención, tales como las obtenidas por la fusión con otros oligo o polipéptidos y/o las que se unen a péptidos señal. Los polipéptidos que son resultado de una fusión con otra proteína funcional, tal como una proteína de la vía de la biosíntesis del terpeno, preferentemente una terpeno sintasa, también están abarcados por los polipéptidos de la invención. Un ejemplo preferido en particular del polipéptido de la invención es una variante que es resultado de la fusión con una secuencia peptídica que es un polipéptido de fusión que comprende tanto un polipéptido de la invención (que tiene una actividad de citocromo P450) como un CPR.

De acuerdo con otra realización, el polipéptido se aísla de *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash.

30 También es un objeto de la presente invención un ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

35 De acuerdo con una realización preferida, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos al menos el 70 %, preferentemente al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, preferentemente al menos el 90 %, preferentemente al menos el 93 %, más preferentemente al menos el 95 % e incluso más preferentemente al menos el 98 %, idéntica a la SEQ. ID NO: 3, 4 o al complemento de las mismas. De acuerdo con una realización más preferida, el ácido nucleico comprende la SEQ. ID NO: 3, 4 o el complemento de las mismas. De acuerdo con una realización incluso más preferida, el ácido nucleico consiste en la SEQ. ID NO: 3, 4 o el complemento de las mismas, opcionalmente junto con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de fijación a la membrana.

40 De acuerdo con otra realización, el ácido nucleico se aísla de *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash.

45 El ácido nucleico de la invención puede definirse como que incluye polímeros de desoxirribonucleótido o de ribonucleótido en la forma ya sea de una sola cadena o de doble cadena (ADN y/o ARN). También se ha de entender que la expresión "secuencia de nucleótidos" comprende una molécula de polinucleótido o una molécula de oligonucleótido en la forma de un fragmento separado o como un componente de un ácido nucleico más grande. Los ácidos nucleicos de la invención también abarcan ciertas secuencias de nucleótidos aisladas incluyendo las que están substancialmente libres del material endógeno contaminante. El ácido nucleico de la invención puede estar truncado, a condición de que el mismo codifique un polipéptido abarcado por la presente invención, como se ha descrito anteriormente.

50 De acuerdo con una realización más preferida, al menos un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores comprende una secuencia de nucleótidos que se ha obtenido modificando la SEQ. ID NO: 3, 4 o el complemento de las mismas. Preferentemente, el ácido nucleico consiste en una secuencia de nucleótidos que se ha obtenido modificando la SEQ. ID NO: 3, 4 o el complemento de las mismas.

55 Los ácidos nucleicos que comprenden una secuencia obtenida por la mutación de la SEQ. ID NO: 3, 4 o el complemento de las mismas, están abarcados por la invención, a condición de que las secuencias que ellos comprenden compartan al menos el porcentaje definido de identidad con los fragmentos correspondientes de la SEQ. ID NO: 3, 4 o el complemento de las mismas y a condición de que los mismos codifiquen un polipéptido que

tenga una actividad de citocromo P450, como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores. Las mutaciones pueden ser cualquier clase de mutaciones de estos ácidos nucleicos, tales como mutaciones puntuales, mutaciones de delección, mutaciones de inserción y/o mutaciones del marco de lectura. Puede prepararse una variante de ácido nucleico para adaptar su secuencia de nucleótidos a un sistema de expresión específico. Por ejemplo, se sabe que los sistemas de expresión bacterianos expresan más eficientemente los polipéptidos si los aminoácidos son codificados por un codón preferido. Debido a la degeneración del código genético, en el que más de un codón puede codificar el mismo aminoácido, las secuencias de ADN múltiples pueden codificar el mismo polipéptido, estando abarcada la totalidad de estas secuencias de aminoácidos por la invención.

La presente invención también proporciona un procedimiento para oxidar al menos un compuesto de terpeno que comprende

- a) poner en contacto dicho compuesto de terpeno con al menos un polipéptido de la invención en presencia de una citocromo P450 reductasa (CPR);
- b) opcionalmente, aislar el terpeno oxidado producido en la etapa a).

El compuesto de terpeno oxidado por el polipéptido de la invención y el propio polipéptido de la invención son como se han definido en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

El procedimiento puede realizarse in vitro así como in vivo, como será explicado detalladamente más adelante.

Cuando el procedimiento se realiza in vitro, el polipéptido de la invención que se va a poner en contacto con el compuesto de terpeno y el CPR puede obtenerse por extracción a partir de cualquier organismo que lo exprese, utilizando tecnologías convencionales de extracción de proteínas o enzimas. Si el organismo hospedador es un organismo unicelular o célula que libera el polipéptido de la invención en el medio de cultivo, por ejemplo cuando ninguna fijación a la membrana está presente, el polipéptido simplemente puede recolectarse del medio de cultivo, por ejemplo por centrifugación, seguida opcionalmente de las etapas de lavado y la resuspensión en soluciones tampón adecuadas. Si el organismo o célula acumula el polipéptido dentro de sus células, el polipéptido puede obtenerse por ruptura o lisis de las células y la extracción adicional del polipéptido del lisado celular. Cuando los P450 y las CPR comprenden una secuencia de fijación a la membrana, tales como los P450 y las CPR naturales en las plantas, los mismos se asocian a las membranas y por tanto están localizados en la fracción de la membrana de los lisados celulares. La fracción de la membrana (microsomos) puede separarse fácilmente de las otras fracciones de la proteína por centrifugaciones diferenciales del lisado celular en bruto utilizando los procedimientos conocidos.

Para el procedimiento in vitro, el polipéptido de la invención y la CPR pueden proporcionarse independientemente en forma aislada o como parte de un extracto de proteína y se suspende en una solución tampón a un pH óptimo. Si es adecuado, pueden añadirse sales, DTT, NADPH, NADH, FAD, FMN, y otras clases de cofactores enzimáticos, para optimizar la actividad de la enzima. Las condiciones apropiadas se describen en más detalle en los Ejemplos más adelante.

El compuesto de terpeno se añade después a la suspensión o solución, que después se incuba a la temperatura óptima, por ejemplo entre 15 y 40 °C, preferentemente a entre 25 y 35 °C, más preferentemente a 30 °C. Después de la incubación, el terpeno oxidado producido puede ser aislado de la solución incubada por procedimientos de aislamiento convencionales, tales como la extracción con disolventes y destilación, opcionalmente después de la retirada de los polipéptido de la solución.

La CPR debe estar presente mientras que el P450 y el compuesto de terpeno están en contacto.

De acuerdo con otra realización preferida, el procedimiento para oxidar los compuestos de terpeno se realiza in vivo. En este caso, la etapa a) del procedimiento descrito anteriormente comprende cultivar un organismo hospedador no humano o célula transformada para expresar al menos un polipéptido de la invención en presencia de un compuesto de terpeno que se va a oxidar en condiciones conductoras para la oxidación del compuesto de terpeno, expresando dicho organismo o célula adicionalmente una CPR.

El compuesto de terpeno y el polipéptido son como se definen en cualquier realización de la presente invención.

En una realización de dicho procedimiento, el compuesto de terpeno que se va a oxidar es producido por el organismo o la célula hospedadores que expresan el polipéptido de la invención. En este caso, el compuesto de terpeno es producido en el organismo o la célula hospedadores por una terpeno sintasa capaz de catalizar la formación del compuesto de terpeno a partir de un precursor de terpeno acíclico. La terpeno sintasa puede ser producida ya sea naturalmente por el organismo o la célula hospedadores, o cuando el organismo o la célula hospedadores no expresan la terpeno sintasa naturalmente, el mismo puede ser transformado para hacerlo.

En una realización alternativa, en el caso en el que se utiliza una célula hospedadora o cuando el organismo hospedador es un microorganismo, el compuesto de terpeno que se va a oxidar puede añadirse al medio de cultivo de la célula o microorganismo. El compuesto de terpeno penetrará a través de la membrana de la célula o microorganismo, estando disponible de este modo para la reacción con el polipéptido de la invención expresado por el microorganismo o célula hospedadora.

De acuerdo con una realización más preferida, el procedimiento comprende adicionalmente, antes de la etapa a), transformar un organismo o una célula no humanos con al menos un ácido nucleico de la invención, de manera que el organismo o célula exprese al menos un polipéptido de la invención. El polipéptido y el ácido nucleico son como se han definido en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

- 5 Realizar el procedimiento in vivo es en particular ventajoso puesto que es posible realizar el procedimiento sin aislar previamente el polipéptido. La reacción se produce directamente dentro del organismo o célula transformada para expresar el polipéptido.

Para la actividad catalítica, los P450 deben utilizarse en combinación con una P450-reductasa (CPR) que es capaz de transferir electrones desde la NADPH (Fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina, forma reducida) al sitio activo del P450, para reconstituir la actividad de P450. La CPR debe estar presente para realizar el procedimiento tanto in vitro como in vivo. Cuando el procedimiento se realiza in vivo, la CPR puede estar presente ya sea naturalmente en el organismo o la célula hospedadores, o dicho organismo o célula pueden transformarse para expresar una CPR antes, simultáneamente o después de la transformación para expresar el polipéptido de la invención. En una realización preferida de la invención, el organismo o la célula hospedadores se transforman con un polipéptido de fusión que comprende tanto el polipéptido de la invención como la CPR.

En otra realización preferida, la CPR es una CPR vegetal. Más preferentemente la misma deriva de una CPR de *Arabidopsis thaliana*.

El organismo o la célula no humanos puede transformarse ventajosamente de manera adicional con al menos un gen que codifica un polipéptido implicado en el metabolismo de producción de los precursores de terpeno acrílico tales como el pirofosfato de geranilo, el pirofosfato de farnesilo o el pirofosfato de geranilogeranilo. Dichos polipéptidos incluyen por ejemplo las enzimas de la vía de MEP, de la vía de MVA y/o de las prenilos transferasas.

La transformación de un organismo o una célula no humanos con un polipéptido que tiene una actividad de citocromo P450 y con una CPR, o con un polipéptido de fusión que comprende los dos, en presencia de un compuesto de terpeno que se va a oxidar, como se ha descrito en cualquiera de las realizaciones de la invención, es suficiente para que la oxidación del terpeno se realice. Sin embargo, la transformación adicional con al menos una enzima implicada en la producción de un precursor de terpeno acíclico y/o del difosfato de isopentenilo (IPP) o difosfato de dimetilalilo (DMAPP), tiene la ventaja de incrementar la cantidad de compuesto de terpeno disponible para que se oxide.

El organismo o célula tiene por objeto "expresar" un polipéptido, a condición de que el organismo o célula se transforme para alojar un ácido nucleico que codifica el polipéptido, este ácido nucleico se transcribe en ARNm y el polipéptido se encuentra en el organismo o célula hospedadores. El término "expresa" abarca "expresa heterológamente" y "sobrexprea", éste último que hace referencia a los niveles de ARNm, a la actividad del polipéptido y/o la enzima por encima y por debajo de lo que se mide en un organismo o célula no transformada. Una descripción más detallada de procedimientos adecuados para transformar un organismo o una célula hospedadores no humanos se describe a continuación en la parte de la especificación dedicada a dichas células u organismos hospedadores no humanos transformados como los objetos específicos de la presente invención y en los Ejemplos.

Los procedimientos para transformar los organismos, por ejemplo microorganismos, de modo que los mismos expresen una terpeno sintasa son conocidos en la técnica. Dichos procedimientos pueden encontrarse por ejemplo en el documento WO 2010/134004, que describe la transformación de diversas células y organismos hospedadores con una zizaeno sintasa, es decir una enzima capaz de catalizar la producción de zizaeno a partir del pirofosfato de farnesilo.

Para realizar la invención in vivo, el organismo o la célula hospedadores se cultivan en condiciones que conducen a la producción del terpeno oxidado. Dichas condiciones son cualesquiera condiciones que conduzcan al crecimiento del organismo o la célula hospedadores. Preferentemente, dichas condiciones están diseñadas para el crecimiento óptimo del organismo o la célula hospedadores. En consecuencia, si el elemento hospedador es una planta transgénica, se proveen las condiciones del crecimiento óptimas, tales como las condiciones de la luz, del agua y de los nutrientes, óptimas, por ejemplo. Si el elemento hospedador es un organismo unicelular, las condiciones que conducen a la producción del terpeno oxidado pueden comprender la adición de los cofactores adecuados al medio de cultivo del elemento hospedador. Además, puede seleccionarse un medio de cultivo, para maximizar la oxidación del terpeno. Las condiciones óptimas del cultivo son conocidas por el experto en la materia y no son específicas para la presente invención. Los ejemplos de las condiciones adecuadas se describen de una manera más detallada en los siguientes Ejemplos.

Los organismos hospedadores no humanos para realizar el procedimiento de la invención in vivo pueden ser cualesquiera organismos unicelulares o multicelulares no humanos. En una realización preferida, el organismo hospedador no humano utilizado para realizar la invención in vivo es una planta, un procarionta o un hongo. Se puede utilizar cualquier planta, procarionta u hongo. Las plantas particularmente útiles son aquellas que producen naturalmente cantidades elevadas de terpenos. En una realización más preferida, la planta se selecciona entre la familia *Solanaceae*, *Poaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Asteraceae* o *Lamiaceae*. Por ejemplo, la

planta se selecciona entre los géneros *Nicotiana*, *Solanum*, *Sorghum*, *Arabidopsis*, *Brassica* (colza), *Medicago* (alfalfa), *Gossypium* (algodón), *Artemisia*, *Salvia* y *Mentha*. Preferentemente, la planta pertenece a las especies de *Nicotiana tabacum*.

5 En una realización más preferida, el organismo hospedador no humano utilizado para realizar el procedimiento de la invención in vivo es un microorganismo. Puede utilizarse Cualquier microorganismo pero de acuerdo con una realización incluso más preferida, el microorganismo es una bacteria o un hongo. Preferentemente, el hongo es la levadura. Más preferentemente, la bacteria es *E. coli* y la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

10 Varios de estos organismos no producen el terpeno que se va a oxidar de manera natural. Para que sean adecuados para realizar el procedimiento de la invención, estos organismos tienen que ser transformados para producir el terpeno. Los mismos pueden ser transformados de este modo ya sea antes, simultáneamente o después de la transformación con el ácido nucleico descrito de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, como se ha explicado anteriormente.

15 También pueden utilizarse células eucarióticas superiores aisladas, en lugar de organismos completos, como elementos hospedadores para realizar el procedimiento de la invención in vivo. Las células eucarióticas adecuadas pueden ser cualquier célula no humana, pero preferentemente son células vegetales.

Una herramienta importante para transformar los organismos o las células hospedadores para realizar el procedimiento de la invención in vivo es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con cualquier realización de la invención. Por tanto, un vector de este tipo también es un objeto de la presente invención, en la que el vector está en forma de vectores virales, bacteriófagos y plásmidos.

20 Un "vector de expresión" como se utiliza en el presente documento incluye vectores virales, bacteriófagos y plásmidos. El experto es capaz de seleccionar un vector adecuado de acuerdo con el sistema de expresión. En una realización, el vector de expresión incluye el ácido nucleico de la invención enlazado operativamente al menos a una secuencia reguladora, la cual controla la transcripción, la traducción, el inicio y la terminación, tal como un promotor, operador o potenciador transcripcional, o un sitio de unión ribosómico al ARNm y, opcionalmente, incluyendo al menos un marcador de selección. Las secuencias de nucleótidos están "enlazadas operativamente" cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con el ácido nucleico de la invención.

30 Los vectores de expresión de la presente invención pueden utilizarse en los procedimientos para preparar un organismo y/o una célula hospedadores transformados genéticamente, en organismos o células hospedadores que alojan los ácidos nucleicos de la invención y en los procedimientos para producir o fabricar los polipéptidos de la invención, como se desvela adicionalmente a continuación. Una planta o una célula vegetal que comprenden un vector de expresión son también un objeto de la presente invención. Los organismos y las células hospedadores no humanos recombinantes que comprenden al menos un ácido nucleico de acuerdo con cualquier realización de la presente invención también son herramientas muy útiles para realizar el procedimiento de la invención. Dichos organismos y células hospedadores no humanos son, por tanto, otro objeto de la presente invención. En una realización preferida, dicho organismo o célula hospedadores expresan o sobre-expresan heterológamente un polipéptido de acuerdo con cualquier realización de la presente invención.

35 De acuerdo con una realización preferida, el organismo o la célula hospedadores no humanos expresan adicionalmente una P450-reductasa (CPR), como se ha descrito anteriormente. La CPR puede estar presente ya sea naturalmente en el organismo o la célula hospedadores o dicho organismo o célula puede transformarse para expresar una CPR antes, simultáneamente o después de la transformación para expresar el polipéptido de la invención. En una realización preferida de la invención, el organismo o la célula hospedadores se transforman para expresar un polipéptido de fusión que comprende tanto el polipéptido de la invención como la CPR.

40 En otra realización preferida, el organismo o célula es capaz de producir el terpeno que se va a oxidar. Este es el caso cuando el organismo o célula expresa una terpeno sintasa capaz de catalizar la transformación del terpeno. En el caso en el que el organismo o la célula hospedadores no expresen dicha terpeno sintasa de manera natural, ésta puede transformarse antes, simultáneamente o después de la transformación con el polipéptido que tiene una actividad de P450.

45 El organismo o la célula no humanos pueden transformarse ventajosamente de manera adicional con al menos un gen que codifica un polipéptido implicado en el metabolismo de producción del precursor de terpeno acíclico tal como el pirofosfato de geranilo, el pirofosfato de farnesilo o el pirofosfato de geranilogeranilo. Dichos polipéptidos incluyen por ejemplo las enzimas de la vía de MEP, de la vía de MVA y/o las prenilo transferasas. La transformación de un organismo o una célula no humanos capaz de producir un compuesto de terpeno con un polipéptido de la invención y con una CPR, o con un polipéptido de fusión que comprende ambos, como se describe en cualquiera de las realizaciones de la invención, es suficiente para que la oxidación del terpeno se realice. Sin embargo, la transformación adicional con al menos una enzima implicada en la producción de un precursor de terpeno acíclico y/o del difosfato de isopentenilo (IPP) o el difosfato de dimetilalilo (DMAPP), tiene la ventaja de incrementar la cantidad del terpeno disponible para que se oxide.

Los tipos de organismos o células hospedadores no humanos de la invención son un procarionta, un hongo o un microorganismo como se describen en el procedimiento para oxidar un compuesto del terpeno.

El término "transformado" se refiere al hecho de que el elemento hospedador se sometió a ingeniería genérica para comprender una, dos o más copias de cada uno de los ácidos nucleicos requeridos en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. Preferentemente, el término "transformado" se refiere a hospedadores que expresan heterológicamente los polipéptidos codificados por el ácido nucleico con el que se transforman, así como la sobre-expresión de los polipéptidos. En consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona un organismo transformado, en el cual los polipéptidos se expresan en una cantidad más elevada que en el mismo organismo no transformado de este modo.

Existen diversos procedimientos conocidos en la técnica para la creación de células u organismos hospedadores transgénicos tales como plantas, hongos, procariontas o cultivos de las células eucarióticas superiores. Los vectores de clonación y de expresión apropiados para su uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura, de plantas y de mamíferos, se describen por ejemplo, en Pouwels y col., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, Elsevier, INueva York y Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Los vectores de clonación y expresión para las plantas y/o las células vegetales superiores están disponibles en particular para el experto. Véase por ejemplo Schardl y col. *Gene* 61:1-11, 1987.

Los procedimientos para la transformación de células u organismos hospedadores para alojar ácidos nucleicos transgénicos son familiares para el experto. Para la creación de plantas transgénicas, por ejemplo, los procedimientos habituales incluyen: la electroporación de los protoplastos de plantas, la transformación mediada por liposomas, la transformación mediada por agrobacterium, la transformación mediada por polietilenglicol, el bombardeo por partículas, la microinyección de células vegetales y la transformación utilizando virus.

En una realización, el ADN transformado se integra en un cromosoma del organismo y/o la célula hospedadores no humanos de modo que dé como resultado un sistema recombinante estable. Cualquier procedimiento de integración cromosómica conocido en el arte puede utilizarse en la práctica de la invención, incluyendo pero sin limitación el intercambio de casetes mediado por recombinasa (RMCE), la inserción cromosómica específica para el sitio viral, la inyección de adenovirus y pronuclear.

Una "variante polipeptídica" como se denomina en el presente documento, significa un polipéptido capaz de catalizar la oxidación de un compuesto de terpeno de la Fórmula (I) y que tiene un porcentaje suficiente de identidad de secuencia de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores. Dichos polipéptidos variantes son codificados por las secuencias nucleotídicas que han padecido una o más deleciones, inserciones o sustituciones.

Las variantes pueden comprender las secuencias sustituidas conservadoramente, significando que un resto de aminoácido dado es reemplazado por un resto que tiene características fisicoquímicas semejantes. Los ejemplos de las sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un resto alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu, o Ala por otro, o sustituciones de un resto polar por otro, tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Véase Zubay, *Biochemistry*, Addison-Wesley Pub. Co., (1983). Los efectos de dichas sustituciones pueden calcularse utilizando las matrices de evaluación de la sustitución tales como PAM-120, PAM-200, y PAM-250 como se analizó en Altschul, (*J. Mol. Biol.* 219:555-65, 1991). Otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo las sustituciones de regiones completas que tienen características de hidrofobia semejantes, son bien conocidas. Los polipéptidos de la invención también pueden ser sometidos a sustituciones no conservadoras, para generar variantes más diversas, a condición de que dichas variantes conserven la actividad de citocromo P450. Las variantes también pueden ser producidas por la deleción e inserción del o de los nucleótidos en las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido variante.

Las variantes de los polipéptidos de la invención pueden utilizarse para lograr por ejemplo la actividad enzimática potenciada o reducida deseada, la regioquímica o la estereoquímica modificadas o la utilización del sustrato alterado o la distribución del producto, la afinidad incrementada hacia el sustrato, la especificidad mejorada para la producción de uno o más compuestos deseados, la velocidad incrementada de la reacción de la enzima, la actividad o estabilidad más elevada en un entorno específico (pH, temperatura, disolvente, etc.), o el nivel de la expresión mejorado en un sistema de expresión deseado. Se puede fabricar una variante o mutante dirigido al sitio por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Las variantes y derivados de los polipéptidos naturales pueden obtenerse mediante el aislamiento de las variantes que están presentes de manera natural, o la secuencia de nucleótidos de las variantes, u otras o las mismas especies o estirpes de plantas, o programando artificialmente mutaciones de las secuencias de nucleótidos que codifiquen para los polipéptidos de la invención. Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos naturales pueden conseguirse por cualquiera de un número de procedimientos convencionales.

Las variantes de los polipéptidos que son resultado de una fusión de las secuencias de péptidos adicionales en los extremos amino y carboxilo terminales de los polipéptidos de la invención pueden utilizarse para potenciar la expresión de los polipéptidos, pueden ser útiles en la purificación de la proteína o pueden mejorar la actividad enzimática del polipéptido en un sistema de expresión o entorno deseados. Dichas secuencias peptídicas adicionales pueden ser péptidos señal, por ejemplo. En consecuencia, la presente invención abarca las variantes de

los polipéptidos de la invención, tales como las obtenidas por la fusión con otros oligo o polipéptidos y/o las que se unen a péptidos señal.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente solicitud desvelan y describen los procedimientos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

5 Descripción de las figuras

Figura 1: Estructuras de los compuestos citados.

10 **Figura 2** Alineación de las secuencias de aminoácidos de monooxigenasas de P450 seleccionadas con actividad de terpeno hidroxilasa definida (técnica anterior). Las regiones conservadas encontradas en todas las enzimas de P450 están subrayadas. Las seis regiones utilizadas para diseñar los oligonucleótidos específicos de la terpeno hidroxilasa están subrayadas con flechas. La dirección de las flechas indica la orientación de los oligonucleótidos.

Figura 3: Modificaciones N-terminales (fijación a la membrana) introducidas en los dos P450 de vetiver para una expresión heteróloga mejorada en *E. coli*.

Figura 4: Espectro diferencial de CO representativo obtenido con la proteína recombinante de VzP521-11.

15 **Figura 5:** Secuencia de la región espaciadora entre el P450 y la CPR en las construcciones bi-cistrónicas. Las secuencias del ADN y de los aminoácidos al final del P450 y al inicio de CPR se muestran.

20 **Figura 6:** Análisis por CGEM de la bioconversión de (+)-zizaeno con el *E. coli* que expresa el VzP521-16 de P450 de vetiver y de una CPR de arabidopsis (tcATR1). A. Cromatograma de iones totales. B. Espectro de masas del sustrato (1) y los productos (2 a 4) con la identidad y la estructura de los compuestos correspondientes.

Figura 7: Esquema que muestra las etapas sucesivas de la oxidación enzimática del zizaeno.

Figura 8: Cromatograma de iones totales del análisis de CGEM de la bioconversión de varias moléculas de terpeno por el P450 del vetiver. Los picos que corresponden al sustrato están indicados y los pesos moleculares de los productos están indicados.

25 **Figura 9:** Esquema que muestra la bioconversión por los P450 de vetiver de varias moléculas de terpeno para las cuales los productos fueron identificados.

Figura 10: Organización del operón artificial diseñado para la co-expresión en *E. coli* de los P450 de vetiver, una CPR y la zizaeno sintasa.

30 **Figura 11:** Cromatograma de iones totales de un análisis de CGEM del sesquiterpeno producido por las células de *E. coli* que expresan la (+)-zizaeno sintasa, el VzP521-16-1 de P450 de vetiver y la CPR de arabidopsis, junto con las enzimas para la producción de FPP utilizando una vía de mevalonato heteróloga.

Realizaciones específicas de la invención o ejemplos

La invención se describirá ahora en más detalle por medio de los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

35 **Extracción del ARN y construcción de la biblioteca de ADNc**

Se obtuvieron plantas de vetiver (*Vetiveria Zizanioides (L.) Nash*) de un vivero de plantas (The Austral Plants Company, Les Aviron, Isla Reunión, Francia). Las plantas se cultivaron en macetas en un invernadero (Lullier Agronomy research Station, Ginebra, Suiza) y se propagaron vegetativamente por la división de grupos de seis meses hasta un año de edad. Para la recolección de las raíces, las plantas se retiraron de las macetas y se aclararon con agua del grifo.

Para la extracción del ARN, se combinaron las raíces de varias plantas: plántulas (de 4 a 6 meses después de la propagación), plantas viejas con un sistema de raíces denso bien desarrollado (de 1 a 2 años después de la propagación) y plántulas secadas a temperatura ambiente durante 24 a 36 horas después de ser retiradas de las macetas. Las raíces se cortaron de la parte aérea de las plantas y se congelaron en nitrógeno líquido. Las raíces se recortaron primero toscamente en nitrógeno líquido utilizando un aparato Waring Blendor (Waring Laboratory, Torrington, EE.UU.) y luego se molieron hasta un polvo fino utilizando un mortero y la mano del mortero. El ARN total se extrajo siguiendo el procedimiento descrito en Kolosova y col. (Kolosova N, Miller B, Ralph S, Ellis BE, Douglas C, Ritland K, y Bohlmann J, *Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees. J Biotechniques*, 36(5), 821-4, 2004) con las siguientes modificaciones. Un volumen de 20 ml del tampón de extracción se utilizó para 2 gramos del tejido molido y el tampón de la extracción se suplementó con 2 % (p/v) de la

PVP (polivinilpirrolidona, Sigma-Aldrich). Para la extracción del CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio, Sigma-Aldrich), el sedimento de ácido nucleico se resuspendió en 2 ml del tampón de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM) y la extracción se efectuó con 2 ml de NaCl 5 M y 1 ml de CTAB al 10 %. Para la precipitación del isopropanol, el sedimento del ácido nucleico se disolvió en 500 µl de TE. El sedimento del ARN final se resuspendió en 50 µl de agua.

La biblioteca de ADNc de doble cadena ligada al adaptador se preparó a partir de 1 µg de ARNm utilizando el Kit de Amplificación de ADNc Marathon™ (Clontech, Takara Bio Europe) siguiendo el protocolo del fabricante.

Ejemplo 2

Diseño de los oligonucleótidos específicos para P450

Para diseñar los oligonucleótidos específicos para los P450 de la planta con actividad de terpeno hidroxilasa, se seleccionaron secuencias de aminoácidos de los P450 de hidroxilación del terpeno conocidos: una limoneno 6-hidroxilasa de hierbabuena (GenBank, n.º de referencia AAD44150), dos limoneno 3-hidroxilasas de menta (GenBank, n.º de referencia AAD44152 y AAD44151), una epi-aristolocheno hidroxilasa del tabaco (Genbank, n.º de referencia AAK62343), una premnaspirodieno hidroxilasa de *Hyoscyamus muticus* (GenBank, n.º de referencia ABS00393), dos limoneno hidroxilasas de la hierbabuena escocesa (Genbank access, n.º de referencia y AAQ18708), una diterpeno hidroxilasa del tabaco (Genbank, n.º de referencia AAD47832) y dos miembros de la familia CYP71D, Cyp71D4 de la patata (Genbank, n.º de referencia CAC24711) y CYP71D6 de la patata silvestre (Genbank, n.º de referencia P93530). Las secuencias se alinearon con el programa ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994); *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice*; *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680). La alineación se representa en la figura 2.

Para diseñar los oligonucleótidos que se utilizaron para las amplificaciones de los fragmentos de los ADNCs de P450 homólogos, las regiones conservadas se seleccionaron en esta alineación. Se tuvieron en cuenta parámetros tales como la conservación de los aminoácidos a través de todas las secuencias y la presencia de los aminoácidos con una degeneración baja del codón, en la selección de estas regiones. Además, debido a que los genomas de las plantas contienen un gran número de P450 implicados en muchos metabolismos diferentes, las regiones relacionadas con las funciones comunes para todos los P450 se evitaron deliberadamente. Estas regiones incluyen por ejemplo el dominio de unión a hemo que flanquea el resto de cisteína perfectamente conservado que se une covalentemente al hierro hemo por medio de su cadena lateral de tiolato (motivo PFGxGRRICPG en la alineación de la invención), el así llamado "meandro" (motivo FxPERF en la alineación de la invención) implicado presumiblemente en la interacción con la proteína del compañero redox y en la estabilización de la asociación de la proteína hemo, y la región de la hélice I localizada en el sitio activo sobre el lado distal del hemo (motivo (A/G)GTETSS) y están implicadas en la transferencia del protón y la activación del oxígeno. De este modo se seleccionaron seis regiones conservadas supuestamente características de las terpeno monooxigenasas de la planta (subrayadas con flechas en la figura 1).

Se diseñaron cebadores híbridos que contienen un núcleo generado 3' y un pinzamiento zonal de consenso 5' a partir de estas regiones siguiendo la estrategia para los Cebadores de Oligonucleótidos Híbridos Degenerados por Consenso (CODEHOP, del inglés *Consensus-Degenerated Hybrid Oligonucleotide Primers*) (Rose T.M., Schultz E.R., Henikoff J.G., Pietrokovski S., McCallum C.M., y Nienkoff S.; 1998; *Consensus-degenerated hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences*; *Nucleic Acids Research* 26(7), 1628-1635) y utilizando la interfaz en línea del programa de ordenador disponible en <http://blocks.fhcre.org/blocks/codehop.html>. Los oligonucleótidos se diseñaron para que tuvieran un núcleo degenerado de 11 a 14 bases con una degeneración máxima de 192 y una temperatura de hibridación de entre 60 y 64 °C. Utilizando este procedimiento se diseñaron tres cebadores de sentido (P450-terp-F1 a F3 (SEQ ID NO: 5 a 7)) y cuatro cebadores antisentido (P450-Terp-RI a R4 (SEQ ID NO: 8 a 11) a partir de las seis regiones conservadas mostradas en la Figura 1 (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para la terpeno-hidroxilasa. La secuencia del núcleo degenerado de cada cebador está indicado con letras minúsculas y el pinzamiento zonal de consenso está indicado con mayúsculas. Las secuencias de nucleótidos están indicadas del extremo 5' al 3' para los cebadores directos y del extremo 3' al 5' para los cebadores inversos. La degeneración en las secuencias de nucleótidos se indica utilizando el código de una letra de la IUPAC.

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos de consenso correspondiente
450-terp-F1 (SEQ ID NO: 5)	GPVMHVQLGE 5'-GGCCCGGTGATGCACGTGcarytngnga-3'
P450-terp-F2 (SEQ ID NO: 6)	PYGDHWRQMR 5'-CCGTACAGCGACCACTGGmrncaratgmg-3'
P450-terp-F3 (SEQ ID NO: 7)	SMTCRAAFG 5'-GCTCCATGACCTGCCGGdsngcnttygg-3'

(continuación)

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos de consenso correspondiente
P450-terp-R1 (SEQ ID NO: 8)	VIKETMRMH 3'-cannanttyctCTGGTACGCCTACGT-5'
P450-terp-R2 (SEC-ID-NO:9)	ETMRMHPP 3'-ctygtndankcCTACGTGGGCGGG-5'
P450-terp-R3 (SEQ ID NO: 10)	FGLANVYLP 3'-aarccnranccgGTTGCAGATGGAGGGC-5'
P450-terp-R4 (SEQ ID NO: 11)	HFDWKLPTG 3'-gtraarctracctyGACGGCTTCCC-5'

Ejemplo 3**Amplificación de PCR de los ADNc del P450 de vetiver**

5 Los cebadores descritos en el Ejemplo 2 se utilizaron para la amplificación de los fragmentos del ADNc de P450 por PCR de la biblioteca del ADNc del vetiver. Las PCR se realizaron utilizando la Mezcla de Polimerasa Advantage® 2 (Clontech, Takara Bio Europe). Cada una de las mezclas de PCR contenía, en un volumen total de 50 µl, 5 µl del tampón de PCR Advantage® 2, dNTPs 200 µM, 200 nM de cada cebador del oligonucleótido, 5 µl de ADNc diluido 200 veces, 1 µl de la Mezcla de la Polimerasa Advantage® 2. Las siguientes condiciones se utilizaron para las amplificaciones:

- 10
- 3 minutos de desnaturalización a 94 °C;
 - 15 ciclos de
 - o 1 minuto de desnaturalización a 94 °C,
 - o 1 minuto de hibridación a 65 °C para el primer ciclo y menos de un grado para cada ciclo siguiente, y
 - o 2 minutos de extensión a 72 °C;
 - 15
 - 20 ciclos de
 - o 1 minuto de desnaturalización a 94 °C,
 - o 1 minuto de hibridación a 58 °C y
 - o 2 minutos de extensión a 72 °C; y
 - 20
 - finalmente 10 minutos de extensión a 72 °C.

Se realizaron diferentes PCR con las posibles combinaciones de los cebadores sentido y antisentido específicos para la terpeno-hidroxilasa. Los amplicones con el tamaño esperado se clonaron en el vector pCR®2.1-TOPO utilizando el Kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA), los insertos se sometieron a secuenciación del ADN y la secuencia se comparó frente a la base de datos de proteínas no redundantes del GenBank (NCBI) utilizando el algoritmo BLASTXn (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410).

30 Varias combinaciones de cebadores (P450-terp-F1 (SEQ ID NO: 5) con P450-terp-R2 (SEQ ID NO: 9), P450-terp-F3 (SEQ ID NO: 7) con P450-terp-R3 (SEQ ID NO: 10), y P450-terp-F1 (SEQ ID NO: 5) con P450-terp-R4 (SEQ ID NO: 11)) proporcionaron fragmentos del ADN con el tamaño esperado y con las secuencias que mostraban homología con respecto a las secuencias de P450. Solamente se conservaron los fragmentos que mostraban homología con las terpeno monooxigenasas caracterizadas (aproximadamente el 50 % de los fragmentos secuenciados). Las secuencias de ADN seleccionadas se alinearon y se dedujo una secuencia del ADN de consenso de 1167 pb (CA521 (SEQ ID NO: 12)). La secuencia de aminoácidos deducida de CA521 mostró una identidad tan elevada como el 45 % con las terpeno monooxigenasas de la planta conocidas.

35 Se obtuvieron secuencias de longitud total con la técnica de Amplificación Rápida de los Extremos del ADNc (RACE, del inglés *Rapid Amplification of cDNA Ends*). El Kit de Amplificación del ADNc de Marathon™ (Clontech, Takara Bio Europe) se utilizó para todos los experimentos de RACE. Las mezclas de la reacción de RACE típicas contienen, en un volumen final de 50 µl, 5 µl del tampón de PCR Advantage® 2 (Clontech, Takara Bio Europe), 200 µM de cada dNTP, 1 µl de la Mezcla de la Polimerasa Advantage® 2 (Clontech, Takara Bio Europe), 200 µM del cebador específico para el adaptador, 200 µM del cebador específico para el ADNc y 5 µl del ADNc de las raíces de vetiver unidas al adaptador diluido 200 veces. La amplificación se realizó sobre una máquina cicladora térmica de Eppendorf Mastercycler Gradient. Las condiciones de ciclación térmica fueron como se indica a continuación: 1 min a 94 °C; 5 ciclos de 20 s a 94 °C y 3 min a 72 °C, 5 ciclos de 30 s a 94 °C y 3 min a 72 °C, 20 ciclos de 30 s a 94 °C y 3 min a 68 °C. Cuando fue necesario, se realizó una segunda vuelta de amplificación utilizando los oligonucleótidos encajados. Los amplicones con el tamaño esperado se clonaron en el vector pCR®2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad,

CA) y los insertos se sometieron a la secuenciación de ADN y la secuencia se comparó frente a la base de datos de la proteína no redundante de Genbank (NCBI) utilizando el algoritmo de BLASTX (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410).

5 Para la amplificación de los extremos de CA-521, se dedujeron oligonucleótidos de sentido y antisentido de los fragmentos del ADN generados por PCR y se utilizaron en 3'RACE y 5'RACE: CA521-F1 (SEQ ID NO: 13), CA521-F2 (SEQ ID NO: 14), CA521-R1 (SEQ ID NO: 15) y CA521-R2 (SEQ ID NO: 16). Utilizando los oligonucleótidos de sentido, se obtuvo un fragmento de 500 pb (CA635 (SEQ ID NO: 17)), que compartía un solapamiento de 176 restos idénticos con el fragmento de CA251. Este fragmento de CA635 contenía una región codificante de 138 pb, incluyendo el codón de terminación, seguido de una región 3' sin traducir. El 5'RACE proporcionó un fragmento de 10 426 pb (CA884 (SEQ. ID NO:18)) que contenía la región codificante de 243 pb faltante en el extremo 5'.

Se diseñaron oligonucleótidos a partir de las regiones de inicio y de terminación de la secuencia de la longitud total reconstituida, CA251-inicio (SEQ. ID NO: 19), CA521-terminación (SEQ. ID NO: 20), y se utilizaron como cebadores para la amplificación del ADNc de longitud completa. Esta amplificación se realizó utilizando la *Pfu* ADN polimerasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.), en un volumen final de 50 µl que contenía 5 µl del tampón 10X de la *Pfu* ADN polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador, 2,9 unidades de la *Pfu* ADN polimerasa y 2,5 µl del ADNc de vetiver diluido 200 veces. Las condiciones de ciclación térmica fueron como se indica a continuación: 15 1,5 min a 95 °C; 30 ciclos de 45 s a 95 °C, 30 s a 64 °C y 4 min a 72 °C; y 10 min a 72 °C. Los productos de la PCR se clonaron en el vector pCR@2.1-TOPO utilizando el Kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se controló la secuencia del ADN. A partir de la secuenciación de varios clones, se conservaron dos secuencias del ADN distintas (VzP521-11 (SEQ. ID NO: 21) y VzP521-16 (SEQ. ID NO: 22)) que compartían el 93 % de identidad de secuencia. Las secuencias de aminoácidos deducidas, compuestas de 513 y 514 restos respectivamente, compartieron el 89 % de identidad. La identidad de secuencia de aminoácidos de VzP521-11 (SEQ. ID NO: 23) y VzP521-16 (SEQ. ID NO: 24) con la correspondencia más cercana en las bases de datos de la secuencia se 20 enumeran a continuación.

Números de referencia, denominación, organismo	VzP521-11	VzP521-16
EER94164, proteína hipotética, Sorghum bicolor	68 %	67 %
ACF87848, proteína desconocida, Zea mays	67 %	67 %
EER96012, proteína hipotética, Sorghum bicolor	65 %	65 %
ACF86186, proteína desconocida, Zea mays	65 %	64 %
EER96013, proteína hipotética, Sorghum bicolor	65 %	64 %
EER92230, proteína hipotética, Sorghum bicolor	63 %	61 %
EAY78666, proteína hipotética, Oryza sativa	61 %	61 %
AAP53961, proteína de la familia del citocromo P450, Oryza sativa	61 %	60 %
BAD17264, citocromo P450 supuesto, Oryza sativa	59 %	58 %

25 Las identidades de las secuencias de aminoácidos con las proteínas caracterizadas funcionalmente y disponibles públicamente, más cercanas, se enumeran en la tabla a continuación:

Números de referencia, denominación, organismo	VzP521-11	VzP521-16
AAD44151, AAQ18706, AAD44152, AAT39473, AAQ18708M, limoneno hidroxilasa, especies de Mentha.	43 al 45 %	43 al 45 %
AAK62432, premnaspirodieno oxigenasa, Hyoscyamus muticus	50 %	48 %
AAK62432, epi-aristolocheno oxidasa, Nicotiana tabacum	46 %	45 %
ADF43083, germacreno A oxidasa, Bernadesia spinosa	44 %	44 %
ADM86719, valenceno oxidasa, Chicorium intybus	45 %	46 %
AF43081, germacreno A oxidasa, Saussura costus	43 %	44 %

30 Los polipéptidos VzP521-11 (SEQ. ID NO: 23) y VzP521-16 (SEQ. ID NO: 24) comprenden una parte que es una fijación a la membrana y una región activa que es responsable de la actividad catalítica de P450. Las regiones activas de VzP521-11 y VzP521-16 se representan en la SEQ. ID NO: 1 y 2, respectivamente. La secuencia de ácidos nucleicos que codifican para estas secuencias activas se representa en la SEQ. ID NO: 3 y 4,

respectivamente.

Ejemplo 4

Expresión heteróloga de los P450 de vetiver en bacterias

5 En las monooxigenasas de P450 de eucariotas, la secuencia N-terminal de la proteína constituye una fijación a la membrana esencial para la localización en la membrana de estas enzimas. Esta parte de la proteína, delimitada por un dominio rico en prolina (PPGP en 521-11 (SEQ ID NO: 23) y 521-16 (SEQ ID NO: 24)), no es esencial para el control de la especificidad de la actividad enzimática. Esta región puede modificarse, de este modo, por delección, inserción o mutación, sin efecto sobre la actividad catalítica. Sin embargo, se ha demostrado que la modificación específica de la región N-terminal de los P450 de eucariotas, incluyendo los P450 de plantas, tiene un efecto positivo sobre los niveles de proteínas recombinantes detectadas, cuando se expresan en los microorganismos (Halkier y col. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* 322, 369-377; Haudenschild y col. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* 379, 127-136). De este modo, basándose en estas observaciones previas las regiones de fijación a la membrana de los P450 VzP521-11 y VzP521-16 se diseñaron para introducir la modificación mostrada en la figura 3.

15 Los ADNc modificados se obtuvieron por PCR como se indica a continuación. Un primer segmento que corresponde a la región de fijación a la membrana se amplificó utilizando los cebadores Pfus-NdeI (SEQ ID NO: 25) y 521_fus_r (SEQ ID NO: 26) (con el plásmido P2-2-48 (Haudenschild y col. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* 379, 127-136) como molde. Se amplificaron otros dos fragmentos utilizando el ADNc de los cebadores 521-fus-f (SEQ ID NO: 27) y 521-Hind (SEQ ID NO: 28) y ya sea el VzP521-11 (SEQ ID NO: 21) o VzP521-16 (SEQ ID NO: 22) como molde. Se realizó una segunda vuelta de PCR utilizando como modelo el primer producto de PCR y cualquiera de los dos últimos productos de PCR y como cebadores Pfus-NdeI (SEQ ID NO: 25) y 521-Hind (SEQ ID NO: 28). Todas las PCR se realizaron con la *Pfu* ADN polimesasa (Promega, Madison, WI, USA), en un volumen final de 50 µl que contenía 5 µl del tampón 10X de la *Pfu* ADN polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador, 2,9 unidades de la *Pfu* ADN polimerasa y 2,5 µl del ADNc de vetiver diluido 200 veces. Las condiciones de ciclación térmica fueron como se indica a continuación: 1,5 min a 95 °C; 30 ciclos de 45 s a 95 °C, 30 s a 64 °C y 4 min a 25 72 °C; y una etapa final de 10 min a 72 °C. Los dos productos de la PCR, VzP521-11-1 (SEQ. ID NO: 37) y VzP521-16-1 (SEQ. ID NO: 38), se digirieron con las enzimas de restricción de NdeI y HindIII y se unieron en el plásmido de expresión de pCWori (Barnes H.J. (1996) *Method Enzymol.* 272, 3-14) proporcionando los plásmidos pCW-218-521-11 y pCW-218-521-16 que contenían respectivamente el ADNc que codificaba los P450 de VzP521-11-1 y VzP521-16-1 modificados N-terminalmente (secuencias de aminoácidos de los VzP521-11-1 (SEQ. ID NO: 35) y VzP521-16-1 (SEQ. ID NO: 36)).

35 Para la expresión heteróloga, las células de *E. coli* JM109 se transformaron con los plásmidos de expresión 218-521-11 y 218-521-16. Se utilizaron colonias individuales de transformantes para los cultivos inoculados de 5 ml del medio LB que contenía ampicilina 50 µg/ml. Las células se cultivaron durante 10 a 12 horas a 37 °C. Los cultivos se utilizaron después para inocular 250 ml del Medio TB (Terrific Broth) suplementado con ampicilina 50 µg/ml y HCl de Tiamina 1 mM. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 3-4 h con agitación moderada (200 rpm) antes de añadir ácido δ-aminolevulínico 75 mg/l (sigma) y IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 1 mM, y los cultivos se mantuvieron a 28 °C durante 24-48 h con agitación a 200 rpm.

40 La expresión de las enzimas de P450 puede evaluarse cuantitativamente y cualitativamente mediante la medición del espectro de unión de CO (Omura, T. y Sato, R. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2387) en las fracciones de proteína de *E. coli*. Para la extracción de la proteína, las células se centrifugaron (10 min, 5000 g, 4 °C) y se resuspendieron en el tampón 1 enfriado con hielo (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, glicerol al 20 %, EDTA 0,5 mM). Se añadió un volumen de 0,3 mg/ml de lisozima (de la clara del huevo de pollo, Sigma-Aldrich) en agua y la suspensión se dejó 10-15 minutos a 4 °C con agitación. La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 7000 g y 4 °C y el sedimento se resuspendió en 20 ml del tampón 2 (KPO₄ 25 mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, glicerol al 20 %). La suspensión se sometió a un ciclo de congelamiento-descongelamiento a -80 °C, se añadió PMSF 0,5 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma-Aldrich) y la suspensión se sometió a ultrasonidos 3 veces durante 20 segundos. La suspensión se centrifugó 10 minutos a 10000 g (para retirar los desechos de las células) y el sobrenadante se recuperó y se centrifugó durante 2 horas a 100.000 g. El sedimento (fracción de la proteína de membrana) se resuspendió en 2-3 ml de tampón 3 (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, glicerol al 20 %). Para medir el espectro de CO, la fracción de la proteína se diluyó (1/10) en el tampón 3 a un volumen final de 2 ml. Se añadieron algunos cristales del ditionito de sodio (Na₂S₂O₄), la muestra se dividió en dos cubetas y el valor basal se registró entre 370 y 500 nm. Después, la cubeta de la muestra se saturó con monóxido de carbono y se registró la diferencia del espectro. La concentración de la enzima de P450 puede estimarse a partir de la amplitud del pico a 450 nm utilizando el coeficiente de extensión para el complejo de CO reducido de 91 mM⁻¹•cm⁻¹ (Omura, T. y Sato, R. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2387).

55 Siguiendo este procedimiento, se midieron espectros de CO típicos con una absorbancia máxima a 450 nm para las proteínas recombinantes VzP521-11-1 (SEQ ID NO: 35) y VzP52116-1 (SEQ ID NO: 36), atestiguando un plegado apropiado en las enzimas de P450 funcionales (Figura 4).

Ejemplo 5**Expresión heteróloga de las P450-reductasas de plantas en bacterias**

Para reconstituir la actividad de los P450 de planta, la presencia de una segunda proteína de membrana es esencial. Esta proteína, la P450-reductasa (CPR), está implicada en la transferencia de electrones desde NADPH (fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina, forma reducida) al sitio activo de P450. Se ha demostrado que una CPR de una planta puede complementar la actividad de la enzima de P450 de otra planta (Jensen y Moller (2010) *Phytochemistry* 71, 132-141).

Se han notificado varias secuencias nucleotídicas que codifican la PCR de diferentes fuentes de plantas. Por ejemplo, se han identificado dos CPR distintos, ATR1 y ATR2 (NCBI, n.º de referencia CAA46814.1 y CAA46815), en *Arabidopsis thaliana* (Urban y col. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(31) 19176-19186). Se ha demostrado que estas CPR complementan varias enzimas de P450 de varias especies de plantas. Se sintetizó un ADNc (secuencia tcATR1-opt (SEQ ID NO: 29) que codificaba para una versión truncada de ATR1 (deleción de 17 aminoácidos N-terminales) utilizando un codón de uso óptimo para la expresión en *E. coli* (DNA 2.0, Menlo Park, CA, EE.UU.) e incluyendo los sitios de restricción de NcoI y BamHI en el extremo 5' y el extremo 3', respectivamente. Este ADNc se unió en el plásmido pJ206 (DNA 2.0, Menlo Park, CA, EE.UU.) proporcionando el plásmido pJ206-tcATR1-opt. El inserto se digirió a partir del plásmido pJ206-tcATR1-opt con las enzimas de restricción de NcoI y BamHI y se unieron entre los sitios de restricción correspondientes del plásmido de expresión de pACYDuet-1 (Novagen, Merck Chemicals) proporcionando el plásmido pACYC-tcATR1-opt. La expresión funcional de las CPR en las células de *E. coli* puede estimarse después de la reducción enzimática del citocromo C. El plásmido pACYC-tcATR1-opt se utilizó para transformar las células B121(DE3) (Novagen) o JM109(DE3) (Promega, Madison, WI, EE.UU.) de *E. coli*. Las condiciones del cultivo, la expresión de la proteína y la preparación de la proteína libre de células se hicieron como se describió en el Ejemplo 4. Las proteínas se diluyeron en 1 ml de Tris pH 7,4 suplementado con FAD 5 µM, FMN 5 µM, citocromo C 40 mM (Sigma-Aldrich), MgCl₂ 1 mM. La reacción se inició mediante la adición de 0,12 mmoles de NADPH (Sigma). La reducción del citocromo C se registró por la medición del incremento de DO a 550 nm durante 0,5 a 2 minutos. La actividad específica de la reductasa (en mUnidades/µl) se calculó utilizando la siguiente fórmula: $(DO_{end}-DO_{start})/21/tiempo(seg)/Vol(\mu l) \times 60000$ (en mUnidades/µl). Normalmente, la actividad medida con el ATR1 recombinante varió entre 7 y 10 Unidades/µl.

Ejemplo 6**Co-expresión de un P450 y una P450 reductasa utilizando dos plásmidos**

Para una biotransformación celular completa utilizando P450 de planta, se requiere la co-expresión de las proteínas P450 y CPR en una sola célula hospedadora. Esta co-expresión puede obtenerse utilizando dos plásmidos. Por ejemplo, se co-transformaron células de *E. coli* de BL21 Star™(DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA) con el pACYC-tcATR1-opt y el plásmido pCW-218-521-11 o pCW-218-521-16. Las células transformadas se seleccionaron sobre placas de LB-agarosa de carbenicilina (50 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml). Se utilizaron colonias individuales para inocular 5 ml del medio de LB líquido suplementado con los mismos antibióticos. El cultivo se incubó toda la noche a 37 °C. El siguiente día se inocularon de 2 a 250 ml del medio TB suplementado con los mismos antibióticos y HCl de Tiamina 1 mM con 0,2 ml del cultivo toda la noche. Después de 6 horas de incubación a 37 °C, el cultivo se enfrió gradualmente a 28 °C y se añadieron IPTG 1 mM y ácido δ-aminolevulínico 75 mg/l. El cultivo se mantuvo de 24 a 36 horas. Se prepararon fracciones de proteína como se describió en el ejemplo 4 y la expresión del P450 y CPR recombinantes evaluó utilizando el procedimiento descrito en los ejemplos 4 y 5, respectivamente.

Ejemplo 7**Co-expresión de un P450 y una P450 reductasa a partir de un solo plásmido**

Se prepararon plásmidos de expresión con una construcción bi-cistrónica que comprendía un ADNc que codificaba un P450 del vetiver y un ADNc que codificaba PCR. Las construcciones se diseñaron para la inserción entre las dos regiones de codificación de una secuencia espaciadora que incluía un sitio de unión al ribosoma (RBS) (véase la figura 5).

El ADNc del tcATR1-opt (SEQ ID NO: 29) sintetizado con el uso del codón óptimo de *E. coli* (DNA 2.0, Menlo Park, CA, EE.UU.) se modificó para añadir al extremo 5', antes del codón de inicio, una extensión de 30 pb que contenía la secuencia espaciadora (SEQ ID NO: 30) y la secuencia de RBS. El ADNc del tcATR1-opt se amplificó utilizando los cebadores 2390-CPR-F2 (SEQ ID NO: 31) y 2390-CPR-R2b (SEQ ID NO: 32) utilizando la *Pfu* ADN polimerasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.), en un volumen final de 50 µl que contenía 5 µl del tampón 10X de la *Pfu* ADN polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador, 2,9 unidades de la *Pfu* ADN polimerasa y 2,5 µl del plásmido pJ206-tcATR1-opt. Las condiciones de ciclación térmica fueron como se indica a continuación: 1,5 min a 95 °C; 30 ciclos de 45 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 4 min a 72 °C; y 10 min a 72 °C. Después de la purificación sobre un gel de agarosa, el producto de la PCR se unió en los plásmidos pCW-218-521-11 y pCW-218-521-16 digeridos por HindIII utilizando el Kit de Clonación de PCR In-Fusion® Dry-Down (Clontech, Takara Bio Europe) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los dos plásmidos resultantes pCW-218-521-11 y pCW-218-521-16 contenían las construcciones bi-cistrónicas de las secuencias de VzP521-11-1 y VzP521-16-1 respectivamente, seguidas de la

secuencia de tcATR1-opt.

Se transformaron células de *E. coli* con uno de estos dos plásmidos y las fracciones de la proteína de membrana se prepararon como se describió en el Ejemplo 4. La expresión de P450 y CPR se verificó siguiendo los espectros de unión de CO y los ensayos de reducción de NADPH como se describió en los Ejemplos 4 y 5.

5 Ejemplo 8

Bioconversión de zizaeno a kusimol utilizando células enteras de *E. coli* que expresan P450 de vetiver y CPR

La oxidación de (+)-zizaeno puede ser realizarse utilizando células enteras que expresan P450 de vetiver y una CPR (bioconversión). El zizaeno se preparó utilizando células *E. coli* diseñadas siguiendo el procedimiento descrito en la patente WO 2010/134004 y utilizando la sesquiterpeno sintasa con la secuencia de número de referencia HI931369.

10 En resumen, se transformaron células de *E. coli* de BL21Star™ (DE3) (Invitrogen, Ltd) con el plásmido pACYC-4506 y el plásmido pETDuet-VzZS-opt. El plásmido pACYC-4506 contenía los genes que codifican para las cinco enzimas de una ruta biosintética que convierte el ácido mevalónico en FPP: una mevalonato cinasa (*MvaK1*), una fosfomevalonato cinasa (*MvaK2*), una mevalonato difosfato descarboxilasa (*MvaD*), una isopentenilo difosfato isomerasa (*idi*) y la farnesilo difosfato sintasa (FPS). Para construir este plásmido, el gen FPS se amplificó a partir de
15 ADN genómico de *S. cerevisiae* y se unió en el primer sitio de clonación múltiple (MCS, del inglés *multiple cloning site*) del pACYDuet-1 y se amplificó el operón que codificaba los genes para un *MvaK1*, un *MvaK2*, un *MvaD*, y un *idi* a partir del ADN genómico de *Streptococcus pneumoniae* (ATCC BAA-334) y se unió en el segundo MCS. El pETDuet-VzZS-opt contenía una versión optimizada del codón de la (+)-zizaeno sintasa de vetiver (como se describió en la SEQ ID NO: 11 del documento WO 2010/134004).

20 Se utilizaron colonias individuales de las células transformadas para inocular 5 ml del medio de LB suplementado con carbenicilina (50 mg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml). Los cultivos se incubaron toda la noche a 37 °C. El siguiente día se inoculó 1 l del medio Terrific Broth (TB) suplementado con los mismos antibióticos con 1/100 volúmenes del cultivo toda la noche. Después de 6 horas de incubación a 37 °C, los cultivos se enfriaron gradualmente a 28 °C y se añadieron IPTG 1 mM, ácido mevalónico 2 g/l preparado por disolución de mevalonolactona (sigma-Aldrich) en
25 NaOH 0,5 N a una concentración de 1 g/ml y la incubación de la solución durante 30 minutos a 37 °C), y 100 g/l de resina de Amberlite™ XAD™-4 (Rhom and Haas) a los cultivos. Después de 48 h de incubación, la resina se recuperó, se aclaró con agua y se eluyó con 3 volúmenes de éter dietílico. El disolvente se retiró y el producto purificado por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice utilizando n-hexano como disolvente. Las fracciones que
30 contenían el (+)zizaeno se agruparon, el disolvente se retiró por destilación y el resto se utilizó como sustrato para los ensayos de oxidación.

Se transformaron células de *E. coli* (BL21Star™(DE3) (Invitrogen, Ltd) o JM109(DE3) (Promega)) con los plásmidos pCW-218-521-11 o pCW-218-521-16 o las células se o-transformaron con los plásmidos pCW-218-521-11 o pCW-218-521-16 y pACYC-tcATR1-opt y se cultivaron en un medio de TB suplementado con un 3 % de glicerol o el medio de LB suplementado con un 1 % de glucosa. Los cultivos se incubaron a 37 °C hasta que alcanzaron una densidad
35 óptica de 1. Después, los cultivos se transfirieron a 28 °C, se añadieron IPTG 1 mM y ácido δ-aminolevulínico 74 mg/l y el cultivo, y se incubaron durante 24 horas.

Las células se recogieron en la fase del crecimiento exponencial, se centrifugaron y se resuspendieron en 0.5 volúmenes del tampón de fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 suplementado con un 5 % de glicerol o un 3 % de glucosa. El sustrato ((+)-zizaeno) se añadió a una concentración final de 0,5 mg/ml como una mezcla compuesta de
40 10 mg de Tween® 20 (sigma-Aldrich), 10 mg de antiespumante (Erol DF, PMC Ouvre, Lesquin, Francia), 20 mg de (+)-zizaeno y 1 ml de agua. La conversión se dejó proceder durante 24 horas a 20 °C con agitación moderada. Los medios se extrajeron con 2 volúmenes de acetato de etilo y los extractos se analizaron por CGEM sobre un sistema de la Serie GC de Agilent 6890 conectado a un detector de masas de Agilent 5975. La CG se equipó con una por
45 una columna capilar SPB-1 de diámetro interno de 0,25 mm por 30 m (Supelco, Bellefonte, PA). El gas vehículo fue He a un flujo constante de 1 ml/min. La temperatura inicial del horno fue de 50 °C (1 min de retención) seguida de un gradiente de 10 °C/min a 300 °C. La identificación de los productos se basó en la comparación de los espectros de masa y los índices de retención con los patrones auténticos y las bases de datos internas.

En estas condiciones, la oxidación del (+)-zizaeno se observó con células que contenían las proteínas recombinantes VzP521-11-1 y VzP521-16-1. Estos productos se observaron y se analizaron por análisis por CGEM: kusimol, zizanal y ácido zizanoico, que fueron resultado de la oxidación sucesiva del (+)-zizaeno (figura 6). Las
50 enzimas VzP521-11-1 y VzP521-16-1 catalizan de este modo la oxidación del (+)-zizaeno a kusimol. La oxidación adicional del kusimol a zizanal y al ácido zizanoico podría ser catalizada por los P450 recombinantes o por las actividades enzimáticas de *E. coli* endógenas (figura 7).

Ejemplo 9**Bioconversión de otras moléculas de monoterpeno y sesquiterpeno utilizando las células enteras de *E. coli* que expresan P450 de vetiver y CPR**

5 Se prepararon células de *E. coli* que expresan los P450 de vetiver y una PCR, se cultivaron y las bioconversiones se realizaron utilizando células en reposo en un tampón de fosfato de potasio como se describió en el Ejemplo 8.

Se realizaron ensayos con varias moléculas de terpeno y la formación de moléculas de terpeno oxigenado se evaluó utilizando análisis por CGEM como se describe en el Ejemplo 8. Además del (+)-zizaeno, se observó la bioconversión con las siguientes moléculas: (+)-limoneno, (-)-limoneno, alfa-pineno, alfa-cedreno, alfa-longipineno, alfa-funebreno, tujopseno, valenceno, beta-chamigreno, aloaromadendreno, alfa-neocloveneno, isosativeno, ledeno, 10 alfa-humuleno, alfa-gurjuneno, gamma-gurjuneno, beta-funebreno, alfa-copaeno, alfa-gurjuneno y beta-pineno. Las estructuras de estas moléculas se muestran en la figura 1. Se muestran ejemplos de los cromatogramas de análisis por GMCS de estas bioconversiones en la figura 8. Para algunos de los sustratos ensayados, los productos podrían identificarse y se muestran en la figura 9.

Ejemplo 10**Oxidación in-vitro de compuestos que utilizan P450 de vetiver**

15 La oxidación del sesquiterpeno utilizando P450 del vetiver también puede realizarse in-vitro utilizando lisados celulares o proteína purificada parcialmente.

Se transformaron células de *E. coli* (BL21Star™(DE3) (Invitrogen, Ltd) o JM109(DE3) (Promega)) con los plásmidos pCW-218-521-11 o pCW-218-521-16 o las células se co-transformaron con los plásmidos pCW-218-521-11 o pCW-218-521-16 y pACYC-tcATR1-opt. Las condiciones del cultivo de las células, la expresión de las proteínas y la preparación de las proteínas de la membrana fueron como se describió en los Ejemplos 4 y 5. Estas fracciones de la proteína se utilizaron para la conversión in-vitro del (+)-zizaeno o las moléculas de terpeno enumeradas en el Ejemplo 9. Los ensayos típicos están compuestos de 20 a 50 µl de proteínas, 0,4 mg de NADPH (sigma), FAD 5 µM (dinucleótido de flavina adenina, Sigma), FMN 5 µM (mononucleótido de flavina, Sigma), 0,05 mg de (+)-zizaeno en un volumen total de 1 ml del tampón Tris 100 mM de pH 7.4. En algunos ensayos, se añadió un sistema de reconstitución de NADPH y consistió en 6-fosfato de glucosa 25 mM (Sigma) y 6 mUnidades de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Sigma). Los ensayos se incubaron de 2 a 12 horas a 30 °C. Después, las muestras se extrajeron dos veces con un volumen de acetato de etilo y se analizaron por CGEM como se describió en el ejemplo 8.

25 Utilizando su enfoque, se obtienen los mismos productos que cuando se utilizan las células de *E. coli* completas como se describió en los ejemplos 8 y 9.

Ejemplo 11**Producción in-vivo de kusimol en células diseñadas por ingeniería genética**

Los productos oxidados de (+)-zizaeno también pueden producirse en las células de *E. coli* diseñadas por ingeniería genética para producir sesquiterpenos a partir de una fuente de carbono tal como la glucosa o el glicerol. Se prepararon plásmidos que consistían en el plásmido pCWori (Barnes H.J (1996) *Method Enzymol.* 272, 3-14) que contenía un operón compuesto del P450, la P450-reductasa y la terpeno sintasa. Se prepararon dos plásmidos de este modo, mediante la inserción de una secuencia de RBS y la secuencia optimizada que codificaba para la (+)-zizaeno sintasa (VzZS) después del codón de terminación de la secuencia de CPR en el pCW-2391-521-11 o pCW-2392-521-16.

40 El VzZS se amplificó a partir del plásmido pETDuet-VzZS-opt (como se describe en el documento WO 2010/134004) utilizando los cebadores 2401-VzZS-F (SEQ ID NO: 33) y 2401-VzZS-R (SEQ ID NO: 34). La PCR se realizó utilizando la *Pfu* ADN polimerasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.), en un volumen final de 50 µl que contenía 5 µl del tampón 10X de la *Pfu* ADN polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador, 2,9 unidades de la *Pfu* ADN polimerasa y 50 ng del molde. Las condiciones de ciclación térmica fueron como se indica a continuación: 45 1,5 min a 95 °C; 30 ciclos de 45 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 4 min a 72 °C; y 10 min a 72 °C. Los productos de la PCR se purificaron y se unieron en los plásmidos pCW-218-521-11 o pCW-218-521-16 digeridos con las enzimas de restricción de HindIII y EcorI. Esta unión se realizó utilizando el Kit de Clonación de PCR In-Fusion® Dry-Down (Clontech, Takara Bio Europe) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos resultantes pCW-218-521-11 y pCW-218-521-16 contenían un inserto que consistía en las secuencias VzP521-11-1 o VzP521-16-1 respectivamente, la secuencia tcATR1-opt (P450 reductasa) y la secuencia VzZs ((+)-zizaeno sintasa) (figura 10).

55 Se preparó otro plásmido de expresión que contenía dos operones que consistían en los genes que codifican las enzimas para una vía de mevalonato completa. Se sintetizó químicamente un primer operón sintético que consistía en los genes de una acetoacetil-CoA tiolasa de *Escherichia coli* (*atoB*), una HMG-CoA sintasa de *Staphylococcus aureus* (*mvaS*), una HMG-CoA reductasa de *Staphylococcus aureus* (*mvaA*) y una FPP sintasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*ERG20*), (DNA2.0, Menlo Park, CA, EE.UU.) y se unió en el vector pACYCDuet-1 digerido con *NcoI*

*Bam*HI (Invitrogen) produciendo el pACYC-29258. Los genes de este plásmido codificaban las enzimas necesarias para la conversión de la acetil-CoA en mevalonato y para una FPP sintasa. El segundo operón contenía los genes que codifican las cuatro enzimas necesarias para la conversión del mevalonato en IPP y DMAPP y se amplificó a partir del plásmido pACYC-4506 (ejemplo 8) utilizando los siguientes cebadores: 5'-AAGGAGATATACATATGACAAAAAAGTTGGTGTCTCGGTCAGG-3' (directo) y 5'-CTTTACCAGACTCGAGTTACGCCTTTTTCATCTGATCCTTTGC-3' (inverso). El amplicón resultante se clonó en el vector pACYC-29258 digerido con *Nco*I-*Xho*I utilizando el Kit de Clonación de PCR In-Fusion® Dry-Down (Clontech) proporcionando el vector pACYC-29258-4506.

Se co-transformaron células de *E. coli* de OverExpress™ C43(DE3) (Lucigen® Corporation) con el plásmido pACYC-29258-4506 y el plásmido pCW-2401-521-11 o el plásmido pCW-2402-521-16. Se utilizaron colonias individuales de células transformadas para inocular 5 ml del medio de LB suplementado con carbenicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (17 µg/ml). Los cultivos se incubaron toda la noche a 37 °C y se utilizaron para inocular el medio M9 suplementado con 2 g/l de extracto de levadura, glicerol al 3 %, FeSO₄ 10 µM, carbenicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 17 µg/ml. Los cultivos se incubaron 6 h a 37 °C, se enfriaron gradualmente a 25 °C y se añadieron IPTG 1 mM, ácido δ-aminolevulínico 74 µg/ml y 1/10 volúmenes de dodecano. Después de 48 horas, los cultivos se extrajeron con 2 volúmenes de éter metil terc-butílico (MTBE) y los extractos se analizan por CGEM como se describió en el Ejemplo 8, excepto por la temperatura del horno que se fijó inicialmente a 80 °C con un minuto de retención, seguido de un gradiente de 10 °C/min a 300 °C.

Se detectaron el sesquiterpeno (+)-zizaeno y el alcohol y el aldehído derivados (kusimol y zizanal). También se encontró el ácido zizanoico como producto minoritario (figura 11). Este experimento demuestra que, en las células diseñadas por ingeniería genética, el sesquiterpeno (+)-zizaeno es producido y es oxidado por el complejo de P450 y CPR heterólogo.

Este ejemplo demuestra que una célula de *E. coli* transformada para expresar un polipéptido de acuerdo con la invención es capaz de oxidar compuestos de terpeno tales como zizaeno, a condición de que se utilice en combinación con una P450 reductasa. Las otras enzimas con las que se transforma la célula de *E. coli* no son esenciales para dicha oxidación. De hecho, el terpeno oxidado también se produce cuando se transforma una célula de *E. coli* con el citocromo P450, la reductasa y la terpeno sintasa solamente, pero en una cantidad inferior. Dichas otras enzimas con las que se transforma la célula de *E. coli*, se añaden con el fin único de aumentar la cantidad de terpeno disponible como sustrato para el citocromo P450.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Firmenich SA
- <120> Citocromo P450
- <130> 8520-PCT
- <160> 38
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 472
- <212> PRT
- <213> *Vetiveria zizanoides*
- <400> 1

ES 2 625 861 T3

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

ES 2 625 861 T3

Gly Val Ala Leu Ala Asp Leu Phe Pro Ser Ser Arg Leu Ile Gln Met
 180 185 190

Ile Asp Thr Ala Pro Arg Lys Val Leu Ala Ala Arg Asn Asn Met Glu
 195 200 205

Arg Ile Leu Glu Glu Ile Ile Asn Glu Thr Lys Glu Ala Met Asp Arg
 210 215 220

Gly Asp Gly Gln Lys Lys Val Glu Gly Ile Leu Gly Val Leu Leu Arg
 225 230 235 240

Leu Gln Lys Glu Gly Ser Thr Pro Val Pro Leu Thr Asn Glu Val Ile
 245 250 255

Val Thr Val Met Phe Asp Met Phe Gly Ala Gly Ser Asp Thr Ser Ser
 260 265 270

Thr Leu Leu Thr Trp Cys Met Met Glu Leu Val Arg Ser Pro Pro Thr
 275 280 285

Met Ala Lys Val Gln Asp Glu Val Arg Glu Ala Phe Lys Gly Lys Lys
 290 295 300

Glu Ser Thr Ile Ile Thr Glu Asp Asp Leu Lys Gly Leu Thr Tyr Leu
 305 310 315 320

Lys Gln Val Ile Lys Glu Ala Leu Arg Met His Pro Pro Val Pro Leu
 325 330 335

Leu Leu Pro Arg Lys Cys Arg Glu Thr Cys Lys Val Met Gly Tyr Asp
 340 345 350

Ile Pro Lys Gly Thr Val Val Phe Ala Asn Ala Trp Ala Ile Gly Arg
 355 360 365

Asp Pro Lys Tyr Trp Glu Asp Pro Glu Glu Phe Lys Pro Glu Arg Phe
 370 375 380

Asp Lys Ser Asn Val Asp Tyr Lys Gly Thr Asn Phe Glu Tyr Leu Pro
 385 390 395 400

Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ile Cys Pro Gly Ile Asn Leu Gly Leu Cys
 405 410 415

Asn Ile Glu Leu Ala Leu Ala Ser Leu Leu Tyr His Phe Asp Trp Lys
 420 425 430

ES 2 625 861 T3

Leu Pro Asn Gly Met Glu Pro Lys Asp Ile Asp Met Gly Glu Ala Gln
 435 440 445

Gly Leu Ile Ala Ser Lys Lys Thr Asn Leu Thr Leu His Pro Val Thr
 450 455 460

Arg Ile Ala Pro Ala Gly Phe Asn
 465 470

<210> 2
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> *Vetiveria zizanoides*

5

<400> 2

Trp Thr Leu Pro Val Ile Gly Ser Leu His His Val Ile Thr Tyr Pro
 1 5 10 15

Asn Leu Gln Arg Ala Leu Arg Val Leu Ala Gln Lys Tyr Gly Pro Val
 20 25 30

Met Met Phe Gln Leu Gly Glu Val Pro Met Met Val Val Ser Ser Pro
 35 40 45

Ala Ala Ala Gln Glu Val Leu Lys Thr Asn Asp Leu Thr Phe Ala Asp
 50 55 60

Arg Tyr Thr Asn Ala Thr Ile Gly Ala Leu Thr Phe His Gly Glu Asp
 65 70 75 80

Met Val Phe Ala Pro Tyr Gly Glu Arg Trp Arg Gln Leu Arg Lys Ile
 85 90 95

Cys Met Leu Glu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Val Gln Ser Phe Arg His
 100 105 110

Ile Arg Glu Glu Glu Val Ala Arg Leu Val Gly Asn Ile Ala Thr Ser
 115 120 125

Ala Ala Ala Gly Glu Ala Val His Leu Asn Lys Met Val Ser Arg Phe
 130 135 140

Val Asn Asp Thr Val Val Arg Glu Ala Val Gly Ser Gly Ser Lys His
 145 150 155 160

Gln Glu Glu Tyr Leu Ser Ser Leu Asn Val Ala Leu Arg Gln Thr Met
 165 170 175

10

ES 2 625 861 T3

Gly Val Ala Val Ala Asp Leu Phe Pro Ser Ser Arg Leu Met Gln Met
180 185 190

Ile Asp Thr Ala Pro Arg Lys Val Leu Ala Ala Arg Asn Asn Met Val
195 200 205

Arg Ile Leu Glu Glu Ile Ile Lys Glu Thr Lys Glu Ala Met Glu Cys
210 215 220

Gly Asp Gly Gln Glu Lys Val Glu Gly Ile Leu Gly Val Leu Leu Arg
225 230 235 240

Leu Gln Lys Glu Gly Ser Thr Pro Val Pro Leu Thr Asn Glu Val Ile
245 250 255

Val Thr Val Met Phe Asp Met Phe Gly Ala Gly Ser Asp Thr Ser Ser
260 265 270

Thr Leu Leu Thr Trp Cys Met Thr Glu Leu Val Arg Ser Pro Pro Thr
275 280 285

Met Ala Lys Val Gln Asp Glu Val Arg Gln Ala Ile Lys Gly Lys Lys
290 295 300

Gln Ser Pro Ile Val Ile Thr Glu Asp Asp Leu Lys Gly Leu Thr Tyr
305 310 315 320

Leu Lys Gln Val Ile Lys Glu Thr Leu Arg Met His Thr Pro Leu Pro
325 330 335

Leu Leu Leu Pro Arg Lys Cys Arg Glu Thr Cys Lys Val Met Gly Tyr
340 345 350

Asp Ile Pro Lys Gly Thr Val Val Phe Ala Asn Ala Trp Ala Ile Cys
355 360 365

Arg Asp Pro Lys Tyr Trp Glu Asp Ser Glu Glu Phe Lys Pro Glu Arg
370 375 380

Phe Asp Lys Ser Ser Leu Asp Tyr Lys Gly Thr Asn Phe Glu Tyr Leu
385 390 395 400

Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ile Cys Pro Gly Ile Asn Leu Gly Leu
405 410 415

Gly Asn Ala Glu Ile Ala Leu Ala Ser Leu Leu Tyr His Phe Asp Trp
420 425 430

ES 2 625 861 T3

Lys Leu Pro Asp Gly Met Glu Pro Lys Asp Val Asn Met Glu Glu Ala
435 440 445

Gln Gly Leu Val Ala Ser Lys Lys Thr Asn Leu Thr Leu Tyr Pro Val
450 455 460

Thr Arg Ile Ala Pro Ala Gly Phe Asn
465 470

- 5
<210> 3
<211> 1419
<212> ADN
<213> *Vetiveria zizanoides*

<400> 3

ES 2 625 861 T3

tggacgctgc cggatgatcgg cagcctccac cacgtgatca cctaccccaa cctccacogc	60
gcactgcacg ggctggcgca gaagtacggg cgggtgatga tgttccggct cggcgagggtg	120
ccaatgatgg tgggtgctgc gccggcgcc gcgcaggagg ccoctcaagac gaacgacatc	180
gccttcggcg accggtacac caacgccacc atcggcgccg tcaacctcca tggcgaggac	240
atggcgctcg cggcctacgg cgagcgggtg cggcagctcc gcaagatctg cgtgctggag	300
ctgctcagcg ccgcccgggt gcagtcgctc cggccacatcc gggcgaggga ggtgctcgcg	360
ctcgtcggga aactcggcgc gtccgcggcc gccggcgaa ctgtccacct caacaagatt	420
gtcgcgaagt tcgtcaacga caccatcgtg agggaggcgg tcggcagcgg gagcaagcac	480
caggacgagt acctcaactc catcgacgta gccctcggc agacaatggg ggtcgcctc	540
gccgacctct tcccgctctc gaggtcata cagatgattg acaoggcacc ccggaagggtg	600
ctcgcggccc ggaacaacat ggagcgcac ctcgaggaaa tcatcaacga gaccaaggaa	660
gccatggacc gggcgacgg ccagaagaag gtggagggca tcctcgggtg cctgctgagg	720
ctccagaagg aaggcagcac gccggtcccg ctaccaacg aggtcatcgt tacggtgatg	780
tttgacatgt ttggcgctgg cagcgacacc tcgtcgacct tgctgacctg gtgcatgatg	840
gagctagtcc ggtcaccgcc gacgatggcc aaagtgcaag acgaggtgcg agaggcctc	900
aaagggaaga aggagagcac catcatcact gaagacgacc tcaaggggct caoctacctc	960
aagcaagtga tcaaggaggc cctgaggatg caccctccgg tgcccctcct gcttccaagg	1020
aagtgtcgcg agacgtgcaa ggtcatgggc tacgacattc ccaagggcac ggtagtgttc	1080
gctaacgcat gggcaatcgg cagggatccc aagtattggg aggatccaga ggagttcaag	1140
ccagagcgat tcgacaagag caatgtggac tacaagggaa caaactttga gtacctgccg	1200
tttgatctg gccgtcggat ttgtcccggc ataacctag gcttgtgcaa cattgagctc	1260
gcgttgcgga gccttctata tcactttgac tggaagctgc cgaacggaat ggagcccaaa	1320
gacatagata tgggagaggc tcaagggtta atcgccagta agaaaacaaa cctaaccctg	1380
caccctgtga ctgcattgc gccggcgggt tttaattaa	1419

<210> 4
 <211> 1422
 <212> ADN
 <213> *Vetiveria zizanoides*
 <400> 4

5

ES 2 625 861 T3

tggacgctgc cggatgatcgg cagcctccac cacgtgatta cctaccccaa cctccaacgt 60
gcactgcgcg tgctggcgca gaagtagggg ccagtgatga tgttcagct cggcgaggtg 120
ccaatgatgg tgggtgctgc gccagccgcc ggcgaggagg tcctcaagac gaacgacctc 180
accttcgocg acaggtacac caacgctacc atcggcgcgc tcacctcca tggcgaggac 240
atggtggtcg cgcctacgg cgagcgggtg cgcagctcc gcaaaatctg catgctagag 300
ctgctcagcg ccgcccgggt tcagtcttc cgcacatcc gggaggagga ggtggcggg 360
cttgtgggga acatcgccac gtctgctgcc gccggcgaag ccgtccacct caacaagatg 420
gtctcgaggt togtcaacga caccgtctg agggaggcgg tcggcagcgg gagcaagcac 480
caggaagagt acctcagctc cctcaacgta gccctccgc agacaatggg gtagccctc 540
gccgacctct tccgctctc caggctcatg cagatgattg acacggcacc ccggaaggtg 600
ctcgcagccc ggaacaacat ggtgcgcacc ctcgaggaaa tcatcaagga gaccaaggaa 660
gccatggaat gggggagcgg ccaggagaag gtggagggca tcctcggtgt gctgctgagg 720
ctccagaagg aaggcagcac gccggtcccg ctaccaacg aggtcatcgt tacggtgatg 780
tttgacatgt ttggcgccgg cagcgacacc tcctcgacct tgctgacctg gtgcatgaca 840
gagctagtcc ggtcaccgcc gacaatggcc aaagtgcaag atgaggtgcg acaggccatc 900
aaagggaaga agcagagccc catcgtcacc actgaagacg acctcaaggg gctcacctac 960
ctcaagcaag tgatcaagga gacctgagg atgcacactc ctttgcccct cctgctcca 1020
aggaagtgtc gtgagacgtg caaggtcatg ggctacgaca ttccaaggg cacggtagtg 1080
ttcgtaacg cgtgggcaat ctgcagggat cctaagtatt gggaggattc agaggagttc 1140
aagccagagc gattcgacaa gagcagtttg gactacaagg gaacaaactt tgagtacctg 1200
ccgtttggat ctggccgtcg gatttgcct gccataaatc ttgggttggg taacgctgaa 1260
atcgcgctag ccagccttct atatcacttt gactggaagc tacctgatgg aatggaacct 1320
aaggacgtaa atatggaaga ggctcaaggg ttagtcgcca gtaagaaaac aaacttaacc 1380
ctgtaccctg ttactcgcat tgcgccggcc ggttttaatt aa 1422

5 <210> 5
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n es a, c, g o t

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> n es a, c, g o t

<400> 5
 ggccccgtga tgcacgtgca rytnngnga 29

5 <210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n es a, c, g o t

20 <400> 6
 ccgtacagcg accactggmr ncaratgmg 29

25 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n es a, c, g o t

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> n es a, c, g o t

45 <400> 7
 gctccatgac ctgccggsn gcnttygg 28

50 <210> 8
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> n es a, c, g o t

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 8
 cannanttyc tctggtacgc ctacgt 26

<210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g o t

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t

15 <400> 9
 ctytgdank cctacgtggg cggc 24

20 <210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g o t

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t

40 <400> 10
 aarccnranc ggtgcagat ggagggc 27

45 <210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador

55 <400> 11
 gtraarctra ccttygacgg ctccc 26

<210> 12
 <211> 1164
 <212> ADN
 <213> *Vetiveria zizanoides*

<400> 12

ES 2 625 861 T3

ccaatgatgg tgggtgtcgtc gccagccgct gcgaaggggg tcctcaagac gaacgacatc 60
 accttcgccc acaggtacac caacgccacc atcgggcgcg tcacctcca tggcgaggac 120
 atgggtgttcg tgccctacgg cgagcgggtg cgccagctcc gcaaaatcta catgctggag 180
 ctgctcagcg ccgcccgggt tcagtcattc cgccacatcc gggaggagga ggtggcgcg 240
 cttgtgggga acatogccac gtctgtctgcc gccggcgaag ccatccacct caacaagatg 300
 gtctcagagt tcgtcaacga cacogtctgt acggaggcgg toggcagcgg gagcaagcac 360
 caggaagagt acctcagctc cctcagcgtg gccctccggc agacaatggg ggtagccctc 420
 gccgacctct tccogtcttc caagctcatg cagatgattg acacggcacc ccggaaggtg 480
 ctgcgagccc ggaacaacat ggtgcgcatc ctcgaggaaa tcatcaagga gaccaaggaa 540
 gccatggaat gcggcgacgg ccaggagaag gtggagggca tcctcgggtg gctgctgagg 600
 ctccagaagg aaggcagcac gccggtccc ctcaccaacg aggtcatcgt tacgggtgatg 660
 tttgacatgt ttggcgccgg cagcgacacc tcatogacct tgctgacctg gtgcatgaca 720
 gagctagtcc ggtcacgcc gacaatggcc aaagtgaag atgaggtgcg acaggccatc 780
 aaaggggaaga agcagagccc catcgtcatc actgaagacg acctcaaggg gctcacctac 840
 ctcaagcaag tgatcaagga gaccctgagg atgcacactc ctttgcccct cctgcttcca 900
 aggaagtgtc gtgagacgtg caaggctcatg ggctacgaca ttcccaaggg cacggtagtg 960
 ttcgctaacg cgtgggcaat ctgcagggat cctaagtatt gggaggattc agaggagttc 1020
 aagccagagc gattogacaa gagcagtttg gactacaagg gaacaaactt tgagtacctg 1080
 ccgtttggat ctggccgtcg gatttgtcct ggcataaatc ttgggttggg taacgctgaa 1140
 atcgcgctag ccagccttct atat 1164

5 <210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 13
 gctaaccggt gggcaatctg caggg 25

15 <210> 14
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 14
 gftcaagcca gagcgattcg acaagagc 28

25 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 625 861 T3

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 15
 gactgaacct gggcgcgct gag 23

10 <210> 16
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

20 <400> 16
 cgaacacat gtcctcgcca tggaag 26

<210> 17
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Vetiveria zizanoides*

<400> 17

atcctaagta ttggaggat tcagaggagt tcaagccaga gcgattcgac aagagcagtt 60
 tggactacaa ggaacaaac tttgagtacc tgccgtttgg atctggcogt cggatttgc 120
 ctggcataaa tcttgggttg ggtaacgctg aaatcgogct agccagcctt ctatatcaact 180
 ttgactggaa gctgcctgat ggaatggaac ccaaggacgt aaatatgga gaggctcaag 240
 ggtagtcgc cagtaagaaa acaaacttaa cctgtaccc tggtactcgc attgcccggg 300
 ccggttttaa ttaatgcaa aataagggcg ctggctgggc acaataatgt ggtgcccga 360
 ctagtatgca actagtactg gatagatgga aaatactgta agtggcagga tcggaatgat 420
 gaattgatac gtatatatgc caactatgta ttocggctag ctgccatata ttttgtaaaa 480
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 500

25

30 <210> 18
 <211> 426
 <212> ADN
 <213> *Vetiveria zizanoides*

<400> 18

tagaattcag cggccgctga attctacaca tccaatctca aagataatct agcagggaaa 60
 ggaacttgc cactocacta tggaggacac taagatcctc gtcgccgtgg tgcctgtgtg 120
 cgtgcttgtt gtgtcctct ccaagctcaa gaagtccctg ctgctcggcg cgaaccgaa 180
 gcttaacctg ccccagggc catggacgct gccggtgatc ggcagcctcc accacgtgat 240
 tacctacccc aacctccaac gtgcactgog cgtgctggcg cagaagtacg ggccagtgat 300
 gatgttcag ctccggcaggg tgccaatgat ggtggtgtcg tcgccagccg ccgcccagga 360
 ggtcctcaag acgaacgacc tcaccttcgc cgacaggtac accaacgcta ccatcggcgc 420
 gctcac 426

35 <210> 19

ES 2 625 861 T3

<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 19
atgaggata ctaagatcct cgtcgcc 27

10 <210> 20
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 20
attaattaa accggccggc gcaatg 26

<210> 21
<211> 1542
<212> ADN
25 <213> *Vetiveria zizanoides*

<400> 21

ES 2 625 861 T3

atggaggata ctaagatcct cgtcgccgcg gtgtccgtgt gcgtgcttct tgtggtcctc 60
 tccaagctca agaagtccct gctgcccggc gcgaaaccaa agcttaacct gccccgggg 120
 ccatggacgc tgccggatgat cggcagcctc caccacgtga tcacctacc caacctccac 180
 cgcgcaactgc acgggctggc gcagaagtac ggtccggatga tgatgttccg gctcggcgag 240
 gtgccaatga tgggtggtgtc gtcgccggcg gccgogcagg aggcctcaa gacgaacgac 300
 atcgccctcg ccgaccggtc caccaacgcc accatcggcg cgtcacctt ccatggcgag 360
 gacatggcgt tcgcgcccta cggcgagcgg tggcgccagc tccgcaagat ctgcgtgctg 420
 gagctgctca gcgccgcccg ggtgcagtcg ttccgccaca tccggggcga ggaggtgctg 480
 cggctcgtcg ggaaactcgc cgggtccgcc gccgcggcg aagctgtcca cctcaacaag 540
 attgtcgcga agttcgtcaa cgacaccatc gtgagggagg cggtcggcag cgggagcaag 600
 caccaggacg agtacctcaa ctccatcgac gtagccctcc ggagacaat gggggtcggc 660
 ctcgccgacc tcttccgctc ttcgaggctc atacagatga ttgacaaggc accccggaag 720
 gtgctcgcgg cccggaacaa catggagcgc atcctcgagg aatcatcaa cgagaccaag 780
 gaagccatgg accgcggcga cggccagaag aaggtggagg gcatcctcgg tgtcctgctg 840
 aggctccaga aggaaggcag cagccggctc ccgctacca acgaggtcat cgttacgggtg 900
 atgtttgaca tgtttggcgc tggcagcgc acctcgtcga ccttctgac ctggtgcatg 960
 atggagctag tccggtcacc gccgacgatg gccaaagtgc aagacgaggt gcgagaggcc 1020
 ttcaaaggga agaaggagag caccatcctc actgaagacg acctcaaggg gctcacctac 1080
 ctcaagcaag tgatcaagga ggccctgagg atgcaccctc cggtgccctt cctgcttcca 1140
 aggaagtgtc gcgagacgtg caaggctatg ggctacgaca ttcccaaggg cacggtagtg 1200
 ttcgctaacg catgggcaat cggcagggat cccaagtatt gggaggatcc agaggagttc 1260
 aagccagagc gattcgacaa gagcaatgtg gactacaagg gaacaaactt tgagtacctg 1320
 ccgtttgat ctggccgtcg gatttgtccc ggcataaacc taggcttgtg caacattgag 1380
 ctcgcggttg cgagccttct atatcacttt gactggaagc tgccgaacgg aatggagccc 1440
 aaagacatag atatgggaga ggctcaaggg ttaatcgcca gtaagaaac aaacctaacc 1500
 ctgcaccctg tgactcgcat tgcgccggcc ggttttaatt aa 1542

<210> 22
 <211> 1545
 <212> ADN
 <213> *Vetiveria zizanoides*

 <400> 22

5

ES 2 625 861 T3

atggaggata ctaagatcct cgtcgccgtg gtgtccgtgt gcgtgcttgt tgtggctctc 60
 tccaagctca agaagtcctt gctgctcggc gcgaaaccga agcttaacct gccccaggg 120

 ccatggacgc tgccggtgat cggcagcctc caccacgtga ttacctacco caacctocaa 180
 cgtgcactgc gcgtgctggc gcagaagtac gggccagtga tgatgttoca gctcggcgag 240
 gtgccaatga tgggtggtgc gtcgccagcc gccggcgagg aggtcctcaa gacgaacgac 300
 ctcaacctcg ccgacaggta caccaacgct accatcggcg cgtcacctt ccatggcgag 360
 gacatggtgt tcgccccta cggcgagcgg tggcgccagc tccgcaaat ctgcatgcta 420
 gagctgctca gcgccgccg ggttcagtgc ttccgccaca tccgggagga ggaggtggcg 480
 cggcttgtgg ggaacatgc cacgtctgct gccgccggcg aagccgtoca cctcaacaag 540
 atggtctoga ggttcgtcaa cgacaccgtc gtgagggagg cgtcggcag cgggagcaag 600
 caccaggaag agtacctcag ctccctcaac gtagccctcc gccagacaat ggggtagcc 660
 gtcgccgacc tcttcccgtc ttccaggctc atgcagatga ttgacacggc accccggaag 720
 gtgctcgcag cccggaacaa catggtgcgc atcctcgagg aatcatcaa ggagaccaag 780
 gaagccatgg aatgcggcga cggccaggag aaggtggagg gcatcctcgg tgtgctgctg 840
 aggtccaga aggaaggcag cacgccggtc ccgctcacca acgaggtcat cgttacggtg 900
 atgtttgaca tgtttggcgc cggcagcgc acctcatcga ccttctgac ctggtgcatg 960
 acagagctag tccggtcacc gccgacaatg gccaaagtgc aagatgaggt gccacaggcc 1020
 atcaaagggg agaagcagag ccccatcgtc atcactgaag acgacctcaa ggggctcacc 1080
 tacctcaagc aagtgatcaa ggagaccctg aggatgcaca ctcccttgcc cctcctgctt 1140
 ccaaggaagt gtcgtgagac gtgcaaggtc atgggctacg acattcccaa gggcacggta 1200
 gtgttcgcta acgcgtgggc aatctgcagg gatcctaagt attgggagga ttcagaggag 1260
 ttcaagccag agcattcga caagagcagt ttggactaca aggaacaaa ctttgagtac 1320
 ctgocgttt gactcggccg tcggatttgt cctggcataa atcttgggtt gggtaacgct 1380
 gaaatcgcgc tagccagcct tctatatcac tttgactgga agctacctga tggaatggaa 1440
 cccaaggacg taaatatgga agaggctcaa gggtagtcg ccagtaagaa aacaaactta 1500
 accctgtacc ctgttactcg cattgcgccg gccggtttta attaa 1545

<210> 23
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> *Vetiveria zizanoides*

<400> 23

ES 2 625 861 T3

Met Glu Asp Thr Lys Ile Leu Val Ala Ala Val Ser Val Cys Val Leu
1 5 10 15

Leu Val Val Leu Ser Lys Leu Lys Lys Ser Leu Leu Pro Gly Ala Lys
20 25 30

ES 2 625 861 T3

Pro Lys Leu Asn Leu Pro Pro Gly Pro Trp Thr Leu Pro Val Ile Gly
 35 40 45

Ser Leu His His Val Ile Thr Tyr Pro Asn Leu His Arg Ala Leu His
 50 55 60

Gly Leu Ala Gln Lys Tyr Gly Pro Val Met Met Phe Arg Leu Gly Glu
 65 70 75 80

Val Pro Met Met Val Val Ser Ser Pro Ala Ala Ala Gln Glu Ala Leu
 85 90 95

Lys Thr Asn Asp Ile Ala Phe Ala Asp Arg Tyr Thr Asn Ala Thr Ile
 100 105 110

Gly Ala Leu Thr Phe His Gly Glu Asp Met Ala Phe Ala Pro Tyr Gly
 115 120 125

Glu Arg Trp Arg Gln Leu Arg Lys Ile Cys Val Leu Glu Leu Leu Ser
 130 135 140

Ala Ala Arg Val Gln Ser Phe Arg His Ile Arg Ala Glu Glu Val Ser
 145 150 155 160

Arg Leu Val Gly Lys Leu Ala Ala Ser Ala Ala Ala Gly Glu Ala Val
 165 170 175

His Leu Asn Lys Ile Val Ala Lys Phe Val Asn Asp Thr Ile Val Arg
 180 185 190

Glu Ala Val Gly Ser Gly Ser Lys His Gln Asp Glu Tyr Leu Asn Ser
 195 200 205

Ile Asp Val Ala Leu Arg Gln Thr Met Gly Val Ala Leu Ala Asp Leu
 210 215 220

Phe Pro Ser Ser Arg Leu Ile Gln Met Ile Asp Thr Ala Pro Arg Lys
 225 230 235 240

Val Leu Ala Ala Arg Asn Asn Met Glu Arg Ile Leu Glu Glu Ile Ile
 245 250 255

Asn Glu Thr Lys Glu Ala Met Asp Arg Gly Asp Gly Gln Lys Lys Val
 260 265 270

Glu Gly Ile Leu Gly Val Leu Leu Arg Leu Gln Lys Glu Gly Ser Thr

ES 2 625 861 T3

275		280		285
Pro Val Pro Leu Thr Asn Glu Val Ile Val Thr Val Met Phe Asp Met	290	295		300
Phe Gly Ala Gly Ser Asp Thr Ser Ser Thr Leu Leu Thr Trp Cys Met	305	310		320
Met Glu Leu Val Arg Ser Pro Pro Thr Met Ala Lys Val Gln Asp Glu		325		335
Val Arg Glu Ala Phe Lys Gly Lys Lys Glu Ser Thr Ile Ile Thr Glu		340		350
Asp Asp Leu Lys Gly Leu Thr Tyr Leu Lys Gln Val Ile Lys Glu Ala		355		365
Leu Arg Met His Pro Pro Val Pro Leu Leu Leu Pro Arg Lys Cys Arg	370	375		380
Glu Thr Cys Lys Val Met Gly Tyr Asp Ile Pro Lys Gly Thr Val Val	385	390		400
Phe Ala Asn Ala Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Lys Tyr Trp Glu Asp		405		415
Pro Glu Glu Phe Lys Pro Glu Arg Phe Asp Lys Ser Asn Val Asp Tyr		420		430
Lys Gly Thr Asn Phe Glu Tyr Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ile		435		445
Cys Pro Gly Ile Asn Leu Gly Leu Cys Asn Ile Glu Leu Ala Leu Ala	450	455		460
Ser Leu Leu Tyr His Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asn Gly Met Glu Pro	465	470		480
Lys Asp Ile Asp Met Gly Glu Ala Gln Gly Leu Ile Ala Ser Lys Lys		485		495
Thr Asn Leu Thr Leu His Pro Val Thr Arg Ile Ala Pro Ala Gly Phe		500		510
Asn				

<210> 24
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> *Vetiveria zizanoides*

5

<400> 24

Met Glu Asp Thr Lys Ile Leu Val Ala Val Val Ser Val Cys Val Leu
 1 5 10 15

Val Val Val Leu Ser Lys Leu Lys Lys Ser Leu Leu Leu Gly Ala Lys
 20 25 30

Pro Lys Leu Asn Leu Pro Pro Gly Pro Trp Thr Leu Pro Val Ile Gly
 35 40 45

Ser Leu His His Val Ile Thr Tyr Pro Asn Leu Gln Arg Ala Leu Arg
 50 55 60

Val Leu Ala Gln Lys Tyr Gly Pro Val Met Met Phe Gln Leu Gly Glu
 65 70 75 80

Val Pro Met Met Val Val Ser Ser Pro Ala Ala Ala Gln Glu Val Leu
 85 90 95

Lys Thr Asn Asp Leu Thr Phe Ala Asp Arg Tyr Thr Asn Ala Thr Ile
 100 105 110

Gly Ala Leu Thr Phe His Gly Glu Asp Met Val Phe Ala Pro Tyr Gly
 115 120 125

Glu Arg Trp Arg Gln Leu Arg Lys Ile Cys Met Leu Glu Leu Leu Ser
 130 135 140

Ala Ala Arg Val Gln Ser Phe Arg His Ile Arg Glu Glu Glu Val Ala
 145 150 155 160

Arg Leu Val Gly Asn Ile Ala Thr Ser Ala Ala Ala Gly Glu Ala Val
 165 170 175

His Leu Asn Lys Met Val Ser Arg Phe Val Asn Asp Thr Val Val Arg
 180 185 190

Glu Ala Val Gly Ser Gly Ser Lys His Gln Glu Glu Tyr Leu Ser Ser
 195 200 205

Leu Asn Val Ala Leu Arg Gln Thr Met Gly Val Ala Val Ala Asp Leu
 210 215 220

ES 2 625 861 T3

Phe Pro Ser Ser Arg Leu Met Gln Met Ile Asp Thr Ala Pro Arg Lys
 225 230 235 240

Val Leu Ala Ala Arg Asn Asn Met Val Arg Ile Leu Glu Glu Ile Ile
 245 250 255

Lys Glu Thr Lys Glu Ala Met Glu Cys Gly Asp Gly Gln Glu Lys Val
 260 265 270

Glu Gly Ile Leu Gly Val Leu Leu Arg Leu Gln Lys Glu Gly Ser Thr
 275 280 285

Pro Val Pro Leu Thr Asn Glu Val Ile Val Thr Val Met Phe Asp Met
 290 295 300

Phe Gly Ala Gly Ser Asp Thr Ser Ser Thr Leu Leu Thr Trp Cys Met
 305 310 315 320

Thr Glu Leu Val Arg Ser Pro Pro Thr Met Ala Lys Val Gln Asp Glu
 325 330 335

Val Arg Gln Ala Ile Lys Gly Lys Lys Gln Ser Pro Ile Val Ile Thr
 340 345 350

Glu Asp Asp Leu Lys Gly Leu Thr Tyr Leu Lys Gln Val Ile Lys Glu
 355 360 365

Thr Leu Arg Met His Thr Pro Leu Pro Leu Leu Leu Pro Arg Lys Cys
 370 375 380

Arg Glu Thr Cys Lys Val Met Gly Tyr Asp Ile Pro Lys Gly Thr Val
 385 390 395 400

Val Phe Ala Asn Ala Trp Ala Ile Cys Arg Asp Pro Lys Tyr Trp Glu
 405 410 415

Asp Ser Glu Glu Phe Lys Pro Glu Arg Phe Asp Lys Ser Ser Leu Asp
 420 425 430

Tyr Lys Gly Thr Asn Phe Glu Tyr Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg
 435 440 445

Ile Cys Pro Gly Ile Asn Leu Gly Leu Gly Asn Ala Glu Ile Ala Leu
 450 455 460

Ala Ser Leu Leu Tyr His Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asp Gly Met Glu
 465 470 475 480

ES 2 625 861 T3

Pro Lys Asp Val Asn Met Glu Glu Ala Gln Gly Leu Val Ala Ser Lys
 485 490 495

Lys Thr Asn Leu Thr Leu Tyr Pro Val Thr Arg Ile Ala Pro Ala Gly
 500 505 510

Phe Asn

5 <210> 25
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 25
 tactgacata tggctctggt attagcag 28

15 <210> 26
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 26
 ggcagcgtcc atgggcccg ggggaacttc ccttgg 36

25 <210> 27
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 27
 gaagttcccc ccgggcccat ggacgctgcc ggtgatcggc ag 42

35 <210> 28
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador

<400> 28
 aaagaaaagc ttaattaaaa ccggccggcg caatgcgag 39

45 <210> 29
 <211> 2039
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia modificada

55 <400> 29

ES 2 625 861 T3

ccatgggcac ggatagcctg agcgacgacg tagtactggt catcgccacg accagcctgg 60
cgctgggtgc aggttttgtc gtocctgctgt ggaaaaagac gaccgccgat cgtagcgggtg 120
agctgaaacc gttgatgatc ccgaagtctt tgatggcaaa agacgaggat gacgatctgg 180
atctgggtag cggtaaaacg cgtgtcagca ttttcttcgg tactcagacg ggcacggcgg 240
agggttttgc caaggcgtg agcgaagaga ttaaagcacg ctatgaaaaa gcgcggtta 300
aagtgatcga tctggatgac tacgcggcag acgacgatca gtacgaagaa aagctgaaga 360
aagaaaccct ggcattcttc tgcggttgcga cctatggtga cggtgaaccg accgacaatg 420
ctgcccgtt ttacaagtgg ttcacggaag agaatgaacg tgacattaa ctgcagcaat 480
tggcgtacgg tgtgtttgcg ctgggcaacc gtcaatatga acacttcaat aagattggtta 540
ttgttctgga cgaagagttg tgtaagaagg gcgctaagcg cctgatcgag gttggtttgg 600
gtgatgatga ccaatccatc gaagatgact tcaacgcttg gaaagagtcc ttgtggagcg 660
aactggataa actgctgaag gacgaggacg ataaaagcgt cgcgaccccg tacaccgccg 720
ttattccgga gtatcgtgtc gtcaccacg acccgcgttt tactacgcaa aagtcgatgg 780
agagcaatgt ggcgaatggt aacaccacca tcgacatcca tcatccgtgt cgtgttgatg 840
tggccgtgca aaaagaactg catactcatg agagcgaccg cagctgtatc cacctggagt 900
ttgatattag ccgcacgggc atcacctatg aaaccggcga tcatgttggg gtctacgcgg 960
agaatcacgt cgagattgtg gaagaggcgg gcaagctgct gggccactcg ctggatctgg 1020
ttttcagcat tcatgcggat aaagaggacg gtagccctct ggaaagcgt gtgccacctc 1080
cgttcccagg cccgtgcacc ctgggcaccg gtctggcggc ttatgcggac ctgctgaacc 1140
cgccacgtaa gagcgcgtg gttgcgctgg cggcgtatgc gaccgagccg tctgaggcag 1200
agaaactgaa acacctgacc agcccggatg gtaaggacga gtacagccag tggattgtgg 1260
cgtccaacg tagcctgctg gaagtcatgg cagccttccc gtcogctaaa ccgccgctgg 1320
gogtgttttt cgcagcaatt gtcocgcgcc tgcaaccgcg ttattacagc atcagcagca 1380
gcccgcgtct ggcaccgagc cgcgtgcacg ttacgtctgc actggtctac ggtccgacct 1440
cgaccggccg tattcacaag ggtgtgtggt ctacttggat gaaaaacgcg gttccggccg 1500
aaaagtccca cgaatgcagc ggtgccccga tctttattcg tgcgagcaat ttcaagttgc 1560
cttccaatcc gagcaccctg atcgtcatgg ttggtccggg tacgggcctg gcgccgttct 1620
gcggtttcct gcaggagcgt atggcactga aagaggatgg cgaagagctg gtagcagct 1680
tgctgttttt cggttgcgcg aaccgtcaga tggatttcat ctacgaggac gaggttgaaca 1740
actttgtgga ccaaggtggt atcagcgaac tgatcatggc gttttctcgc gaagtgcaac 1800
agaaagagta cgttcagcac aaaatgatgg agaaggcagc acaggtgtgg gatttgatta 1860
aagaagaagg ctacctgtac gtgtgcccgc acgccaaggg tatggccgtg gacgtgcacc 1920
gtacgctgca taccatcgtt caggagcaag agggcgtag ctccagcgag gcggaggcaa 1980
ttgtaagaa actgcagacc gagggccgct atctgcgtga cgtctggtaa tgaggatcc 2039

ES 2 625 861 T3

<210> 30
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Espaciador
 <400> 30
 10 agctgtcgac taactttaag aaggagatata 31
 <210> 31
 <211> 67
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 31
 ggtttaatt aagctgtcga ctaacttaa gaaggagata tatccatggg cacggatagc 60
 ctgagcg 67
 <210> 32
 <211> 55
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 32
 tatcatcgat aagctgaatt ctaagcttc attaccagac gtcacgcaga tagcg 55
 <210> 33
 <211> 49
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 33
 tctggtaatg aagcttaaga aggagatata aatatggcta ctacggctg 49
 <210> 34
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 34
 55 tcgataagct gaattctcat taaaccggaa tcagggtgac atacaag 47
 <210> 35
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia modificada

ES 2 625 861 T3

<400> 35

Met Ala Leu Leu Leu Ala Val Phe Trp Ser Ala Leu Ile Ile Leu Val
 1 5 10 15

Val Thr Tyr Thr Ile Ser Leu Leu Ile Asn Gln Trp Arg Lys Pro Lys
 20 25 30

Pro Gln Gly Lys Phe Pro Pro Gly Pro Trp Thr Leu Pro Val Ile Gly
 35 40 45

Ser Leu His His Val Ile Thr Tyr Pro Asn Leu His Arg Ala Leu His
 50 55 60

Gly Leu Ala Gln Lys Tyr Gly Pro Val Met Met Phe Arg Leu Gly Glu
 65 70 75 80

Val Pro Met Met Val Val Ser Ser Pro Ala Ala Ala Gln Glu Ala Leu
 85 90 95

Lys Thr Asn Asp Ile Ala Phe Ala Asp Arg Tyr Thr Asn Ala Thr Ile
 100 105 110

Gly Ala Leu Thr Phe His Gly Glu Asp Met Ala Phe Ala Pro Tyr Gly
 115 120 125

Glu Arg Trp Arg Gln Leu Arg Lys Ile Cys Val Leu Glu Leu Leu Ser
 130 135 140

Ala Ala Arg Val Gln Ser Phe Arg His Ile Arg Ala Glu Glu Val Ser
 145 150 155 160

Arg Leu Val Gly Lys Leu Ala Ala Ser Ala Ala Ala Gly Glu Ala Val

Pro Glu Glu Phe Lys Pro Glu Arg Phe Asp Lys Ser Asn Val Asp Tyr
 420 425 430

Lys Gly Thr Asn Phe Glu Tyr Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ile
 435 440 445

Cys Pro Gly Ile Asn Leu Gly Leu Cys Asn Ile Glu Leu Ala Leu Ala
 450 455 460

Ser Leu Leu Tyr His Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asn Gly Met Glu Pro
 465 470 475 480

Lys Asp Ile Asp Met Gly Glu Ala Gln Gly Leu Ile Ala Ser Lys Lys
 485 490 495

Thr Asn Leu Thr Leu His Pro Val Thr Arg Ile Ala Pro Ala Gly Phe
 500 505 510

Asn

- <210> 36
- <211> 514
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia modificada
- <400> 36

ES 2 625 861 T3

Met Ala Leu Leu Leu Ala Val Phe Trp Ser Ala Leu Ile Ile Leu Val
 1 5 10 15

Val Thr Tyr Thr Ile Ser Leu Leu Ile Asn Gln Trp Arg Lys Pro Lys
 20 25 30

Pro Gln Gly Lys Phe Pro Pro Gly Pro Trp Thr Leu Pro Val Ile Gly
 35 40 45

Ser Leu His His Val Ile Thr Tyr Pro Asn Leu Gln Arg Ala Leu Arg
 50 55 60

Val Leu Ala Gln Lys Tyr Gly Pro Val Met Met Phe Gln Leu Gly Glu
 65 70 75 80

Val Pro Met Met Val Val Ser Ser Pro Ala Ala Ala Gln Glu Val Leu
 85 90 95

Lys Thr Asn Asp Leu Thr Phe Ala Asp Arg Tyr Thr Asn Ala Thr Ile

ES 2 625 861 T3

Glu Asp Asp Leu Lys Gly Leu Thr Tyr Leu Lys Gln Val Ile Lys Glu
 355 360 365

Thr Leu Arg Met His Thr Pro Leu Pro Leu Leu Leu Pro Arg Lys Cys
 370 375 380

Arg Glu Thr Cys Lys Val Met Gly Tyr Asp Ile Pro Lys Gly Thr Val
 385 390 395 400

Val Phe Ala Asn Ala Trp Ala Ile Cys Arg Asp Pro Lys Tyr Trp Glu
 405 410 415

Asp Ser Glu Glu Phe Lys Pro Glu Arg Phe Asp Lys Ser Ser Leu Asp
 420 425 430

Tyr Lys Gly Thr Asn Phe Glu Tyr Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg
 435 440 445

Ile Cys Pro Gly Ile Asn Leu Gly Leu Gly Asn Ala Glu Ile Ala Leu
 450 455 460

Ala Ser Leu Leu Tyr His Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asp Gly Met Glu
 465 470 475 480

Pro Lys Asp Val Asn Met Glu Glu Ala Gln Gly Leu Val Ala Ser Lys
 485 490 495

Lys Thr Asn Leu Thr Leu Tyr Pro Val Thr Arg Ile Ala Pro Ala Gly
 500 505 510

Phe Asn

<210> 37
 <211> 1542
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia modificada

<400> 37

5

10

ES 2 625 861 T3

atggctctgt tattagcagt tttttggtcg gcgcttataa tcctcgtagt aacctacacc 60
 atatccctcc taatcaacca atggcgaaaa ccgaaacccc aaggaagtt cccccgggc 120
 ccatggacgc tgccggtgat oggcagcctc caccacgtga tcacctacce caacctccac 180
 cgcgactgc acgggctggc gcagaagtac ggtccggtga tgatgttccg gctcggcgag 240
 gtgccaatga tgggtggtgc gtcgccggcg gccgcgagc aggcctcaa gacgaacgac 300
 atcgcttcg ccgaccggtc caccaacgcc accatcggcg cgctcacctt ccatggcgag 360
 gacatggcgt tcgcgcccta cggcgagcgg tggcgccagc tccgcaagat ctgctgctg 420
 gagctgctca gcgcccggcg ggtgcagtcg ttccgccaca tccgggcgga ggaggtgctg 480
 cggctcgtcg ggaaactcgc cgcgtccgcc gccgcggcg aagctgtcca cctcaacaag 540
 attgtcgcga agttcgtcaa cgacaccatc gtgagggagg cggtcggcag cgggagcaag 600
 caccaggacg agtacctcaa ctccatcgac gtagccctcc ggcagacaat gggggtcggc 660
 ctgcgcgacc tcttccgctc ttcgaggctc atacagatga ttgacacggc accccggaag 720
 gtgctcgcgg cccggaacaa catggagcgc atcctcgagg aatcatcaa cgagaccaag 780
 gaagccatgg accgcgcgca cggccagaag aaggtggagg gcatcctcgg tgtcctgctg 840
 aggtccaga aggaaggcag cagccggctc ccgctacca acgaggtcat cgttacggtg 900
 atgtttgaca tgtttggcgc tggcagcgc acctcgtcga ccttctgac ctggtgcatg 960
 atggagctag tccggtcacc gccgacgatg gccaaagtgc aagacgaggt gcgagagccc 1020
 ttcaaagga agaaggagag caccatcacc actgaagacg acctcaaggg gctcacctac 1080
 ctcaagcaag tgatcaagga ggccctgagg atgcaccctc cggtgcccct cctgcttcca 1140
 aggaagtgtc gcgagacgtg caaggctatg ggctacgaca ttcccaggc cacggtagtg 1200
 ttcgctaacg catgggcaat cggcagggat cccaagtatt gggaggatcc agaggagttc 1260
 aagccagacg gattcgacaa gagcaatgtg gactacaagg gaacaaactt tgagtacctg 1320
 ccgtttgat ctggccgctc gatttgtccc ggcataaacc taggcttgtg caacattgag 1380
 ctcgcgttgg cgagccttct atatcacttt gactggaagc tgccgaacgg aatggagccc 1440
 aaagacatag atatgggaga ggctcaaggg ttaatcgcca gtaagaaaac aaacctaac 1500
 ctgcaccctg tgactcgcat tgcgccggcc ggttttaatt aa 1542

<210> 38
 <211> 1545
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia modificada

10

<400> 38

ES 2 625 861 T3

atggctctgt tattagcagt tttttggtcg gcgcttataa tcctogtagt aacctacacc	60
atatccctcc taatcaacca atggcgaaaa ccgaaacccc aagggaggtt cccccgggc	120
ccatggacgc tgccggtgat cggcagcctc caccacgtga ttaoctaccc caacctccaa	180
cgtgcactgc gcgtgctggc gcagaagtac gggccagtga tgatgttcca gctcggcgag	240
gtgccaatga tgggtggtgc gtcgccagcc gccgcgcagg aggtcctcaa gacgaacgac	300
ctcaccttcg ccgacaggta caccaacgct accatcggcg cgctcacctt ccatggcgag	360
gacatggtgt tcgcgcctta cggcgagcgg tggcgccagc tccgcaaaat ctgcatgcta	420
gagctgctca gcgccgcccg ggttcagtcg ttccgccaca tccgggagga ggaggtggcg	480
cggcttgtgg ggaacatcgc cacgtctgct gccgcggcg aagccgtcca cctcaacaag	540
atggtctcga ggttcgtcaa cgacaccgtc gtgagggagg cggtcggcag cgggagcaag	600
caccaggaag agtacctcag ctccctcaac gtagccctcc ggcagacaat ggggtagcc	660
gtcgccgacc tcttcccgtc ttccaggctc atgcagatga ttgacacggc accccggaag	720
gtgctcgcag cccggaacaa catggtgcgc atcctcgagg aaatcatcaa ggagaccaag	780
gaagccatgg aatgcggcga cggccaggag aaggtggagg gcatcctcgg tgtgctgctg	840
aggctccaga aggaaggcag cacgccggtc ccgctcacca acgaggtcat cgttacggtg	900
atgtttgaca tgtttgccgc cggcagcgc acctcatcga ccttgctgac ctggtgcatg	960
acagagctag tccggtcacc gccgacaat gccaaagtgc aagatgaggt gcgacaggcc	1020
atcaaagga agaagcagag ccccatcgtc atcactgaag acgacctcaa ggggctcacc	1080
tacctcaagc aagtgatcaa ggagaccctg aggatgcaca ctcccttgcc cctcctgctt	1140
ccaaggaagt gtcgtgagac gtgcaaggtc atgggctacg acattcccaa gggcacggta	1200
gtgttcgcta acgcgtgggc aatctgcagg gatcctaagt attgggagga ttcagaggag	1260
ttcaagccag agcgattcga caagagcagt ttggactaca agggaacaaa ctttgagtac	1320
ctgccgtttg gatctggccg tcggatttgt cctggcataa atcttgggtt gggtaacgct	1380
gaaatcgcgc tagccagcct tctatatcac tttgactgga agctacctga tggaatggaa	1440
cccaaggacg taaatatgga agaggctcaa gggttagtcg ccagtaagaa aacaaactta	1500
accctgtacc ctgttactcg cattgcgccg gccggtttta attaa	1545

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos en un 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o 2 y que tiene una actividad de citocromo P450 **caracterizado porque** el polipéptido es capaz de oxidar al menos un compuesto de terpeno seleccionado entre monoterpenos y sesquiterpenos mono o policíclicos.
- 5 2. El polipéptido de la reivindicación 1, **caracterizado porque** el monoterpeno o sesquiterpeno mono o policíclico comprende al menos un grupo metilo como sustituyente en una porción cíclica.
3. El polipéptido de la reivindicación 2, **caracterizado porque** el monoterpeno o sesquiterpeno mono o policíclico se selecciona entre el grupo que consiste en zizaeno, alfa-cedreno, alfa-longipineno, alfa-funebreno, tujopseno, valenceno, beta-chamigreno, aloaromadendreno, alfa-neocloveno, isosativeno, ledeno, S-limoneno, alfa-humuleno, alfa-gurjuneno, alfa-pineno, beta-funebreno, R-limoneno y beta-pineno.
- 10 4. El polipéptido de la reivindicación 3, **caracterizado porque** el monoterpeno o sesquiterpeno mono o policíclico se selecciona entre el grupo que consiste en zizaeno, alfa-cedreno, alfa-funebreno, valenceno y tujopseno.
5. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. El ácido nucleico de la reivindicación 5, que comprende una secuencia de nucleótidos al menos en un 90 % idéntica, en su longitud completa, a la SEQ ID NO: 3, 4 o el complemento de las mismas.
- 15 7. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 en el que el vector está en la forma de un vector viral, un bacteriófago o un plásmido.
8. Un organismo o una célula hospedadores no humanos que comprenden al menos un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el organismo hospedador no humano es un procarionta, un hongo o un microorganismo.
- 20 9. El organismo hospedador no humano de la reivindicación 8, en el que dicho microorganismo es una bacteria o levadura.
10. El organismo hospedador no humano de la reivindicación 9, en el que dicha bacteria es *E. coli* y dicha levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
- 25 11. Una planta o célula vegetal que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7.
12. Un procedimiento para oxidar al menos un compuesto de terpeno que comprende:
- a) poner en contacto dicho compuesto de terpeno con al menos un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en presencia de una P450 reductasa (CPR);
- b) opcionalmente, aislar el terpeno oxidado producido en la etapa a).
- 30 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho compuesto de terpeno se selecciona entre monoterpenos y sesquiterpenos mono o policíclicos.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho compuesto de terpeno se selecciona entre el grupo que consiste en zizaeno, alfa-cedreno, alfa-longipineno, alfa-funebreno, tujopseno, valenceno, beta-chamigreno, aloaromadendreno, alfa-neocloveno, isosativeno, ledeno, S-limoneno, alfa-humuleno, alfa-gurjuneno, alfa-pineno, beta-funebreno, R-limoneno y beta-pineno.
- 35 15. El procedimiento de la reivindicación 14, **caracterizado porque** el compuesto de terpeno se selecciona entre el grupo que consiste en zizaeno, alfa-cedreno, alfa-funebreno, valenceno y tujopseno.

Figura 1

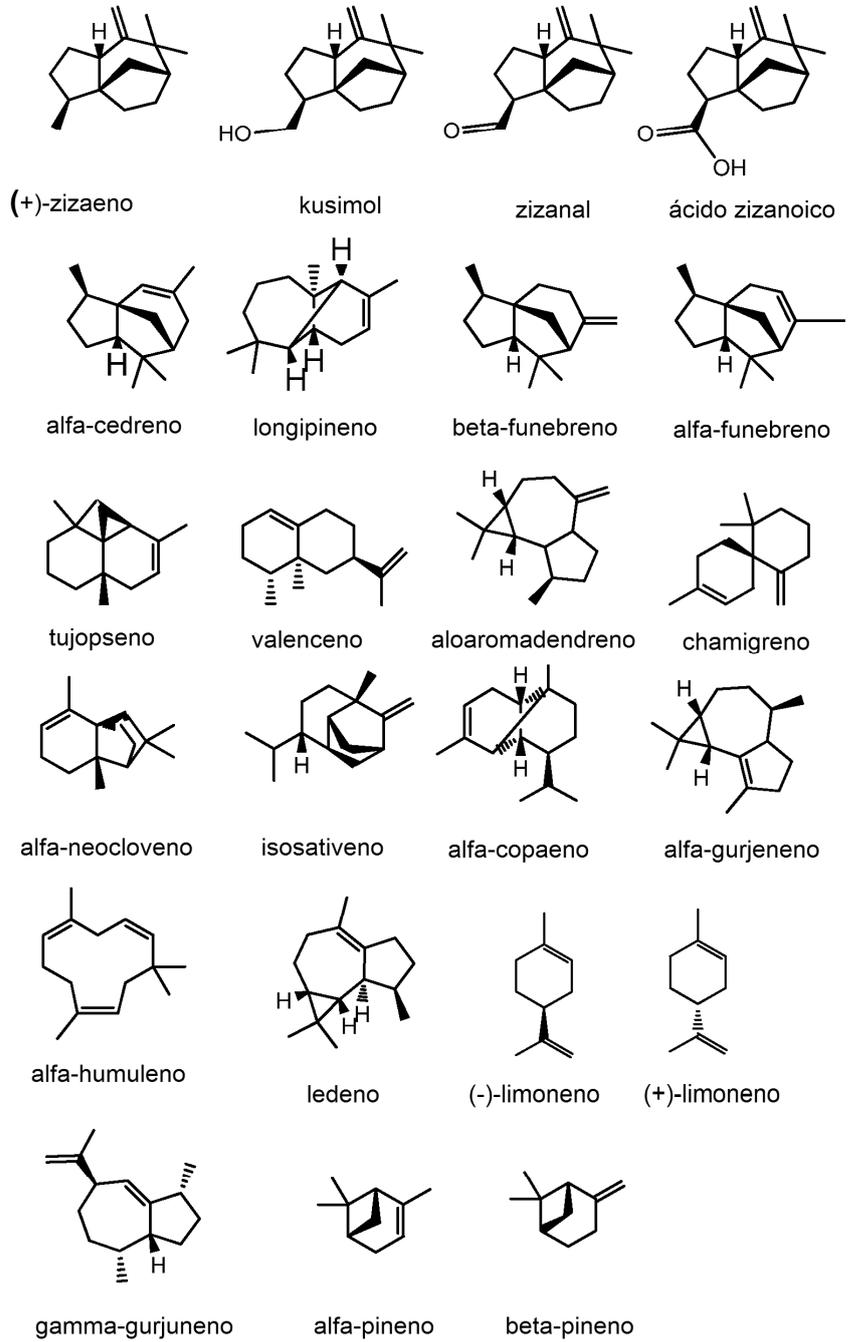


Figura 2

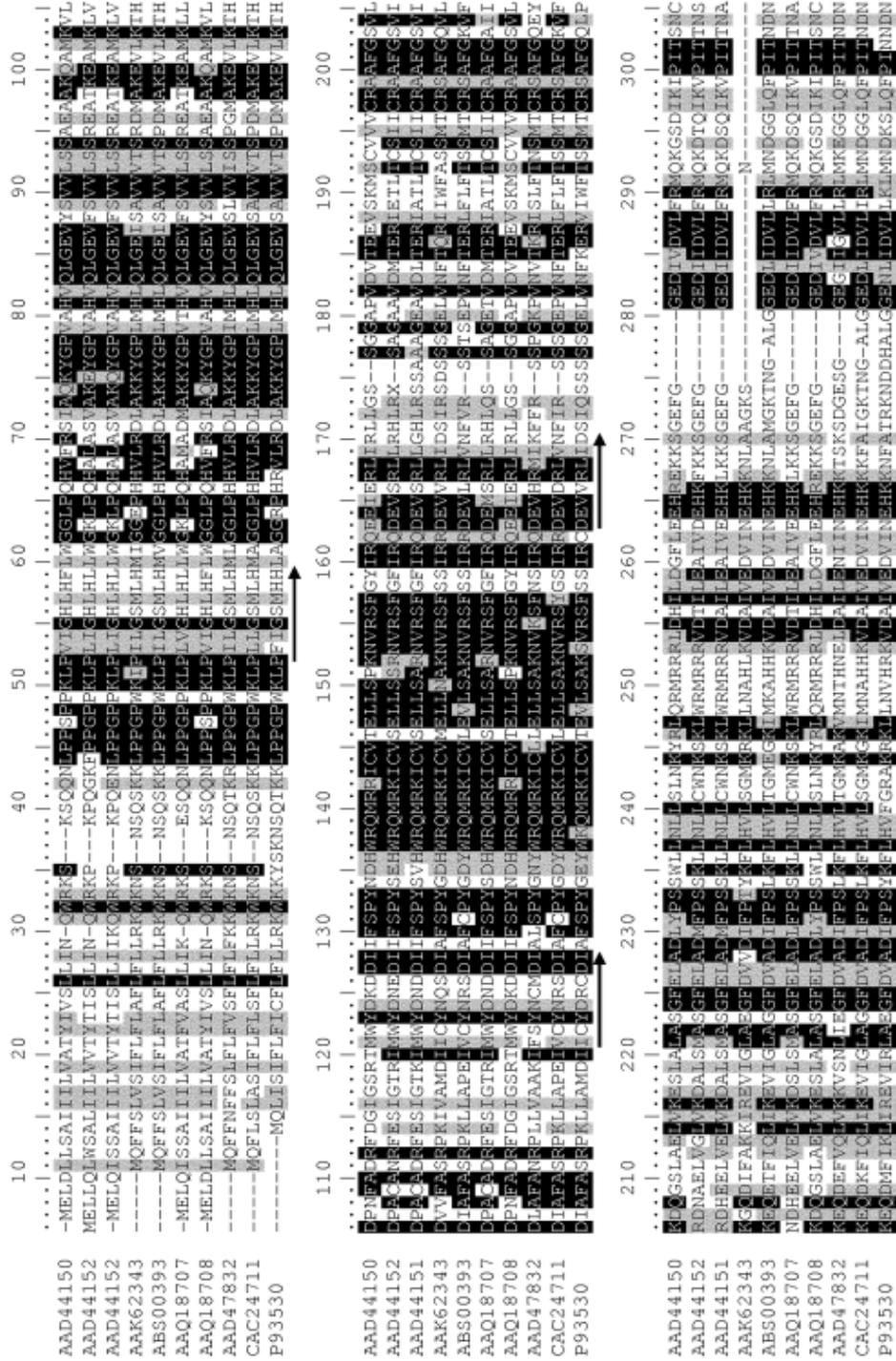


Figura 2 (continuación)

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
AAD44150	IKGHIFDIF	SAGAEISSTII	SWALSEL	MRNPAK	MAKVOAEV	REALKGT	VVDLS	VOELK	YRSVL	KETIR	IHPHP
AAD44152	IKAFIFDIF	SAGETSSTII	LWVZAL	MRNPAK	KAQAEV	RAALKKE	TNDVD	VOELK	MRSV	KETIR	MHPHP
AAD44151	IKAFIFDIF	SAGETSSTII	LWVMAE	MRNPE	MAKAEV	RAALKKE	TNDVD	VOELK	MRSV	KETIR	MHPHP
AAK62343	--GAL	EDMFA	AGETSSTII	VWMAE	MMKNS	FTKAQAEV	REAF	FRD	KVSD	ENDE	VELK
ABS00393	IK-I	IFDMF	AGETSSTII	LWVMAE	MRNPTI	LAKAEV	REAF	FRD	KVSD	ENDE	VELK
AAQ18708	IKAFIFDIF	SAGETSSTII	LWVMAE	MRNPAK	MAKVOAEV	REALKGT	VSVD	VOELK	MRSV	KETIR	MHPHP
AAQ18708	IKGHIFDIF	SAGAEISSTII	SWALSEL	MRNPAK	MAKVOAEV	REALKGT	VVDLS	VOELK	YRSVL	KETIR	IHPHP
AAD47832	IKALIS	DFGG	ETSSTII	INWAVE	MMKNS	FE	SKAEV	REIL	RG	ET	FE
CAC24711	IKALIFD	MF	AGETSSTII	VWAMV	MMKNS	VI	KAQAEV	REAF	FRD	KVSD	ENDE
P93530	IKALID	MF	AGETSSTII	VWAMV	EML	KNPR	LAKAEV	REAF	FRN	VTF	DE
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
AAD44150	IFENWVAI	GRDP	QY	WED	PE	FR	PERE	D	VSR	DE	
AAD44152	IMENWVMS	GRNPL	LY	WEK	PD	IF	WPERE	D	QVSK	DF	
AAD44151	IMENWVMS	GRNPL	LY	WEK	PE	IF	WPERE	D	QVSR	DF	
AAK62343	VMN	NVAI	GRDP	KY	WDD	AE	SE	K	PERE	D	
ABS00393	VMN	NVAI	GRDP	KY	WDD	AD	NE	K	PERE	D	
AAQ18707	IMENWVMS	GRNPL	LY	WEK	PE	IF	WPERE	D	QVSR	DF	
AAQ18708	IFENWVAI	GRDP	QY	WED	PE	FR	PERE	D	VSR	DE	
AAD47832	VVYN	WAWA	GRDP	KY	WDD	AE	SE	F	K	PERE	
CAC24711	VMN	NVAI	GRDP	KY	WDD	AE	SE	F	K	PERE	
P93530	VMN	NVAI	GRDP	KY	WDD	YE	CE	K	PERE	D	
	510										
AAD44150	CLVP	TL	YK	SP	--						
AAD44152	LVP	TPY	DP	SS	--						
AAD44151	LVP	TPY	DP	SS							
AAK62343	YLN	ATPY	Q	PS	RE						
ABS00393	MLV	ATPY	Q	PS	RE						
AAQ18707	LVP	TPY	NP	SS	--						
AAQ18708	CLVP	TL	YK	SP	--						
AAD47832	HLTA	AY	Q	H	CEE						
CAC24711	LVA	ATPY	EP	PR	Q						
P93530	YLTA	ATPY	OP	---							

Figura 4

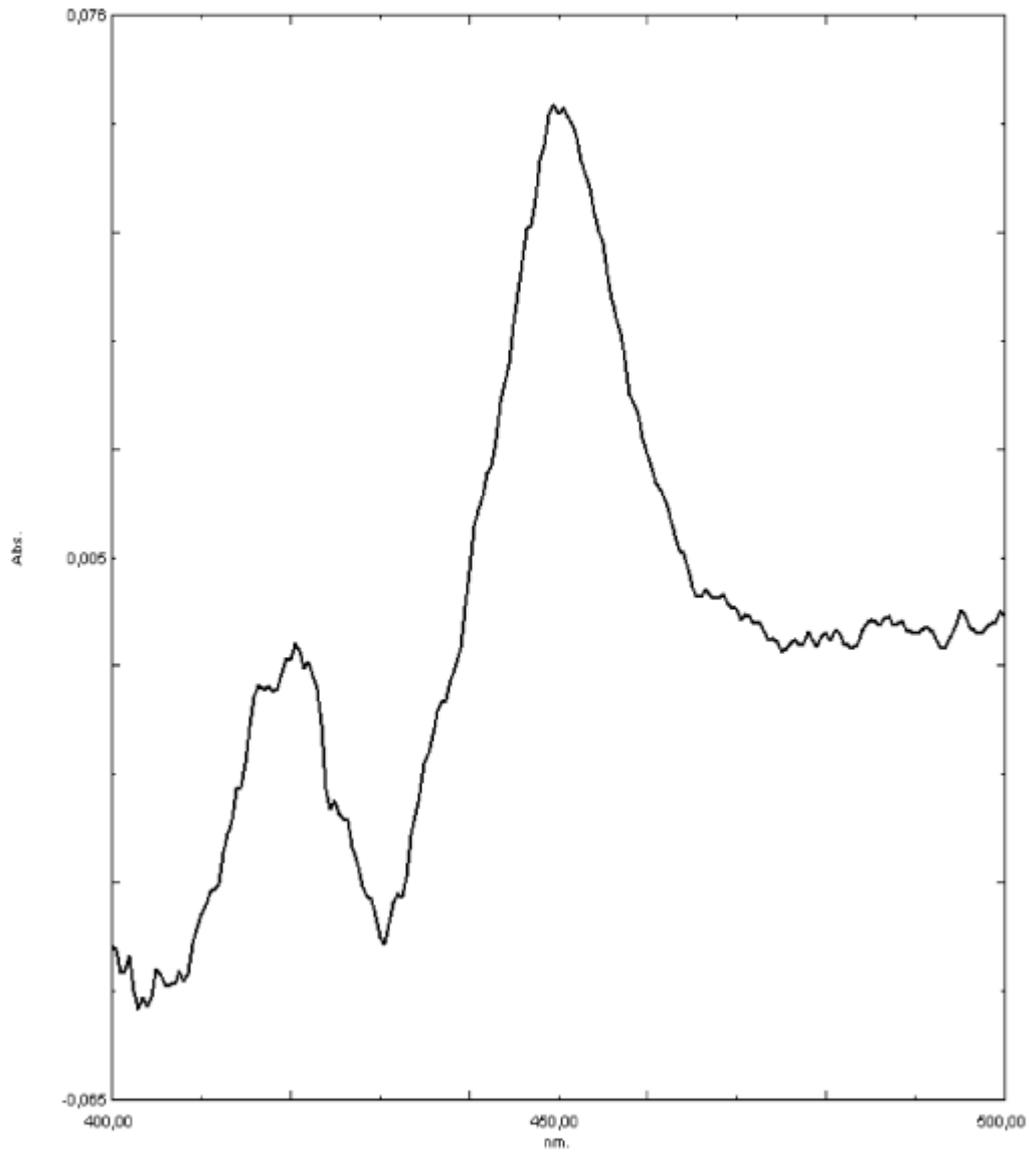


Figura 5

<u>Fin de P450</u>	<u>Inicio de PCR</u>
I A P A G F N *	M G T D S L S D D
CATTGCGCGCGCGGTTTTAATTAAGCTGTCGACTAACTTTAAGAAGGAGATATATCCATGGGCACGGATAGCCTGAGCGACGAC	
GTAACGGCGCGGCCAAAATTAAATTCGACAGCTGATTGAAATTTCTCTATATAGGTACCCCGTCCCTATCGGACTCGCTGCTG	
	<u>RBS</u>
Sall	NcoI

Figura 6

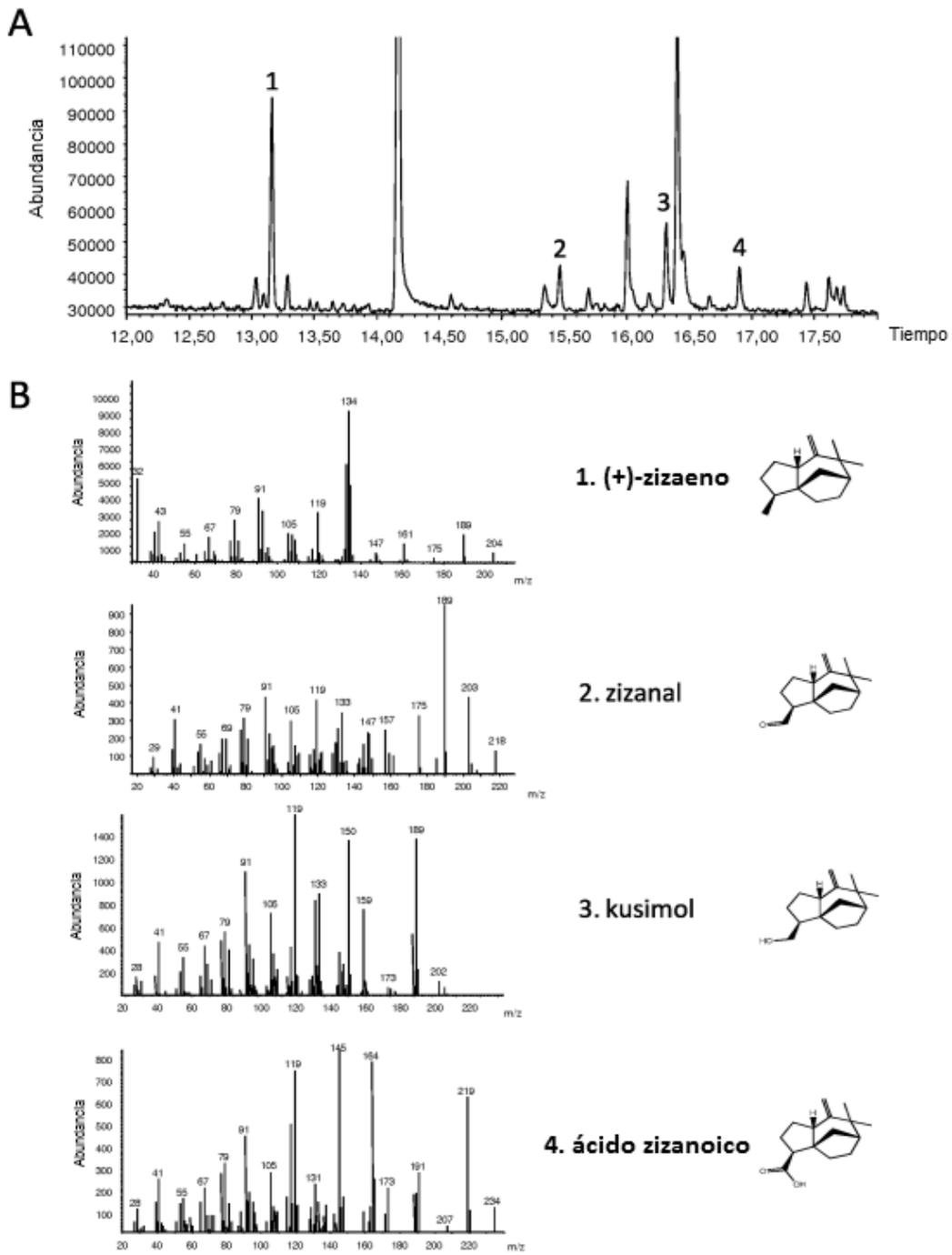


Figura 7

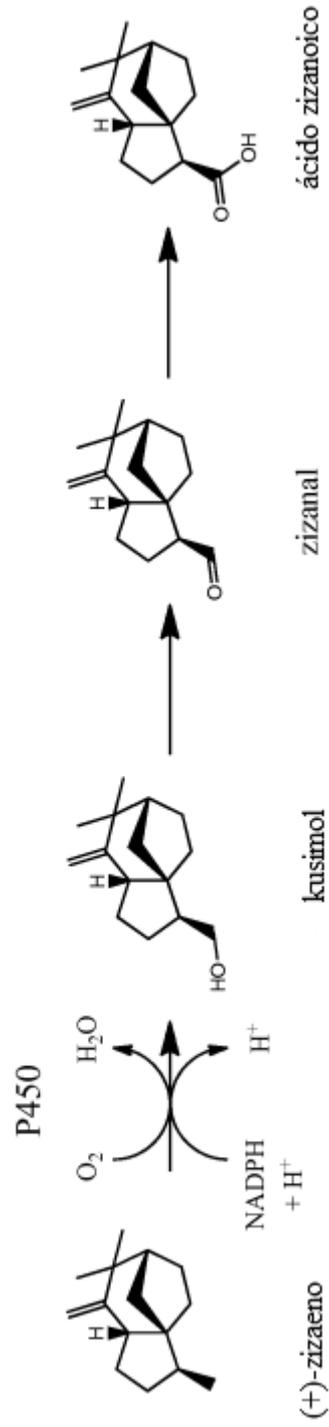


Figura 8

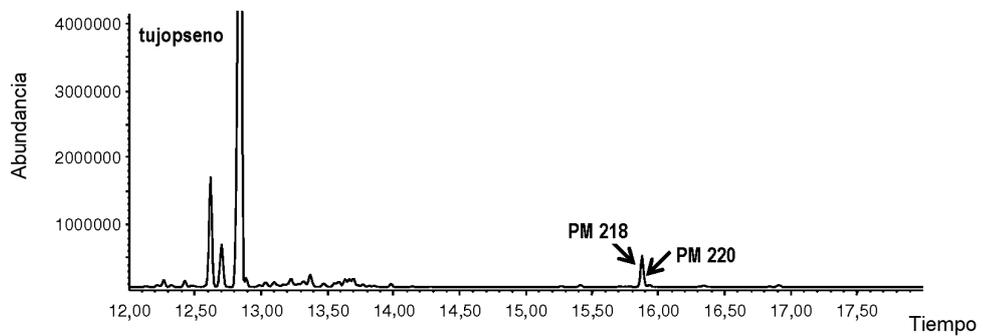
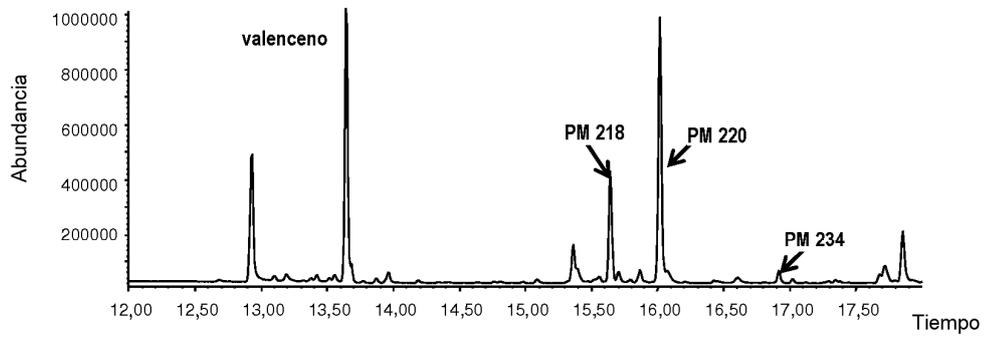
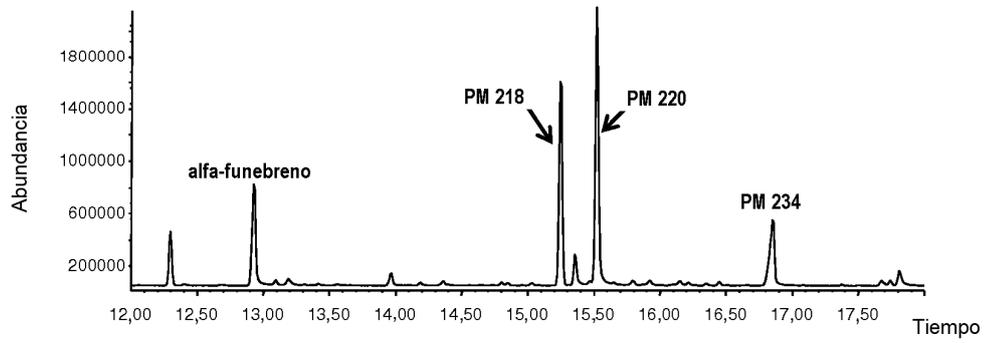
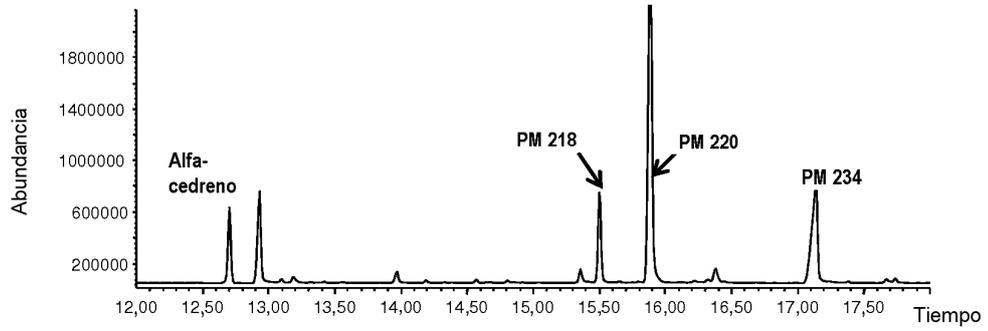


Figura 9

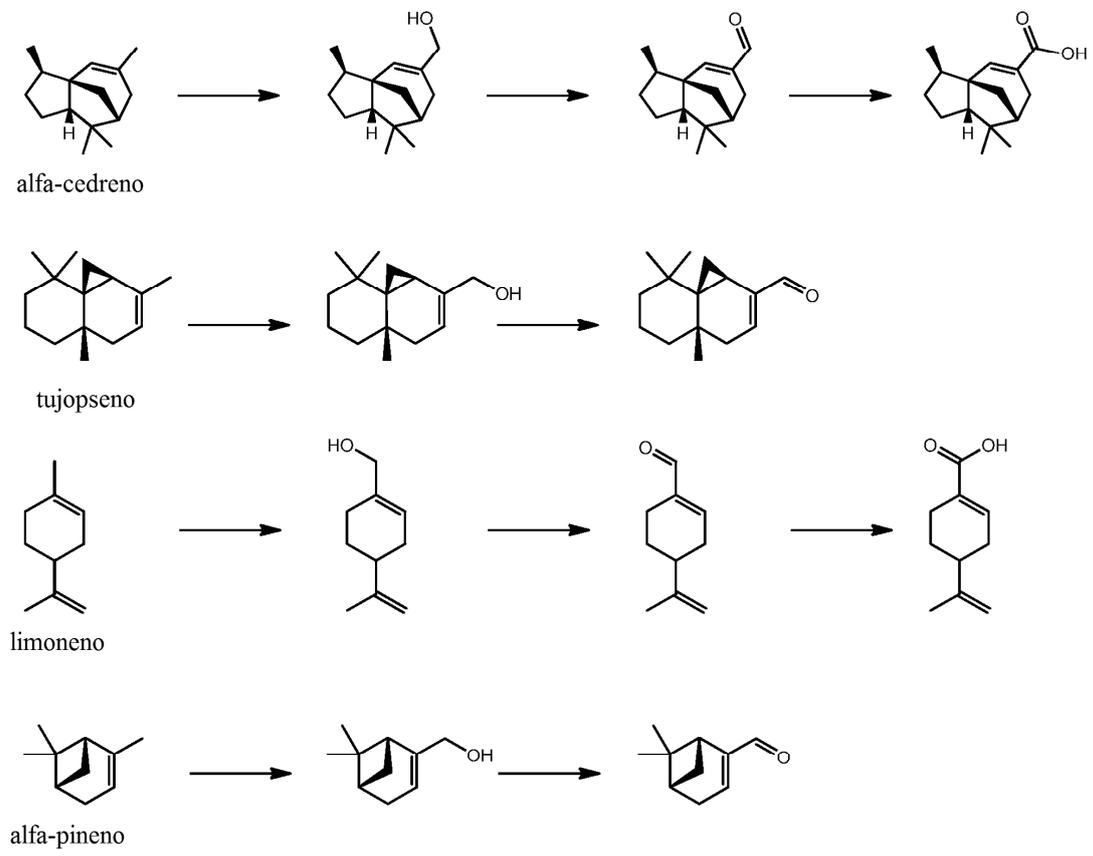


Figura 10

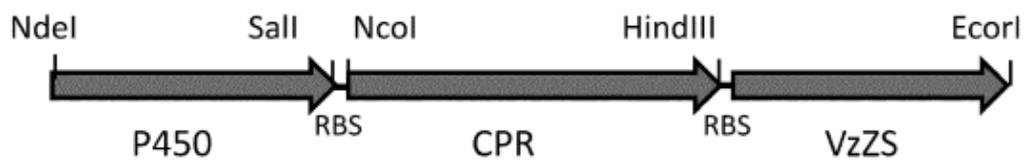


Figura 11

