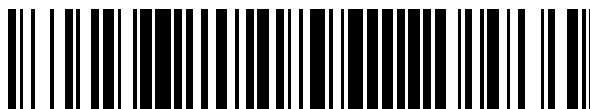


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 847**

51 Int. Cl.:

C12P 23/00 (2006.01)

C12P 5/00 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2012** **PCT/US2012/064532**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013** **WO13071172**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2012** **E 12795948 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2776571**

54 Título: **Producción de isoprenoides derivados de acetil-coenzima a**

30 Prioridad:

09.11.2011 US 201161557893 P

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

04.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GARDNER, TIMOTHY STEVENS;
HAWKINS, KRISTY MICHELLE;
MEADOWS, ADAM LEON;
TSONG, ANNIE ENING y
TSEGAYE, YOSEPH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 628 847 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de isoprenoides derivados de acetil-coenzima a

- 5 Esta solicitud reivindica los derechos de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 61/557.893, presentada el 9 de noviembre de 2011.

1. Campo de la invención

- 10 La presente divulgación se refiere a composiciones y a métodos para producir isoprenoides derivados de acetil-CoA en células hospedadoras modificadas por ingeniería genética.

2. Antecedentes

- 15 La acetil coenzima A (acetil-CoA) es un intermedio clave en la síntesis de compuestos biológicos esenciales, entre los que se incluyen los poliquétidos, ácidos grasos, isoprenoides, fenólicos, alcaloides, vitaminas y aminoácidos. Entre los metabolitos derivados de la acetil-CoA se encuentran metabolitos primarios y secundarios, incluyendo compuestos de utilidad industrial. Los isoprenoides, por ejemplo, se usan en productos farmacéuticos y como biocombustibles, aditivos alimentarios y otros productos químicos especiales. Un producto isoprenoide típicamente se compone de cinco unidades de carbono isopentenil difosfato (IPP) repetidas, aunque se han notificado isoprenoides irregulares y politerpenos. En la naturaleza, los isoprenoides se sintetizan por condensaciones consecutivas de su IPP precursor y su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Se conocen dos rutas para estos precursores. Los procariotas, con algunas excepciones, típicamente emplean la ruta de desoxixilulosa-5-fosfato (DXP) para convertir piruvato y gliceraldehído 3-fosfato (G3P) en IPP y DMAPP. Los eucariotas, con la excepción de las plantas, generalmente usan la ruta dependiente de mevalonato (MEV) para convertir acetil-CoA en IPP, que posteriormente se isomeriza a DMAPP.

- El hongo unicelular *Saccharomyces cerevisiae* y sus parientes cercanos usan dos rutas endógenas para generar acetil-CoA. Una ruta tiene lugar en la matriz mitocondrial, donde el complejo PDH cataliza la descarboxilación oxidativa de piruvato, generado a partir de glucosa a través de la glicólisis, en acetil-CoA. El complejo PDH consiste en 60 cadenas polipeptídicas - 24 cadenas de lipoamida reductasa-transacetilasa, 12 cadenas de dihidrolipil deshidrogenasa y 24 cadenas de piruvato descarboxilasa. Este complejo masivo convierte el piruvato en acetil-CoA, generando NADH como subproducto. La acetil-CoA resultante después puede oxidarse completamente a CO₂ y H₂O a través del ciclo de ácido cítrico para la generación de energía, o usarse para reacciones biosintéticas que se realizan en las mitocondrias.

- La acetil-CoA generada en la mitocondria no puede atravesar la membrana mitocondrial para pasar al citosol. De esta manera, para generar acetil-CoA citosólica, que se necesita para la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios importantes, *S. cerevisiae* usa un mecanismo independiente localizado en el citosol conocido como "bypass de PDH". Esta ruta multietapa cataliza: (1) la descarboxilación de piruvato en acetaldehído por la piruvato descarboxilasa (PDC, EC 4.1.1.1); (2) la conversión de acetaldehído en acetato por acetaldehído deshidrogenasa (ACDH, EC 1.2.1.5 y EC 1.2.1.4), que reduce un NADP⁺ a un NADPH; y (3) la síntesis de acetil-CoA a partir de acetato y CoA por la acetil-CoA sintetasa (ACS, EC 6.2.1.1), que hidroliza 1 ATP a 1 AMP, el equivalente energético de la hidrólisis de 2 ATP a 2 ADP.

- Como la naturaleza proporciona únicamente fuentes de bajo rendimiento para la extracción de muchas biomoléculas derivadas de acetil-CoA, la producción fermentativa usando microorganismos modificados genéticamente se ha convertido en una alternativa prometedora para su producción. Sin embargo, la utilización de la ruta de acetil-CoA nativa para la producción del intermedio de acetil-CoA tiene ciertas limitaciones. Por ejemplo, la producción de isoprenoides a través de la ruta de MEV nativa requiere tres moléculas de acetil-CoA y la oxidación de dos NADPH para cada molécula de mevalonato generada, como se muestra en la FIG. 1. Aunque el bypass de PDH genera un NADPH por acetil-CoA producida, en el proceso se gastan dos equivalentes de ATP. De esta manera, aunque la generación de NADPH es beneficiosa con respecto a los requisitos de cofactores de la ruta de MEV nativa, el gasto de seis equivalentes de ATP por mevalonato generado da como resultado una reacción energéticamente ineficaz, ya que deben desviarse más fuentes de carbono a la síntesis de ATP, *por ejemplo*, a través del ciclo TCA y la fosforilación oxidativa, a expensas del rendimiento del producto.

- De esta manera, uno de los desafíos en el diseño de un hospedador de producción que produzca eficazmente compuestos derivados de acetil-CoA, es optimizar la producción de acetil-CoA de tal manera que se minimicen los requisitos de ATP, proporcionando al mismo tiempo el cofactor y los requisitos de la ruta biosintética. Las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento abordan esta necesidad y proporcionan también ventajas relacionadas.

3. Sumario de la invención

La presente invención proporciona una célula de levadura modificada genéticamente capaz de producir un isoprenoide, comprendiendo la célula: (a) uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más enzimas de una ruta de mevalonato (MEV) para fabricar isopentenil pirofosfato; y (b) un ácido nucleico heterólogo que codifica una acetilaldehído deshidrogenasa de acilación (ADA). La referencia en el presente documento a una "célula hospedadora" de la invención es una célula de levadura.

En el presente documento se describen composiciones y métodos para la producción energéticamente eficaz y equilibrada con cofactor de isoprenoides derivados de acetil-CoA. Mediante la utilización de una acetilaldehído deshidrogenasa de acilación heteróloga (denominada como alternativa "acetilaldehído deshidrogenasa, acetilación", "acetilaldehído deshidrogenasa, acilación", o "ADA" (EC 1.2.1.10)) como alternativa al bypass de PDH para la producción citosólica de acetil-CoA, se ahorran dos equivalentes de ATP por molécula de acetil-CoA producida. La ADA convierte el acetilaldehído directamente en acetil-CoA sin gasto de ATP, y reduce un NAD^+ a un NADH en el proceso.

Aunque los ahorros de ATP obtenidos por el reemplazo del bypass de PDH con ADA pueden utilizarse para obtener mayores rendimientos de producto, hay posibles inconvenientes asociados con el uso de ADA en combinación con la ruta de mevalonato nativa. En primer lugar, la inactivación del bypass de PDH nativo elimina una fuente de NADPH, mientras que la reacción catalizada por ADA produce NADH. De esta manera, el reemplazo del bypass de PDH con ADA, sin una modificación de la ruta adicional, introduce un desequilibrio redox en la síntesis de isoprenoides, que consume NADPH.

En segundo lugar, la ADA cataliza la siguiente reacción reversible:



La reacción de bypass de PDH nativo para formar acetil-CoA es termodinámicamente favorable porque la reacción se acopla a la hidrólisis de ATP para dar AMP. Por el contrario, la reacción de ADA no se acopla a ATP, y está mucho más próxima al equilibrio que las reacciones de bypass de PDH nativas para formar acetil-CoA. De esta manera, la reacción catalizada por ADA tiene una menor fuerza termodinámica impulsora tras la conversión de acetilaldehído en acetil-CoA, y sin una modificación de la ruta adicional, no pueden obtenerse las ganancias de energía teóricas de la ADA.

Las composiciones y métodos descritos en el presente documento solucionan estos inconvenientes. En algunas realizaciones, para tratar el desequilibrio redox introducido por el reemplazo del bypass de PDH con ADA, las células hospedadoras modificadas genéticamente utilizan además una enzima que usa NADH en la ruta de isoprenoides para consumir NADH generado por ADA. De esta manera, la reserva de NADH generado por la conversión mediada por ADA de acetilaldehído en acetil-CoA puede utilizarse directamente hacia la síntesis de isoprenoides. En algunas realizaciones, la enzima que usa NADH es una enzima que no es nativa en la ruta de isoprenoides. Por ejemplo, la enzima que usa NADH puede reemplazar a una enzima que usa NADPH que es nativa para la ruta de isoprenoides. En realizaciones particulares, la enzima que usa NADH es una 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa que usa NADH (HMG-CoA reductasa) que convierte HMG-CoA en mevalonato.

En algunas realizaciones, para solucionar la menor fuerza termodinámica impulsora tras la reacción de ADA, las células hospedadoras modificadas genéticamente utilizan además, como primera etapa en la ruta de mevalonato, una reacción termodinámicamente favorable inmediatamente posterior a la acetil-CoA para proporcionar un impulso a la reacción de ADA. En algunas realizaciones, la formación de acetoacetil-CoA a partir de acetil-CoA se cataliza por una acetoacetil-CoA sintasa (AACS; denominada, como alternativa, acetil-CoA:malonil CoA aciltransferasa). La reacción catalizada por AACS es termodinámicamente más favorable que la reacción catalizada por la acetil-CoA tiolasa de la ruta de mevalonato nativa, debido a la hidrólisis de 1 ATP resultante de la generación de malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (FIG. 5). De esta manera, la AACS proporciona un impulso más fuerte sobre la acetil-CoA para promover la reacción directa de ADA.

Las ventajas de utilizar una ADA heteróloga en combinación con estas modificaciones se ejemplifican por el mejor rendimiento teórico del sesquiterpeno farneseno en células hospedadoras que comprenden una ruta de MEV. En la FIG. 1 y en la FIG. 2 se ilustra la producción de isoprenoides a través de la ruta de mevalonato nativa. Como se indica en la FIG. 3, cuando se sintetiza acetil-CoA citosólica a partir de glucosa usando únicamente las reacciones químicas que se producen en la red metabólica de levadura nativa, el máximo rendimiento estequiométrico posible para la conversión de glucosa en farneseno a través de la ruta de mevalonato es del 23,6 % en peso, siendo necesarias 4,77 moléculas de glucosa para la síntesis de cada molécula de farneseno. Se requieren 27 ATP por molécula de farneseno, de las que 18 se consumen en la síntesis de acetil-CoA citosólica a partir de acetilaldehído a través del bypass de PDH. Sin embargo, al incluir las reacciones catalizadas por ADA y HMG-CoA reductasa que usa NADH en la red metabólica para la producción de mevalonato, como se ilustra en la FIG. 4, el rendimiento estequiométrico teórico máximo se mejora hasta un 25,2 % en peso. En particular, la ADA convierte el acetilaldehído en acetil-CoA sin ningún aporte de ATP; esto reduce los equivalentes de ATP necesarios para la síntesis de

farneseno a 9, dando como resultado un ahorro de 18 equivalentes de ATP por molécula de farneseno producida (2 equivalentes de ATP por acetil-CoA x 9 acetil-CoA por 1 farneseno). Estos ahorros en el uso de ATP durante la producción de acetil-CoA eliminan la necesidad de oxígeno para que las células realicen el ciclo TCA para la producción de farneseno. El requisito de oxígeno para la conversión de glucosa en farneseno se reduce de 7,8 moléculas de O₂ por glucosa consumida a 6, reduciéndose de esta manera el importante coste de producción de proporcionar oxígeno a los fermentadores a escala. Además, el desequilibrio redox se alivia al introducir conjuntamente una HMG-CoA reductasa que usa NADH, que consume NADH generado por ADA.

Como se indica en la FIG. 4, sigue habiendo un exceso estequiométrico de ATP en una cepa que comprende tanto una ADA como una HMG-CoA reductasa que usa NADH, que puede usarse por la célula para el mantenimiento y crecimiento. Como alternativa, parte de este exceso de ATP puede utilizarse para mejorar la cinética de la producción de acetoacetil-CoA, mediante la introducción de una acetoacetil-CoA sintasa (AACS). Como se ilustra en la FIG. 5, la AACS es una enzima que sintetiza acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA. La síntesis de malonil-CoA requiere un aporte energético de 1 ATP por molécula de acetil-CoA convertida (catalizada por la acetil-CoA carboxilasa, mejorándose de esta manera la fuerza termodinámica impulsora de la síntesis de acetoacetil-CoA a partir de acetil-CoA. Es importante indicar que esto no afecta al rendimiento estequiométrico máximo del farneseno a partir de azúcar o a la demanda de oxígeno de la ruta, ya que sigue habiendo un exceso de ATP disponible en este diseño de cepa, como se ilustra en la FIG. 6.

Como se muestra en la FIG. 7, pueden conseguirse eficiencias adicionales mediante la introducción de las enzimas fosfocetolasa (PK) y fosfotransacetilasa (PTA). La PK y PTA catalizan las reacciones de conversión de fructosa-6-fosfato (F6P) o xilulosa-5-fosfato (X5P) en acetil-CoA. Con estas rutas metabólicas disponibles, óptimamente, la red de reacciones puede alcanzar un rendimiento de masa del 29,8 % en peso o mayor, un aumento significativo en el rendimiento teórico máximo. Esta solución implica desviar carbono de la glicólisis secundaria (G3P → piruvato), lo cual tiene como resultado una menor generación de ATP y NADH, al estar ambos ya en exceso en una red que comprende la ADA y la HMG-CoA reductasa que usa NADH. Un efecto beneficioso de reducir el flujo a través de la glicólisis secundaria es que se produce menos CO₂ para convertir piruvato en acetaldehído y, por lo tanto, puede capturarse más carbono en el producto final, aumentándose de esta manera el rendimiento teórico máximo de la red. Un segundo efecto beneficioso es que se produce menos NADH y, por lo tanto, se necesita menos oxígeno para reoxidarlo. En particular, la demanda de oxígeno óptimamente es de solo 1,84 moléculas de O₂ por glucosa consumida. El impacto redox de la adición de PK y PTA a un entorno de ADA es visible incluso a bajos rendimientos en la microescala, como se ilustra en la FIG. 13, donde la producción de glicerol vuelve a los niveles del tipo silvestre.

De esta manera, en la presente invención se proporcionan células de levadura modificadas genéticamente y métodos para usarlas para la producción de isoprenoides derivados de acetil-CoA como se define en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que condensa acetil-CoA con malonil-CoA para formar acetoacetil-CoA. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una acetil-CoA:malonil-CoA aciltransferasa (es decir, una acetoacetil-CoA sintasa (AACS)).

En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que usa NADH que convierte HMG-CoA en mevalonato. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una HMG-CoA reductasa que usa NADH.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica una fosfocetolasa. En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica una fosfotransacetilasa.

En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la ADA es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la acetil-CoA:malonil-CoA aciltransferasa es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:16. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la HMG-CoA reductasa que usa NADH es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la fosfocetolasa es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la fosfotransacetilasa es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 14.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende además una alteración funcional de una o más enzimas del bypass de piruvato deshidrogenasa (PDH) nativa. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas del bypass de PDH se seleccionan entre acetil-CoA sintasa 1 (ACS1), acetil-CoA sintasa 2 (ACS2) y aldehído deshidrogenasa 6 (ALD6). En algunas realizaciones, ACS1 está alterada funcionalmente. En algunas realizaciones, ACS2 está alterada funcionalmente. En algunas realizaciones, ALD6 está alterada funcionalmente. En algunas realizaciones, ACS1 y ACS2 están alteradas funcionalmente. En algunas realizaciones, ACS1, ACS2 y ALD6 están alteradas funcionalmente.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende además una alteración funcional de una o más enzimas que tienen actividad alcohol deshidrogenasa (ADH). En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas que tienen actividad ADH se seleccionan entre alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1), alcohol deshidrogenasa 3 (ADH3), alcohol deshidrogenasa 4 (ADH4) y alcohol deshidrogenasa 5 (ADH5).

En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que condensa acetoacetil-CoA con acetil-CoA para formar HMG-CoA. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que convierte HMG-CoA en mevalonato. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que fosforila mevalonato para dar mevalonato 5-fosfato. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que convierte mevalonato 5-fosfato en mevalonato 5-pirofosfato. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que convierte mevalonato 5-pirofosfato en isopentenil pirofosfato. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV se seleccionan entre HMG-CoA sintasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa y mevalonato pirofosfato descarboxilasa.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una pluralidad de ácidos nucleicos heterólogos que codifican todas las enzimas de la ruta de MEV. En algunas realizaciones, dichos uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más enzimas de la ruta de MEV están bajo el control de un solo regulador de la transcripción. En algunas realizaciones, dichos uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más enzimas de la ruta de MEV están bajo el control de múltiples reguladores de la transcripción heterólogos.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que puede convertir isopentenil pirofosfato (IPP) en dimetilalil pirofosfato (DMAPP). En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que puede condensar moléculas de IPP y/o DMAPP para formar un compuesto de poliprenilo. En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que puede modificar IPP o un poliprenilo para formar un compuesto isoprenoide. En algunas realizaciones, la enzima que puede modificar IPP o un poliprenilo para formar un compuesto isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en careno sintasa, geraniol sintasa, linalool sintasa, limoneno sintasa, mirceno sintasa, ocimeno sintasa, α -pineno sintasa, β -pineno sintasa, γ -terpineno sintasa, terpinoleno sintasa, amorfadieno sintasa, α -farneseno sintasa, β -farneseno sintasa, farnesol sintasa, nerolidol sintasa, patchouliol sintasa, nootkatona sintasa y abietadieno sintasa. En algunas realizaciones, el isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en un hemiterpeno, monoterpeno, diterpeno, triterpeno, tetraterpeno, sesquiterpeno y politerpeno. En algunas realizaciones, el isoprenoide es un isoprenoide C_5 - C_{20} . En algunas realizaciones, el isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en abietadieno, amorfadieno, careno, α -farneseno, β -farneseno, farnesol, geraniol, geranilgeraniol, isopreno, linalool, limoneno, mirceno, nerolidol, ocimeno, patchoulol, β -pineno, sabineno, γ -terpineno, terpinoleno y valenceno.

La célula hospedadora modificada genéticamente de la invención es una célula de levadura. En algunas realizaciones, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

En otro aspecto, en la presente invención se proporciona una célula hospedadora modificada genéticamente capaz de producir un isoprenoide, comprendiendo la célula: (a) uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más enzimas de una ruta de mevalonato (MEV) para fabricar isopentenil pirofosfato; (b) un ácido nucleico heterólogo que codifica una acetilaldehído deshidrogenasa, acetilación (ADA); (c) una alteración funcional de al menos una enzima del bypass de PDH nativo seleccionada del grupo que consiste en acetil-CoA sintasa 1 (ACS1), acetil-CoA sintasa 2 (ACS2) y aldehído deshidrogenasa 6 (ALD6); (d) un ácido nucleico heterólogo que codifica una fosfocetolasa (PK); y (e) un ácido nucleico heterólogo que codifica una fosfocetolasa (PTA).

En otro aspecto, en la presente invención se proporciona una célula hospedadora modificada genéticamente capaz de producir un isoprenoide, comprendiendo la célula: (a) uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más enzimas de una ruta de mevalonato (MEV) para fabricar isopentenil pirofosfato, en donde dichas una o más enzimas comprenden una HMG-CoA reductasa que usa NADH; (b) un ácido nucleico heterólogo que codifica una acetilaldehído deshidrogenasa, acetilación (ADA); y (c) una alteración funcional de al menos una enzima del bypass de PDH nativo seleccionada del grupo que consiste en acetil-CoA sintasa 1 (ACS1), acetil-CoA sintasa 2 (ACS2) y aldehído deshidrogenasa 6 (ALD6).

En otro aspecto, en la presente invención se proporciona una célula hospedadora modificada genéticamente capaz de producir un isoprenoide, comprendiendo la célula: (a) uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más enzimas de una ruta de mevalonato (MEV) para fabricar isopentenil pirofosfato, en donde dichas una o más enzimas comprenden una HMG-CoA reductasa que usa NADH; (b) un ácido nucleico heterólogo que codifica una acetilaldehído deshidrogenasa, acetilación (ADA); (c) una alteración funcional de al menos una enzima del bypass de PDH nativo seleccionada del grupo que consiste en acetil-CoA sintasa 1 (ACS1), acetil-CoA sintasa 2 (ACS2) y

aldehído deshidrogenasa 6 (ALD6); (d) un ácido nucleico heterólogo que codifica una fosfocetolasa (PK); y (e) un ácido nucleico heterólogo que codifica una fosfocetolasa (PTA).

En otro aspecto, en la presente invención se proporciona una célula hospedadora modificada genéticamente capaz de producir un isoprenoide, comprendiendo la célula: (a) uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más enzimas de una ruta de mevalonato (MEV) para fabricar isopentenil pirofosfato, en donde dichas una o más enzimas comprenden una acetil-CoA:malonil-CoA aciltransferasa; (b) un ácido nucleico heterólogo que codifica acetilaldehído deshidrogenasa, acetilación (ADA); y (c) una alteración funcional de al menos una enzima del bypass de PDH nativo seleccionada del grupo que consiste en acetil-CoA sintasa 1 (ACS1), acetil-CoA sintasa 2 (ACS2) y aldehído deshidrogenasa 6 (ALD6).

En otro aspecto, en la presente invención se proporciona una célula hospedadora modificada genéticamente capaz de producir un isoprenoide, comprendiendo la célula: (a) uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una pluralidad de enzimas de una ruta de mevalonato (MEV) para fabricar isopentenil pirofosfato, en donde la pluralidad de enzimas comprende una acetil-CoA:malonil-CoA aciltransferasa y una HMG-CoA reductasa que usa NADH; (b) un ácido nucleico heterólogo que codifica una acetilaldehído deshidrogenasa, acetilación (ADA); (c) una alteración funcional de al menos una enzima del bypass de PDH nativo seleccionada del grupo que consiste en acetil-CoA sintasa 1 (ACS1), acetil-CoA sintasa 2 (ACS2) y aldehído deshidrogenasa 6 (ALD6); (d) un ácido nucleico heterólogo que codifica una fosfocetolasa (PK); y (e) un ácido nucleico heterólogo que codifica una fosfocetolasa (PTA).

En otro aspecto, en la presente invención se proporciona un método para producir un isoprenoide, comprendiendo el método: (a) cultivar una población de células de levadura modificadas genéticamente descritas en el presente documento en un medio con una fuente de carbono en condiciones adecuadas para fabricar dicho compuesto isoprenoide; y (b) recuperar dicho compuesto isoprenoide del medio.

4. Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 proporciona una representación esquemática de la ruta de mevalonato ("MEV") para la producción de isopentenil difosfato ("IPP").

La FIGURA 2 proporciona una representación esquemática de la conversión de IPP y dimetilalil pirofosfato ("DMAPP") en geranil pirofosfato ("GPP"), farnesil pirofosfato ("FPP") y geranilgeranil pirofosfato ("GGPP").

La FIGURA 3 proporciona una representación esquemática del flujo óptimo de carbono y los requisitos metabólicos y rendimientos en la conversión de glucosa en farneseno a través de la ruta de mevalonato, en donde se genera acetil-CoA citosólica a través del bypass de PDH de "tipo silvestre".

La FIGURA 4 proporciona una representación esquemática del flujo óptimo de carbono y los requisitos metabólicos y rendimientos en la conversión de glucosa en farneseno a través de la ruta de mevalonato, en donde se genera acetil-CoA citosólica a través de ADA, y la ruta de mevalonato comprende una HMGr que usa NADH en lugar de una HMGr que usa NADPH.

La FIGURA 5 proporciona una representación esquemática de la producción de farneseno a partir de acetil-CoA, en donde la acetoacetil-CoA (AcAcCoA) se sintetiza a partir de malonil-CoA y acetil-CoA (AcCoA) por la acetoacetil-CoA sintasa (AACS). La síntesis de malonil-CoA requiere una entrada energética de 1 ATP por molécula de acetil-CoA convertida (catalizado por acetil-CoA carboxilasa (ACC1)).

La FIGURA 6 proporciona una representación esquemática del flujo óptimo de carbono y los requisitos metabólicos y rendimientos en la conversión de glucosa en farneseno a través de la ruta de mevalonato, en donde se genera acetil-CoA citosólica a través de ADA, la ruta de mevalonato comprende una HMGr que usa NADH en lugar de una HMGr que usa NADPH, y la acetoacetil-CoA se sintetiza a partir de malonil-CoA y acetil-CoA por la acetoacetil-CoA sintasa.

La FIGURA 7 proporciona una representación esquemática del flujo óptimo de carbono y los requisitos metabólicos y rendimientos en la conversión de glucosa en farneseno a través de la ruta de mevalonato, en donde se genera acetil-CoA citosólica a través de ADA, la ruta de mevalonato comprende una HMGr que usa NADH en lugar de una HMGr que usa NADPH, y la fosfocetolasa (PK) y fosfotransacetilasa (PTA) catalizan las reacciones para convertir fructosa-6-fosfato (F6P) en acetil-CoA.

La FIGURA 8 proporciona las actividades específicas de NADPH o de NADH (medidas como nmol/mg/min) de hidroximetilglutaril-CoA reductasas de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc. tHMG-CoA reductasa), *Pseudomonas mevalonii* (Pm.), *Delftia acidovorans* (Da.) y *Silicibacter pomeroyi* (Sp.).

La FIGURA 9 proporciona densidades celulares (medidas como DO₆₀₀) después de 24 y 48 horas para cepas de *S. cerevisiae* (Sc.) que comprenden una ruta de MevT heteróloga que comprende una HMG-CoA reductasa que usa NADPH (tHMG-CoA reductasa de Sc.) o una HMG-CoA reductasa que usa NADH (Pm. - *Pseudomonas mevalonii*; Da. -- *Delftia acidovorans*; Sp. -- *Silicibacter pomeroyi*) en un entorno de ADH1 de tipo silvestre y un entorno knockout para ADH1 (*adh1Δ*), respectivamente.

La FIGURA 10 proporciona la producción de glicerol (medida como g/l) después de 24 y 48 horas para cepas de *S. cerevisiae* (Sc.) en una ruta de MevT que comprende una HMG-CoA reductasa que usa NADPH (Sc. tHMG-CoA reductasa) o una HMG-CoA reductasa que usa NADH (Pm. - *Pseudomonas mevalonii*; Da. -- *Delftia acidovorans*; Sp. -- *Silicibacter pomeroyi*) tanto en un entorno de ADH1 de tipo silvestre como en un entorno knockout para ADH1.

La FIGURA 11 proporciona la producción de mevalonato (medida como g/l) después de 24 y 48 horas para cepas de *S. cerevisiae* (Sc.) que comprenden una HMG-CoA reductasa que usa NADPH (Sc. tHMG-CoA reductasa) o una HMG-CoA reductasa que usa NADH (Pm. - *Pseudomonas mevalonii*; Da. -- *Delftia acidovorans*; Sp. -- *Silicibacter pomeroyi*) tanto en un entorno de ADH1 de tipo silvestre como en un entorno knockout para ADH1 (*adh1Δ*).

La FIGURA 12 proporciona la producción de farneseno y densidades celulares de cepas de *S. cerevisiae* que comprenden: (A) una ADA expresada heterológamente (Dz.eutE) acoplada con *acs1Δ acs2Δ ald6Δ* y una ruta de MEV que comprende una HMG-CoA reductasa que usa NADPH o una HMG-CoA reductasa que usa NADH; (B) un bypass de PDH intacto (de tipo silvestre) y una ruta de MEV que comprende una HMG-CoA reductasa que usa NADPH o una HMG-CoA reductasa que usa NADH. Las columnas indicadas como "Vacías" representan pocillos solo con medio (sin células).

La FIGURA 13 proporciona la producción de glicerol (paneles superiores) y el consumo de glucosa (paneles inferiores) por: (A) una cepa de tipo silvestre (Y968); una cepa que expresa heterológamente ADA (Dz.eutE) (Y12869); y (B) una cepa que expresa heterológamente ADA (Dz.eutE), fosfocetolasa (PK) y fosfotransacetilasa (PTA) (Y12745).

La FIGURA 14 proporciona la producción de mevalonato por cepas de *S. cerevisiae* que comprenden un bypass de PDH intacto (tipo silvestre) o ADA expresada heterológamente (Dz.eutE) acoplado con *acs1Δ acs2Δ ald6Δ*; y una ruta de MEV que comprende ERG10 (acetil-CoA tiolasa) o *nphT7* (acetoacetil-CoA sintasa).

5. Descripción detallada de las realizaciones

5.1 Terminología

Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a lo que no se encuentra normalmente en la naturaleza. La expresión "secuencia de nucleótidos heteróloga" se refiere a una secuencia de nucleótidos que no se encuentra normalmente en una célula dada en la naturaleza. De esta manera, una secuencia de nucleótidos heteróloga puede: (a) ser extraña para su célula hospedadora (es decir, es "exógena" para la célula); (b) encontrarse de forma natural en la célula hospedadora (es decir, "endógena") pero estando presente en una cantidad poco natural en la célula (es decir, una cantidad mayor o menor que la que se encuentra normalmente en la célula hospedadora); o (c) encontrarse de forma natural en la célula hospedadora pero estar situada fuera de su locus natural. La expresión "enzima heteróloga" se refiere a una enzima que no se encuentra normalmente en una célula dada en la naturaleza. El término incluye una enzima que: (a) es exógena para una célula dada (es decir, se codifica por una secuencia de nucleótidos que no está presente de forma natural en la célula hospedadora o no está presente naturalmente en un contexto dado en la célula hospedadora); y (b) se encuentra de forma natural en la célula hospedadora (por ejemplo, la enzima se codifica por una secuencia de nucleótidos que es endógena para la célula) pero que se produce en una cantidad no natural (por ejemplo, mayor o menor que la encontrada de forma natural) en la célula hospedadora.

Por otra parte, el término "nativo" o "endógeno", como se usa en el presente documento haciendo referencia a moléculas y, en particular, a enzimas y ácidos nucleicos, indica moléculas que se expresan en el organismo en el que se originaron o se encuentran en la naturaleza, Independientemente del nivel de expresión que puede ser inferior, igual o mayor que el nivel de expresión de la molécula en el microorganismo nativo. Se entiende que la expresión de polinucleótidos o enzimas nativas puede estar modificada en microorganismos recombinantes.

Como se usa en el presente documento, "alterar funcionalmente" o una "alteración funcional" por ejemplo, de un gen diana, por ejemplo, uno o más genes del bypass de PDH, significa que el gen diana está alterado de tal manera que se reduce en la célula hospedadora la actividad de la proteína codificada por el gen diana. De forma similar, por "alterar funcionalmente" o una "alteración funcional" por ejemplo, de una proteína diana, por ejemplo, una o más enzimas del bypass de PDH, se entiende que la proteína diana está alterada de tal forma que se reduce en la célula hospedadora la actividad de la proteína. En algunas realizaciones, la actividad de la proteína diana codificada por el gen diana se elimina en la célula hospedadora. En otras realizaciones, la actividad de la proteína diana codificada por el gen diana se reduce en la célula hospedadora. La alteración funcional del gen diana puede conseguirse delecionando todo o una parte del gen de forma que se elimine o reduzca la expresión génica, o de forma que se elimine o reduzca la actividad del producto génico. La alteración funcional del gen diana también puede conseguirse mutando un elemento regulador del gen, *por ejemplo*, el promotor del gen de forma que se elimine o reduzca la expresión, o mediante la mutación de la secuencia codificante del gen de forma que se elimine o reduzca la actividad del producto génico. En algunas realizaciones, la alteración funcional del gen diana da como resultado la eliminación de la fase de lectura abierta completa del gen diana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula parental" se refiere a una célula que tiene un entorno genético idéntico al de una célula hospedadora modificada genéticamente desvelada en el presente documento excepto por el hecho de que no comprende una o más modificaciones genéticas particulares introducidas por ingeniería genética en la célula hospedadora modificada, por ejemplo, una o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en: expresión heteróloga de una ADA, expresión heteróloga de una HMG-CoA reductasa que usa NADH, expresión heteróloga de una AACS, expresión heteróloga de una fosfocetolasa, expresión heteróloga de una fosfotransacetilasa y expresión heteróloga de una o más enzimas de la ruta de mevalonato.

Como se usa en el presente documento, el término "producción" se refiere, en general, a una cantidad de un isoprenoide producido por una célula hospedadora modificada genéticamente proporcionada en el presente documento. En algunas realizaciones, la producción se expresa como un rendimiento de isoprenoide por la célula hospedadora. En otras realizaciones, la producción se expresa como una productividad de la célula hospedadora en la producción del isoprenoide.

Como se usa en el presente documento, el término "productividad" se refiere a la producción de un isoprenoide por una célula hospedadora, expresada como la cantidad de isoprenoide producida (en peso) por cantidad de caldo de fermentación en el que se cultiva la célula hospedadora (por volumen) a lo largo del tiempo (por hora).

Como se usa en el presente documento, el término "rendimiento" se refiere a la producción de un isoprenoide por una célula hospedadora, expresado como la cantidad de isoprenoide producido por cantidad de fuente de carbono consumida por la célula hospedadora, en peso.

5.2 Microbios modificados genéticamente que producen isoprenoides derivados de acetil-CoA

5.2.1 Células hospedadoras

Las células hospedadoras de levadura adecuadas incluyen, pero sin limitación, levaduras que se han depositado en depósitos de microorganismos (por ejemplo IFO, ATCC, etc.) y pertenecen a los géneros *Aciculoconidium*, *Ambrosiozyma*, *Arthroascus*, *Arxiozyma*, *Ashbya*, *Babjevia*, *Bensingtonia*, *Botryoascus*, *Botryozyma*, *Brettanomyces*, *Bullera*, *Bulleromyces*, *Candida*, *Citeromyces*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Debaryomyces*, *Dekkara*, *Dipodascopsis*, *Dipodascus*, *Eeniella*, *Endomycopsella*, *Eremascus*, *Eremothecium*, *Erythrobasidium*, *Fellomyces*, *Filobasidium*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Guilliermondella*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Hasegawaea*, *Holtermannia*, *Hormoascus*, *Hyphopichia*, *Issatchenkia*, *Kloeckera*, *Kloeckeraspora*, *Kluyveromyces*, *Kondoa*, *Kuraishia*, *Kurtzmanomyces*, *Leucosporidium*, *Lipomyces*, *Lodderomyces*, *Malassezia*, *Metschnikowia*, *Mrakia*, *Myxozyma*, *Nadsonia*, *Nakazawaea*, *Nematosporea*, *Ogataea*, *Oosporidium*, *Pachysolen*, *Phachytichosporea*, *Phaffia*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomycopsis*, *Saitoella*, *Sakaguchia*, *Saturnospora*, *Schizoblastosporion*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Sporopachydermia*, *Stephanoascus*, *Sterigmatomyces*, *Sterigmatosporidium*, *Symbiotaphrina*, *Sympodiomyces*, *Sympodiomycopsis*, *Torulaspora*, *Trichosporiella*, *Trichosporon*, *Trigonopsis*, *Tsuchiyaea*, *Udeniomyces*, *Waltomyces*, *Wickerhamia*, *Wickerhamiella*, *Williopsis*, *Yamadazyma*, *Yarrowia*, *Zygoascus*, *Zygosaccharomyces*, *Zygowilliopsis* y *Zygozyma*, entre otros.

En algunas realizaciones, el microbio hospedador es *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dekkera bruxellensis*, *Kluyveromyces lactis* (previamente denominado *Saccharomyces lactis*), *Kluveromyces marxianus*, *Arxula adeninivorans*, o *Hansenula polymorpha* (ahora conocido como *Pichia angusta*). En algunas realizaciones, el microbio hospedador es una cepa del género *Candida*, tal como *Candida lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis* o *Candida utilis*.

En una realización particular, el microbio hospedador es *Saccharomyces cerevisiae*. En algunas realizaciones, el hospedador es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada del grupo que consiste en la levadura de panadería, CBS 7959, CBS 7960, CBS 7961, CBS 7962, CBS 7963, CBS 7964, IZ-1904, TA, BG-1, CR-1, SA-1, M-26, Y-904, PE-2, PE-5, VR-1, BR-1, BR-2, ME-2, VR-2, MA-3, MA-4, CAT-1, CB-1, NR-1, BT-1, y AL-1. En algunas realizaciones, el microbio hospedador es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada del grupo que consiste en PE-2, CAT-1, VR-1, BG-1, CR-1, y SA-1. En una realización particular, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es PE-2. En otra realización particular, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es CAT-1. En otra realización particular, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es BG-1.

En algunas realizaciones, el microbio hospedador es un microbio que es adecuado para la fermentación industrial. En realizaciones particulares, el microbio está acondicionado para subsistir en condiciones de alta concentración de disolvente, alta temperatura, utilización del sustrato expandida, limitación de nutrientes, estrés osmótico debido a azúcar y sales, acidez, contaminación por sulfito y bacteriana o combinaciones de los mismos, que son condiciones de estrés reconocidas de un entorno de la fermentación industrial.

5.2.2 ADA heteróloga para la producción de acetil-CoA

En un aspecto, en la presente invención se proporciona una célula hospedadora modificada genéticamente capaz de producir un isoprenoide derivado de acetil-CoA, comprendiendo la célula una o más secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican acetaldehído deshidrogenasa de acilación (denominada como alternativa "acetaldehído deshidrogenasa, acetilación", "acetaldehído deshidrogenasa, acilación", o ADA (EC 1.2.1.10)).

Las proteínas capaces de catalizar esta reacción que son útiles para las composiciones y métodos proporcionados en la presente invención incluyen los siguientes cuatro tipos de proteínas:

(1) Proteínas bifuncionales que catalizan la conversión reversible de acetil-CoA en acetaldehído, y la posterior conversión reversible de acetaldehído en etanol. Un ejemplo de este tipo de proteína es la proteína AdhE en *E. coli* (Gen Bank n.º: NP_415757). AdhE parece ser un producto evolutivo de una fusión génica. La región terminal NH₂ de la proteína AdhE es altamente homóloga a las aldehído:NAD⁺ oxidorreductasas, mientras que la región COOH terminal es homóloga para una familia de etanol:NAD⁺ oxidorreductasas dependientes de Fe²⁺ (Membrillo-Hernandez et al., (2000) J. Biol. Chem. 275: 33869-33875). La AdhE de *E. coli* está sujeta a la oxidación catalizada por metales y, por lo tanto, es sensible al oxígeno (Tamarit et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:3027-32).

(2) Proteínas que catalizan la conversión reversible de acetil-CoA en acetaldehído en microbios anaerobios estrictamente o facultativos pero no poseen actividad alcohol deshidrogenasa. Se ha presentado un ejemplo de este tipo de proteína en *Clostridium kluyveri* (Smith et al. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 203: 663-675). Se ha anotado una ADA en el genoma de *Clostridium kluyveri* DSM 555 (n.º de registro: EDK33116). Se identifica una proteína AcdH homóloga en el genoma de *Lactobacillus plantarum* (n.º de registro: NP_784141). Otro ejemplo de este tipo de proteína es el producto génico *ald* en *Clostridium beijerinckii* NRRL B593 (Toth et al. (1999) Appl. Environ. Microbiol. 65: 4973-4980, n.º de registro: AAD31841).

(3) Proteínas que están implicadas en el catabolismo de etanolamina. La etanolamina puede utilizarse como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno por muchas enterobacterias (Stojiljkovic et al. (1995) J. Bacteriol. 177: 1357-1366). La etanolamina primero se convierte mediante la etanolamina amoniaco liasa en amoniaco y acetaldehído, posteriormente, el acetaldehído se convierte por la ADA en acetil-CoA. Un ejemplo de este tipo de ADA es la proteína EutE en *Salmonella typhimurium* (Stojiljkovic et al. (1995) J. Bacteriol. 177: 1357-1366, n.º de registro: AAL21357; véase también U18560.1). *E. coli* también es capaz de utilizar etanolamina (Scarlett et al. (1976) J. Gen. Microbiol. 95:173-176) y tiene una proteína EutE (n.º de registro: AAG57564; véase también EU897722.1) que es homóloga a la proteína EutE en *S. typhimurium*.

(4) Proteínas que forman parte de un complejo aldolasa-deshidrogenasa bifuncional implicado en el catabolismo de 4-hidroxi-2-cetovaleato. Dichas enzimas bifuncionales catalizan las dos etapas finales de la ruta de escisión meta para catecol, un intermedio en muchas especies bacterianas en la degradación de fenoles, toluatos, naftaleno, bifenilos y otros compuestos aromáticos (Powlowski y Shingler (1994) Biodegradation 5, 219-236). La 4-hidroxi-2-cetovaleato primero se convierte por la 4-hidroxi-2-cetovaleato aldolasa en piruvato y acetaldehído, y posteriormente el acetaldehído se convierte mediante la ADA en acetil-CoA. Un ejemplo de este tipo de ADA es la proteína DmpF en *Pseudomonas sp. CF600* (n.º de registro: CAA43226) (Shingler et al. (1992) J. Bacteriol. 174:71 1-24). *E. coli* tiene una proteína MphF homóloga (Ferrandez et al. (1997) J. Bacteriol. 179: 2573-2581, n.º de registro: NP_414885) a la proteína DmpF en *Pseudomonas sp. CF600*.

En algunas realizaciones, una ADA (o secuencia de ácido nucleico que codifica dicha actividad) útil para las composiciones y métodos descritos en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en adhE de *Escherichia coli*, adh2 de *Entamoeba histolytica*, adhE de *Staphylococcus aureus*, adhE de *Piromyces sp.E2*, *Clostridium kluyveri* (EDK33116), acdH de *Lactobacillus plantarum* y *Pseudomonas putida* (YP_001268189), como se describe en la Publicación Internacional n.º WO 2009/013159. En algunas realizaciones, la ADA se selecciona del grupo que consiste en eutE de *Clostridium botulinum* (FR745875.1), eutE de *Desulfotalea psychrophila* (CR522870.1), eutE de *Acinetobacter sp. HBS-2* (ABQ44511.2), eutE de *Caldithrix abyssi* (ZP_09549576) y *Halorubrum lacusprofundi* ATCC 49239 (YP_002565337.1).

En realizaciones particulares, la ADA útil para las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento es eutE de *Dickeya zeae*. Una secuencia de nucleótidos de eutE representativa de *Dickeya zeae* incluye el número de registro NC_012912.1:1110476. 1111855 y la SEQ ID NO: 1 como se proporciona en el presente documento. Una secuencia de proteína eutE representativa de *Dickeya zeae* incluye el número de registro YP_003003316 y la SEQ ID NO: 2 como se proporciona en el presente documento.

Las ADA también útiles en las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento incluyen las moléculas de las que se dice que son "derivados" de cualquiera de las ADA descritas en el presente documento. Dicho "derivado" tiene las siguientes características: (1) comparte una homología sustancial con cualquiera de las ADA descritas en el presente documento; y (2) es capaz de catalizar la conversión de acetaldehído en acetil-CoA. Se dice que un derivado de una ADA comparte una "homología sustancial" con ADA si las secuencias de aminoácidos del derivado son iguales al menos en un 80 %, al menos en un 85 %, más preferentemente al menos en un 90 % y, aún más preferentemente, al menos en un 95 %, a las de cualquiera de las ADA descritas en el presente documento.

5.2.2.1 Métodos para identificar ADA funcionales

En otro aspecto, en la presente invención se proporciona un método de selección de ADA con un rendimiento *n vivo* elevado. En este método de selección, se identifican ADA con un rendimiento *in vivo* elevado por su capacidad de rescatar células hospedadoras modificadas por ingeniería genética de la muerte celular. Las células hospedadoras modificadas por ingeniería genética comprenden una ruta heteróloga para la producción de un metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica, *por ejemplo*, un isoprenoide. En algunas realizaciones, las células hospedadoras modificadas por ingeniería genética comprenden además una ruta de bypass de PDH alterada funcionalmente y una ADA débilmente activa, en donde las actividades combinadas de la ruta de bypass de PDH alterada funcionalmente

y la ADA débilmente activa no producen suficiente acetil-CoA citosólica para satisfacer los requisitos para la producción tanto de: (1) el metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólico; como de (2) los metabolitos primarios derivados de acetil-CoA citosólicos necesarios para la supervivencia, salud y/o crecimiento celular. Para la supervivencia, salud y/o crecimiento, la célula hospedadora requiere, por lo tanto, una ADA activa que permita la

producción de una reserva elevada de acetil-CoA citosólica. En algunas realizaciones, el método de selección de ADA con rendimiento *in vivo* elevado comprende: (a) expresar una ADA de control en una célula hospedadora que tiene una ruta de bypass de PDH funcionalmente alterada para producir un nivel elevado de un metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica, en donde la producción del nivel elevado del metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica reduce la viabilidad de la célula hospedadora en comparación con una célula parental que no produce el nivel elevado del metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica; y (b) expresar en la célula hospedadora una ADA de ensayo en lugar de la ADA de control; con lo que un aumento en la viabilidad de la célula hospedadora que expresa la ADA de ensayo en comparación con la célula hospedadora que expresa la ADA de control identifica a la ADA de ensayo como una ADA que tiene un mejor rendimiento *in vivo* en comparación con la ADA de control.

En algunas realizaciones, la producción del nivel elevado de un metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica en la célula hospedadora es inducible. La inducción puede producirse en respuesta a un agente inductor (por ejemplo, galactosa) o una condición de crecimiento específica (por ejemplo, temperatura de crecimiento). Cuando crece en ausencia del agente inductor, la actividad ADA de la célula hospedadora es suficiente para permitir la producción de la acetil-CoA citosólica requerida por la célula hospedadora para la supervivencia. Sin embargo, cuando se cultiva en presencia del agente inductor, la actividad ADA de la célula hospedadora no es suficiente para permitir la producción tanto de la acetil-CoA citosólica requerida por la célula hospedadora para la supervivencia como el nivel elevado del metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica. En este último caso, la célula hospedadora por lo tanto requiere para la supervivencia una ADA más activa que permita la producción de una reserva elevada de acetil-CoA citosólica. La producción del metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica en la célula hospedadora puede variar de aproximadamente un 10 % a al menos aproximadamente 1.000 o más veces la producción del metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica en la célula parental.

La menor viabilidad de la célula hospedadora que expresa la ADA de control en comparación con la célula parental puede variar desde una reducción del crecimiento celular hasta la letalidad. De esta manera, en algunas realizaciones, la célula hospedadora que expresa la ADA de control produce un número reducido de células en la descendencia en un cultivo líquido o en una placa de agar en comparación con la célula parental. En otras realizaciones, la célula hospedadora que expresa la ADA de control no produce células descendientes en un cultivo líquido o en una placa de agar en comparación con la célula parental. Por consiguiente, el aumento de viabilidad de la célula hospedadora que expresa la ADA de ensayo en lugar de la ADA de control puede ser evidente en cultivo líquido por un mayor número de células de la descendencia, o en una placa de agar por un mayor tamaño de las colonias, en comparación con el número de células descendientes o el tamaño de las colonias producidas por la célula hospedadora que expresa la ADA de control.

La producción del nivel elevado del metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica en la célula hospedadora puede efectuarse modificando la expresión y/o actividad de una enzima implicada en la producción del metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica o sus precursores en la célula hospedadora. En algunas de dichas realizaciones, la expresión y/o actividad de una enzima de la ruta de MEV o DXP está modificada. En algunas de dichas realizaciones, la expresión y/o actividad de una HMG-CoA reductasa y/o una mevalonato quinasa está modificada.

La ADA de control y la ADA de ensayo puede ser ADA natural o ADA no natural. En algunas realizaciones, la ADA de ensayo es una variante de la ADA de control que difiere de la ADA de control por una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, la ADA de ensayo comprende aminoácidos idénticos a los de la ADA de control, pero los codones que codifican estos aminoácidos difieren entre la ADA de ensayo y la ADA de control. En algunas de dichas realizaciones, los codones están optimizados para uso en la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la ADA de control y/o la ADA de ensayo se fusionan a una piruvato descarboxilasa. En algunas realizaciones, la expresión de la ADA de ensayo está bajo el control regulador de un promotor fuerte. En algunas realizaciones, la expresión de la ADA de ensayo está bajo el control regulador de un promotor de fuerza media. En algunas realizaciones, la expresión de la ADA de ensayo está bajo el control regulador de un promotor débil.

El aumento de viabilidad de la célula hospedadora en presencia de la ADA de ensayo puede efectuarse por una ADA de ensayo que es más activa que la ADA de control o por una ADA de ensayo que es similarmente o menos activa que la ADA de control pero que se expresa a un mayor nivel. La identificación de las ADA de ensayo con mayor actividad puede conseguirse mediante la expresión de la ADA de control y la ADA de ensayo a niveles similares en la célula hospedadora. Esto puede conseguirse, por ejemplo, poniendo las secuencias de nucleótidos que codifican la ADA de control y la ADA de ensayo en la célula hospedadora bajo el control de los mismos elementos reguladores. En otras realizaciones en las que se usa el método, por ejemplo, para identificar elementos reguladores (por ejemplo promotores) que proporcionan un nivel de expresión deseado, la ADA de ensayo difiere de la ADA de control no en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, sino en el nivel de expresión. En dichas

realizaciones, pueden usarse diferentes elementos reguladores para la expresión de la ADA de control y la ADA de ensayo, y la comparación de las viabilidades de las células hospedadoras proporciona información no sobre la actividad de la ADA de ensayo, sino sobre la fuerza de los elementos reguladores que dirigen la expresión de la ADA de ensayo.

Para prevenir una situación de crecimiento competitiva en la que las células hospedadoras falsas positivas de crecimiento rápido que comprenden una mutación de promoción de crecimiento en lugar de una variante de ADA mejorada invaden el cultivo de células hospedadoras, una realización del método de selección implica un sistema de selección basado en placas de agar. En esta realización, la célula hospedadora se cultiva en una placa de agar y se identifica una célula hospedadora que comprende una variante de ADA de ensayo con rendimiento *in vivo* mejorado por crecimiento de colonias.

Una ventaja sustancial del método de selección desvelado en el presente documento es su simplicidad y su capacidad de implementación de alto rendimiento. Las variantes de ADA se identifican simplemente basándose en la viabilidad celular, haciendo que otros métodos de selección costosos y que requieren tiempo sean prácticamente innecesarios. De esta manera, en una realización, el método se usa para explorar una colección de variantes de ADA (por ejemplo, una biblioteca de ADA mutantes) para seleccionar variantes de ADA con un rendimiento *in vivo* mejorado. En dicha realización, en una célula hospedadora no se expresa una sola ADA de ensayo, sino que se expresa una colección de ADA de ensayo en una colección de células hospedadoras. Las células hospedadoras después pueden cultivarse en placas de agar, y las células hospedadoras que expresan variantes de ADA con un rendimiento *in vivo* mejorado pueden identificarse basándose en el crecimiento de las colonias. En algunas realizaciones, la colección de variantes de ADA comprende de 2 a 5, de 5 a 10, de 10 a 50, de 50 a 100, de 100 a 500, de 500 a 1.000, de 1.000 a 10.000, de 10.000 a 100.000, de 100.000 a 1.000.000 y más, variantes de ADA.

Otra ventaja importante del método de selección desvelado en el presente documento es su capacidad continuada de seleccionar cada vez mejor variantes de ADA de una forma iterativa, en donde una ADA de ensayo identificada en una iteración se usa como control en la siguiente iteración. Dicha realización requiere, sin embargo, que en cada iteración, se compruebe la producción del metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica en la célula hospedadora y aumente potencialmente (por ejemplo, aumentando o reduciendo los niveles de expresión de enzimas, añadiendo o quitando enzimas, aumentando o disminuyendo el número de copias de genes, reemplazando promotores que controlan la expresión de las enzimas o alterando enzimas por mutación genética) a un nivel que produzca una viabilidad reducida cuando la célula hospedadora expresa la nueva ADA de control (es decir, la ADA de ensayo de la iteración previa). Como alternativa o además, en cada iteración, la expresión de la ADA de control puede reducirse (por ejemplo, reduciendo la expresión o usando promotores más débiles o reduciendo la estabilidad del transcrito de ADA de control o el polipéptido) para proporcionar una actividad ADA de control reducida. En la siguiente iteración, puede identificarse entonces una ADA de ensayo que haya aumentado el rendimiento *in vivo* en comparación con la ADA de ensayo de la iteración previa.

Otra ventaja importante del método de selección desvelado en el presente documento es que la selección de ADA mejorada se produce *in vivo* en lugar de *in vitro*. Como resultado, pueden obtenerse mejoras de múltiples propiedades enzimáticas que aumentan el rendimiento *in vivo* de la variante de ADA.

Las enzimas desarrolladas usando el método de selección desvelado en el presente documento pueden someterse a medios adicionales de selección opcional incluyendo, pero sin limitación, una selección fluorescente y/o una cuantificación directa del metabolito secundario derivado de acetil-CoA citosólica por cromatografía de gases. Más específicamente, esto incluye un ensayo fluorescente de alto rendimiento basado en Rojo Nilo para medir la producción de un sesquiterpeno tal como farneseno, y un método de cuantificación directo basado en cromatografía de gases (CG) para medir el título de un sesquiterpeno tal como farneseno. Las enzimas mejoradas también pueden mejorarse adicionalmente por procedimientos de ingeniería genética tales como mutaciones inducidas y similares. Como resultado, sucesivamente se consiguen mejoras de múltiples propiedades enzimáticas que aumentan el rendimiento final de la enzima, y se identifican las variantes de enzima más eficaces.

5.2.3 Alteración funcional del bypass de PDH

La acetil-CoA puede formarse en las mitocondrias por descarboxilación oxidativa de piruvato catalizada por el complejo PDH. Sin embargo, debido a la incapacidad de *S. cerevisiae* de transportar acetil-CoA hacia el exterior de la mitocondria, el bypass de PDH tiene un papel esencial al proporcionar acetil-CoA en el compartimento citosólico y proporciona una ruta alternativa a la reacción de PDH para la conversión de piruvato en acetil-CoA. El bypass de PDH implica a las enzimas piruvato descarboxilasa (PDC; EC 4.1.1.1), acetaldehído deshidrogenasa (ACDH; EC 1.2.1.5 y EC 1.2.1.4), y acetil-CoA sintetasa (ACS; EC 6.2.1.1). La piruvato descarboxilasa cataliza la descarboxilación de piruvato a acetaldehído y dióxido de carbono. La acetaldehído deshidrogenasa oxida el acetaldehído a ácido acético. En *S. cerevisiae*, la familia de aldehído deshidrogenasas contiene cinco miembros. *ALD2* (YMR170c), *ALD3* (YMR169c) y *ALD6* (YPL061w) corresponden a las isoformas citosólicas, mientras que *ALD4* (YOR374w) y *ALD5* (YER073w) codifican la enzima mitocondrial. La isoforma de acetaldehído deshidrogenasa citosólica principal se codifica por *ALD6*. La formación de acetil-CoA a partir de acetato se cataliza por ACS e implica la hidrólisis de ATP. Dos genes estructurales, *ACS1* y *ACS2*, codifican ACS.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una alteración funcional en uno o más genes de la ruta de bypass de PDH. En algunas realizaciones, la alteración de dichos uno o más genes del bypass de PDH de la célula hospedadora da como resultado una célula microbiana modificada genéticamente que tiene impedida su capacidad de catalizar una o más de las siguientes reacciones: (1) la descarboxilación de piruvato en acetaldehído por la piruvato descarboxilasa; (2) la conversión de acetaldehído en acetato por la acetaldehído deshidrogenasa; y (3) la síntesis de acetil-CoA a partir de acetato y CoA por la acetil-CoA sintetasa.

En algunas realizaciones, en comparación con una célula parental, una célula hospedadora comprende una alteración funcional en uno o más genes de la ruta de bypass de PDH, en donde la actividad de la ruta de bypass de PDH de función reducida o no funcional sola o en combinación con una ADA débil no es suficiente para soportar el crecimiento, la viabilidad y/o la salud de la célula hospedadora.

En algunas realizaciones, la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas del bypass de PDH se reduce en al menos aproximadamente un 50 %. En otra realización, la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas del bypass de PDH se reduce en al menos aproximadamente un 60 %, en al menos aproximadamente un 65 %, en al menos aproximadamente un 70 %, en al menos aproximadamente un 75 %, en al menos aproximadamente un 80 %, en al menos aproximadamente un 85 %, en al menos aproximadamente un 90 %, en al menos aproximadamente un 95 %, o en al menos aproximadamente un 99 % en comparación con un microorganismo recombinante que no comprende una reducción o delección de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas del bypass de PDH.

Como entienden los expertos en la materia, hay varios mecanismos disponibles para reducir o alterar la actividad de una proteína, tales como una proteína de la ruta de PDH, incluyendo, pero sin limitación, el uso de un promotor regulado, el uso de un promotor constitutivo débil, la alteración de una de las dos copias del gen que codifica la proteína en una levadura diploide, la alteración de dos copias del gen en una levadura diploide, la expresión de un ácido nucleico antisentido, la expresión de un siRNA (siglas en inglés de ARN pequeño de interferencia), la sobreexpresión de un regulador negativo del promotor endógeno, la alteración de la actividad de un gen endógeno o heterólogo, el uso de un gen heterólogo con una menor actividad específica, similares o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una mutación en al menos un gen que codifica una proteína del bypass de PDH, dando como resultado una reducción de la actividad de un polipéptido codificado por dicho gen. En otra realización, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una delección parcial del gen que codifica una proteína del bypass de PDH, dando como resultado una reducción de la actividad de un polipéptido codificado por el gen. En otra realización, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una delección completa de un gen que codifica una proteína del bypass de PDH, dando como resultado una reducción de la actividad de un polipéptido codificado por el gen. En otra realización, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una modificación de la región reguladora asociada con el gen que codifica una proteína del bypass de PDH, dando como resultado una reducción de la expresión de un polipéptido codificado por dicho gen. En otra realización, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una modificación del regulador de la transcripción que da como resultado una reducción de la transcripción de un gen que codifica una proteína del bypass de PDH. En otra realización, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende mutaciones en todos los genes que codifican una proteína del bypass de PDH dando como resultado una reducción de la actividad de un polipéptido codificado por el gen o los genes. En una realización, la actividad o expresión de la proteína del bypass de PDH se reduce al menos en aproximadamente un 50 %. En otra realización, la actividad o expresión de la proteína del bypass de PDH se reduce en al menos en aproximadamente un 60 %, en al menos aproximadamente un 65 %, en al menos aproximadamente un 70 %, en al menos aproximadamente un 75 %, en al menos aproximadamente un 80 %, en al menos aproximadamente un 85 %, en al menos aproximadamente un 90 %, en al menos aproximadamente un 95 %, o en al menos aproximadamente un 99 % en comparación con un microorganismo recombinante que no comprende una reducción de la actividad o expresión de la proteína del bypass de PDH.

En algunas realizaciones, la alteración de uno o más genes del bypass de PDH se consigue usando una "construcción de alteración" que es capaz de alterar específicamente un gen del bypass de PDH tras la introducción de la construcción en la célula microbiana, haciendo de esta manera que el gen alterado no sea funcional. En algunas realizaciones, la alteración del gen diana impide la expresión de una proteína funcional. En algunas realizaciones, la alteración del gen diana da como resultado la expresión de una proteína no funcional a partir del gen alterado. En algunas realizaciones, la alteración de un gen del bypass de PDH se consigue por integración de una "secuencia de alteración" dentro del locus del gen diana por recombinación homóloga. En dichas realizaciones, la construcción de alteración comprende una secuencia de alteración flanqueada por un par de secuencias de nucleótidos que son homólogas a un par de secuencias de nucleótidos del locus del gen diana (secuencias homólogas). Tras el reemplazo de la parte establecida como diana del gen diana por la construcción de alteración, la secuencia de alteración impide la expresión de una proteína funcional, o provoca la expresión de una proteína no funcional, a partir de ese gen diana.

Las construcciones de alteración capaces de alterar un gen del bypass de PDH pueden construirse usando técnicas de biología molecular convencionales bien conocidas en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning -- A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel et al., eds., Edición Actual, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, NY. Los parámetros de construcciones de alteración que pueden variarse en la práctica de los presentes métodos incluyen, pero sin limitación, las longitudes de las secuencias homólogas; la secuencia de nucleótidos de las secuencias homólogas; la longitud de la secuencia de alteración; la secuencia de nucleótidos de la secuencia de alteración; y la secuencia de nucleótidos del gen diana. En algunas realizaciones, un intervalo eficaz para la longitud de cada secuencia homóloga es de 50 a 5.000 pares de bases. En realizaciones particulares, la longitud de cada secuencia homóloga es de aproximadamente 500 pares de bases. Para un análisis de la longitud de homología necesaria para la dirección de genes, véase Hasty et al., Mol Cell Biol 11: 5586-91 (1991). En algunas realizaciones, las secuencias homólogas comprenden secuencias codificantes del gen diana. En otras realizaciones, las secuencias homólogas comprenden secuencias cadena arriba o cadena abajo de ese gen diana. En algunas realizaciones, una secuencia homóloga comprende una secuencia de nucleótidos que es homóloga a una secuencia de nucleótidos localizada en posición 5' de la secuencia codificante del gen diana, y la otra secuencia homóloga comprende una secuencia de nucleótidos que es homóloga a una secuencia de nucleótidos localizada en posición 3' de la secuencia codificante del gen diana. En algunas realizaciones, la secuencia de alteración comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección que permite la selección de células microbianas que comprenden la secuencia de alteración. De esta manera, en dichas realizaciones, La construcción de alteración tiene doble función, es decir, alterar funcionalmente el gen diana y proporcionar un marcador de selección para la identificación de células en las que el gen diana está alterado funcionalmente. En algunas realizaciones, un codón de terminación se coloca en fase con y cadena abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica el marcador de selección para impedir la lectura traduccional que podría producir una proteína de fusión con algún grado de actividad de la proteína de tipo silvestre codificada por el gen diana. En algunas realizaciones, la longitud de la secuencia de alteración es un par de bases. La inserción de un solo par de bases puede ser suficiente para alterar un gen diana porque la inserción del único par de bases en una secuencia codificante podría constituir una mutación de desplazamiento de fase que impediría la expresión de una proteína funcional. En algunas realizaciones, la secuencia de secuencia de alteración difiere de la secuencia de nucleótidos del gen diana localizado entre las secuencias homólogas por un solo par de bases. Tras el reemplazo de la secuencia de nucleótidos dentro del gen diana con la secuencia de alteración, la sustitución del par de bases único que se introduce podría dar como resultado una sustitución de un solo aminoácido en un sitio crítico de la proteína y la expresión de una proteína no funcional. Debe reconocerse, sin embargo, que las alteraciones efectuadas usando secuencias de alteración muy cortas son susceptibles de reversión a la secuencia de tipo silvestre mediante mutación espontánea, conduciendo de esta forma a la restauración de la función de bypass de PDH en la célula hospedadora. Por consiguiente, en realizaciones particulares, las secuencias de alteración son más largas que uno a unos pocos pares de bases. En el otro extremo, es poco probable que una secuencia de alteración con una longitud excesiva confiera ninguna ventaja sobre una secuencia de alteración de una longitud moderada, y podría disminuir la eficacia de la transfección o dirección. Una longitud excesiva en este contexto es muchas veces más larga que la distancia entre las secuencias homólogas elegidas en el gen diana. De esta manera, en ciertas realizaciones, la longitud de la secuencia de alteración puede ser de 2 a 2.000 pares de bases. En otras realizaciones, la longitud de la secuencia de alteración es una longitud aproximadamente equivalente a la distancia entre las regiones del locus del gen diana que corresponde a las secuencias homólogas en la construcción de alteración.

En algunas realizaciones, la construcción de alteración es una molécula de ADN lineal. En otras realizaciones, la construcción de alteración es una molécula de ADN circular. En algunas realizaciones, la construcción de alteración circular comprende un par de secuencias homólogas separadas por una secuencia de alteración, como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la construcción de alteración circular comprende una única secuencia homóloga. Dichas construcciones de alteración circulares, tras la integración en el locus del gen diana, se linealizarían, con una parte de la secuencia homóloga colocada en cada extremo y los segmentos restantes de la construcción de alteración insertándose dentro y alterando el gen diana sin reemplazar ninguna de las secuencias de nucleótidos del gen diana. En realizaciones particulares, La única secuencia homóloga de una construcción de alteración circular es homóloga a una secuencia localizada dentro de la secuencia codificante del gen diana.

Las construcciones de alteración pueden introducirse en una célula microbiana por cualquier método conocido para un experto en la materia sin limitación. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, la captación directa de la molécula por una célula que en solución, o la captación facilitada a través de lipofección usando, *por ejemplo*, liposomas o inmunoliposomas; transfección mediada por partículas; etc. véase, *por ejemplo*, la Patente de Estados Unidos n.º 5.272.065; Goeddel et al., eds, 1990, Methods in Enzymology, vol. 185, Academic Press, Inc., CA; Krieger, 1990, Gene Transfer and Expression -- A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning -- A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY; y Ausubel et al., eds., Edición Actual, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, NY. En la técnica son bien conocidos métodos particulares para transformar células de levadura. Véase Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1292-3 (1978); Cregg et al., Mol. Cell. Biol. 5:3376-3385 (1985). Las técnicas ejemplares incluyen, pero sin limitación, formación de esferoplastos, electroporación, transformación mediada por PEG 1000 y transformación mediada por acetato de litio o cloruro de litio.

5.2.3.1 ALD4 y ALD6

En algunas realizaciones, en la célula hospedadora están alterados funcionalmente uno o más genes que codifican la actividad aldehído deshidrogenasa (ACDH). En algunas realizaciones, la aldehído deshidrogenasa se codifica por un gen seleccionado del grupo que consiste en ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6 y homólogos y variantes de los mismos.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una alteración funcional de ALD4. Las secuencias de nucleótidos de *ALD4* representativas de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen los números de registro NM_001183794 y SEQ ID NO: 7 como se proporcionan en el presente documento. Las secuencias de la proteína Ald4 representativas de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen el número de registro NP_015019.1 y la SEQ ID NO: 8 como se proporciona en el presente documento.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una alteración funcional de la aldehído deshidrogenasa citosólica (ALD6). Ald6p funciona en el bypass de PDH nativo convirtiendo el acetaldehído en acetato. Las secuencias de nucleótidos de *ALD6* representativas de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen el número de registro SCU56604, y la SEQ ID NO: 9 como se proporciona en el presente documento. Las secuencias de proteína Ald6 representativa de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen el número de registro AAB01219 y la SEQ ID NO: 10 como se proporciona en el presente documento.

Como se entenderá en la técnica, de forma similar pueden inactivarse homólogos naturales de la aldehído deshidrogenasa en levaduras distintas de *S. cerevisiae* usando los métodos descritos en el presente documento.

Como entenderán los expertos en la materia, puede reducirse o eliminarse la actividad o expresión de más de una aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, se reduce o elimina la actividad o expresión de ALD4 y ALD6 y homólogos o variantes de las mismas. En otra realización específica, se reduce o elimina la actividad o expresión de ALD5 y ALD6 y homólogos o variantes de las mismas. En otra realización específica adicional, se reduce o elimina la actividad o expresión de ALD4, ALD5 y ALD6 u homólogos o variantes de las mismas. En otra realización específica adicional, se reduce o elimina la actividad o expresión de las aldehído deshidrogenasas localizadas citosólicamente ALD2, ALD3 y ALD6 u homólogos o variantes de las mismas. En otra realización específica adicional, se reduce o elimina la actividad o expresión de las aldehído deshidrogenasas localizadas mitocondrialmente, ALD4 y ALD5 u homólogos o variantes de las mismas.

5.2.3.2 ACS1 y ACS2

En algunas realizaciones, uno o más genes que codifican la actividad acetil-CoA sintasa (ACS) están funcionalmente alterados en la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la acetil-CoA sintasa se codifica por un gen seleccionado del grupo que consiste en ACS1, ACS2, y homólogos y variantes de los mismos.

En algunas realizaciones, En la célula hospedadora están funcionalmente alterados uno o más genes que codifican la actividad acetil-CoA sintasa (ACS). Tanto la ACS1 como la ACS2 son acetil-CoA sintasas que pueden convertir el acetato en acetil-CoA. La ACS1 se expresa solo en condiciones respiratorias, mientras que la ACS2 se expresa constitutivamente. Cuando se inactiva la ACS2, las cepas son capaces de crecer en condiciones respiratorias (por ejemplo, medios con etanol, glicerol o acetato), pero mueren en fuentes de carbono fermentables (por ejemplo, sacarosa, glucosa).

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una alteración funcional de ACS1. La secuencia del gen *ACS1* de *S. cerevisiae* se ha descrito previamente. Véase, por ejemplo, Nagasu et al., Gene 37 (1-3):247-253 (1985). Las secuencias de nucleótidos de *ACS1* representativas de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen el número de registro X66425, y la SEQ ID NO: 3 como se proporciona en el presente documento. Las secuencias de proteína Acs1 representativas de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen el número de registro AAC04979 y la SEQ ID NO: 4 como se proporciona en el presente documento.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una alteración funcional de ACS2. La secuencia del gen *ACS2* de *S. cerevisiae* se ha descrito previamente. Véase, por ejemplo, Van den Berg et al., Eur. J. Biochem. 231(3):704-713 (1995). Las secuencias de nucleótidos de *ACS2* representativas de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen el número de registro S79456, y la SEQ ID NO: 5 como se proporciona en el presente documento. Las secuencias de proteína Acs2 representativas de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen el número de registro CAA97725 y la SEQ ID NO: 6 como se proporciona en el presente documento.

Como se entenderá en la técnica, de forma similar pueden inactivarse de forma similar homólogos naturales de acetil-CoA sintasa en levaduras distintas de *S. cerevisiae* usando los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una actividad acetil-CoA sintasa citosólica que puede convertir el acetato en acetil-CoA en condiciones respiratorias (es decir, cuando la célula hospedadora se cultiva en presencia de, por ejemplo, etanol, glicerol o acetato). En algunas de dichas realizaciones, la célula hospedadora es

una célula de levadura que comprende la actividad ACS1. En otras realizaciones, la célula hospedadora en comparación con una célula parental no comprende o comprende una actividad acetil-CoA sintasa endógena reducida en condiciones respiratorias. En algunas de dichas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de levadura que, en comparación con una célula parental, no comprende o comprende una actividad ACS1 reducida.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una actividad acetil-CoA sintasa citosólica que puede convertir el acetato en acetil-CoA en condiciones no respiratorias (es decir, cuando la célula hospedadora crece en presencia de fuentes de carbono fermentables (por ejemplo, sacarosa, glucosa)). En algunas de dichas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de levadura que comprende la actividad ACS2. En otras realizaciones, la célula hospedadora, en comparación con una célula parental, no comprende o comprende actividad acetil-CoA sintasa endógena reducida en condiciones no respiratorias. En algunas de dichas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de levadura que, en comparación con una célula parental, no comprende o comprende una actividad ACS2 reducida.

5.2.4 Fosfocetolasa (PK) y fosfotransacetilasa (PTA)

En levaduras, la acetil-CoA se biosintetiza a partir de glucosa a través de la glicólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), fosforilación oxidativa y el metabolismo de piruvato. Sin embargo, en esta ruta biosintética, se pierde CO₂ durante el metabolismo de piruvato por la piruvato carboxilasa y en el ciclo TCA por la piruvato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa. En un escenario de fermentación industrial, un efecto beneficioso de la reducción del flujo a través de una menor glicólisis es que se produce menos CO₂ al convertir el piruvato en acetaldehído y, de esta manera, puede capturarse más carbono en el producto final, aumentándose de esta manera el rendimiento teórico máximo. Un segundo efecto beneficioso es que se produce menos NADH y, por lo tanto, se necesita menos oxígeno para reoxidarlo. La pérdida de átomos de carbono teóricamente puede evitarse evitando el ciclo TCA. Esto puede conseguirse usando fosfocetolasa (PK) (clase enzimática EC 4.1.2.9, EC 4.1.2.22) junto con fosfoacetiltransferasa (PTA) (EC 2.3.1.8).

La PK y la PTA catalizan las reacciones para convertir fructosa-6-fosfato (F6P) o xilulosa-5-fosfato (X5P) en acetil-CoA (FIG. 7). La PK y procede del intermedio de pentosa fosfato xilulosa-5-fosfato, o del intermedio de la glicólisis superior D-fructosa-6-fosfato (F6P); PK divide X5P en gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y acetil fosfato, o F6P en eritrosa 4-fosfato (E4P). La PTA después convierte el acetil fosfato en acetil-CoA. G3P puede volver a entrar en la glicólisis secundaria, y E4P puede volver a entrar en la ruta de pentosa fosfato o en la glicólisis por ciclación a través de la red de rutas de pentosa fosfato no oxidativas de transaldolasas y transcetolasas.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente proporcionada en el presente documento comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una fosfocetolasa. En algunas realizaciones, la fosfocetolasa procede de *Leuconostoc mesenteroides* (Lee et al., Biotechnol Lett. 27(12):853-858 (2005). Las secuencias de nucleótidos de fosfocetolasa representativas de *Leuconostoc mesenteroides* incluyen el número de registro AY804190 y la SEQ ID NO: 11, como se proporcionan en el presente documento. Las secuencias de proteína fosfocetolasa representativas de *Leuconostoc mesenteroides* incluyen los números de registro YP_819405, AAV66077.1 y la SEQ ID NO:12 como se proporciona en el presente documento. Otras fosfocetolasas útiles incluyen, pero sin limitación, las de *Bifidobacterium dentium* ATCC 27678 (ABIX02000002.1:2350400..2352877; EDT46356.1); *Bifidobacterium animalis* (NC_017834.1:1127580..1130057; YP_006280131.1); y *Bifidobacterium pseudolongum* (AY518216.1:988..3465; AAR98788.1).

Las fosfocetolasas también útiles en las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento incluyen las moléculas que se dice que son "derivados" de cualquiera de las fosfocetolasas descritas en el presente documento. Dicho "derivado" tiene las siguientes características: (1) comparte una homología sustancial con cualquiera de las fosfocetolasas descritas en el presente documento; y (2) es capaz de catalizar la conversión de X5P en gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y acetil fosfato; o F6P en eritrosa 4-fosfato (E4P). Se dice que un derivado de una fosfocetolasa comparte una "homología sustancial" con la fosfocetolasa si la secuencia de aminoácidos del derivado es de al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 % y, más preferentemente, al menos un 95 %, igual que la de la fosfocetolasa.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente proporcionada en el presente documento comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una fosfotransacetilasa. En algunas realizaciones, la fosfotransacetilasa procede de *Clostridium kluyveri*. Las secuencias de nucleótidos de fosfotransacetilasa representativas de *Clostridium kluyveri* incluyen el número de registro NC_009706.1:1428554..1429555, y la SEQ ID NO: 13 como se proporciona en el presente documento. Las secuencias de proteína fosfotransacetilasa representativas de *Clostridium kluyveri* incluyen el número de registro YP_001394780 y la SEQ ID NO: 14 como se proporciona en el presente documento. Otras fosfotransacetilasas útiles incluyen, pero sin limitación, las de *Lactobacillus reuteri* (NC_010609.1:460303..461277; YP_001841389.10); *Bacillus subtilis* (NC_014479.1:3671865..3672836; YP_003868063.1); y *Methanosarcina thermophila* (L23147.1:207..1208; AAA72041.1).

Las fosfotransacetilasas también útiles en las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento incluyen las moléculas que se dice que son "derivados" de cualquiera de las fosfotransacetilasas descritas en el presente documento. Dicho "derivado" tiene las siguientes características: (1) comparte una homología sustancial con cualquiera de las fosfotransacetilasas descritas en el presente documento; y (2) es capaz de catalizar la conversión de acetil fosfato en acetil-CoA. Se dice que un derivado de una fosfotransacetilasa comparte una "homología sustancial" con la fosfotransacetilasa si las secuencias de aminoácidos del derivado son al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 % y, aún más preferentemente, al menos un 95 %, iguales que las de la fosfotransacetilasa.

5.2.5 Ruta de MEV

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una o más enzimas heterólogas de la ruta de MEV. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que condensa acetil-CoA con malonil-CoA para formar acetoacetil-CoA. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que condensa acetoacetil-CoA con acetil-CoA para formar HMG-CoA. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que convierte HMG-CoA en mevalonato. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que fosforila mevalonato para dar mevalonato 5-fosfato. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que convierte mevalonato 5-fosfato en mevalonato 5-pirofosfato. En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que convierte mevalonato 5-pirofosfato en isopentenil pirofosfato.

En algunas realizaciones, dichas una o más enzimas de la ruta de MEV se seleccionan del grupo que consiste en acetil-CoA tiolasa, acetoacetil-CoA sintasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa y mevalonato pirofosfato descarboxilasa. En algunas realizaciones, Con respecto a la enzima de la ruta de MEV capaz de catalizar la formación de acetoacetil-CoA, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una enzima que condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, *por ejemplo*, acetil-CoA tiolasa; o una enzima que condensa acetil-CoA con malonil-CoA para formar acetoacetil-CoA, *por ejemplo*, acetoacetil-CoA sintasa. En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende tanto una enzima que condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, *por ejemplo*, acetil-CoA tiolasa; como una enzima que condensa acetil-CoA con malonil-CoA para formar acetoacetil-CoA, *por ejemplo*, acetoacetil-CoA sintasa.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican más de una enzima de la ruta de MEV. En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican dos enzimas de la ruta de MEV. En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican una enzima que puede convertir la HMG-CoA en mevalonato y una enzima que puede convertir el mevalonato en mevalonato 5-fosfato. En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican tres enzimas de la ruta de MEV. En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican cuatro enzimas de la ruta de MEV. En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican cinco enzimas de la ruta de MEV. En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican seis enzimas de la ruta de MEV. En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican siete enzimas de la ruta de MEV. En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una pluralidad de ácidos nucleicos heterólogos que codifican todas las enzimas de la ruta de MEV.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que puede convertir isopentenil pirofosfato (IPP) en dimetilalil pirofosfato (DMAPP). En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que puede condensar moléculas de IPP y/o DMAPP para formar un compuesto de poliprenilo. En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que puede modificar IPP o un poliprenilo para formar un compuesto isoprenoide.

5.2.5.1 Conversión de acetil-CoA en acetoacetil-CoA

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima que puede condensar dos moléculas de acetil-coenzima A para formar acetoacetil-CoA, *por ejemplo*, una acetil-CoA tiolasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican dicha enzima incluyen, pero sin limitación: (NC_000913 REGION: 2324131,2325315; *Escherichia coli*), (D49362; *Paracoccus denitrificans*), y (L20428; *Saccharomyces cerevisiae*).

La acetil-CoA tiolasa cataliza la condensación reversible de dos moléculas de acetil-CoA para producir acetoacetil-CoA, pero esta reacción es termodinámicamente desfavorable; la tiolisis de acetoacetil-CoA está favorecida con respecto a la síntesis de acetoacetil-CoA. La acetoacetil-CoA sintasa (AACS) (denominada como alternativa acetil-CoA:malonil-CoA aciltransferasa; EC 2.3.1.194) condensa la acetil-CoA con malonil-CoA para formar acetoacetil-CoA. A diferencia de la acetil-CoA tiolasa, la síntesis de acetoacetil-CoA catalizada por AACS es esencialmente una reacción favorecida energéticamente, debido a la descarboxilación asociada de malonil-CoA. Además, AACS no presenta actividad de tiolisis contra la acetoacetil-CoA y, por lo tanto, la reacción es irreversible.

En células hospedadoras que comprenden una ADA heteróloga y acetil-CoA tiolasa, la reacción reversible catalizada por acetil-CoA tiolasa, que favorece la tiolisis de acetoacetil-CoA, puede dar como resultado una gran reserva de acetil-CoA. En vista de la actividad reversible de la ADA, esta reserva de acetil-CoA puede, a su vez, dirigir la ADA hacia la reacción inversa de conversión de acetil-CoA en acetaldehído, disminuyendo de esta manera los efectos beneficiosos proporcionados por la ADA hacia la producción de acetil-CoA. De esta manera, en algunas realizaciones, para proporcionar un fuerte impulso sobre la acetil-CoA para dirigir la reacción directa de la ADA, la ruta de MEV de la célula hospedadora modificada genéticamente proporcionada en el presente documento utiliza una acetoacetil-CoA sintasa para formar acetoacetil-CoA a partir de acetil-CoA y malonil-CoA.

En algunas realizaciones, la AACS procede de la cepa CL190 de *Streptomyces* sp. (Okamura et al., Proc Natl Acad Sci USA 107(25): 11265-70 (2010). Las secuencias de nucleótidos de AACS representativas de la cepa CL190 de *Streptomyces* sp. incluyen el número de registro AB540131.1 y la SEQ ID NO: 15, como se proporcionan en el presente documento. Las secuencias de la proteína AACS representativas de la cepa CL190 de *Streptomyces* sp. incluyen los números de registro D7URV0, BAJ10048 y la SEQ ID NO:16 como se proporciona en el presente documento. Otras acetoacetil-CoA sintasas útiles para las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, *Streptomyces* sp. (AB183750; KO-3988 BAD86806); *S. anulatus* cepa 9663 (FN178498; CAX48662); *Streptomyces* sp. KO-3988 (AB212624; BAE78983); *Actinoplanes* sp. A40644 (AB113568; BAD07381); *Streptomyces* sp. (NZ_ACEW010000640; ZP_05511702); *Nocardiopsis dassonvillei* DSM 43111 (NZ_ABUI01000023; ZP_04335288); *Mycobacterium ulcerans* Agy99 (NC_008611; YP_907152); *Mycobacterium marinum* M (NC_010612; YP_001851502); *Streptomyces* sp. Mg1 (NZ_DS570501; ZP_05002626); *Streptomyces* sp. AA4 (NZ_ACEV01000037; ZP_05478992); *S. roseosporus* NRRL 15998 (NZ_ABYB01000295; ZP_04696763); *Streptomyces* sp. ACTE (NZ_ADFD01000030; ZP_06275834); *S. viridochromogenes* DSM 40736 (NZ_ACEZ01000031; ZP_05529691); *Frankia* sp. Ccl3 (NC_007777; YP_480101); *Nocardia brasiliensis* (NC_018681; YP_006812440.1); y *Austwickia chelonae* (NZ_BAGZ01000005; ZP_10950493.1). Otras acetoacetil-CoA sintasas adecuadas incluyen las descritas en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2010/0285549 y 2011/0281315.

Las acetoacetil-CoA sintasas también útiles en las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento incluyen las moléculas que se dice que son "derivados" de cualquiera de las acetoacetil-CoA sintasas descritas en el presente documento. Dicho "derivado" tiene las siguientes características: (1) comparte una homología sustancial con cualquiera de las acetoacetil-CoA sintasas descritas en el presente documento; y (2) es capaz de catalizar la condensación irreversible de la acetil-CoA con malonil-CoA para formar acetoacetil-CoA. Se dice que un derivado de una acetoacetil-CoA sintasa comparte una "homología sustancial" con la acetoacetil-CoA sintasa si las secuencias de aminoácidos del derivado son al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 % y, aún más preferentemente, al menos un 95 %, iguales a las de la acetoacetil-CoA sintasa.

5.2.5.2 Conversión de acetoacetil-CoA en HMG-CoA

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima que puede condensar acetoacetil-CoA con otra molécula de acetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), *por ejemplo*, una HMG-CoA sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican dicha enzima incluyen, pero sin limitación: (NC_001145, complemento 19061.20536; *Saccharomyces cerevisiae*), (X96617; *Saccharomyces cerevisiae*), (X83882; *Arabidopsis thaliana*), (AB037907; *Kitasatospora griseola*), (BT007302; *Homo sapiens*), y (NC_002758, Locus tag SAV2546, GenelD 1122571; *Staphylococcus aureus*).

5.2.5.3 Conversión de HMG-CoA en mevalonato

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima que puede convertir HMG-CoA en mevalonato, *por ejemplo*, una HMG-CoA reductasa. En algunas realizaciones, la HMG-CoA reductasa es una hidroximetilglutaril-CoA reductasa-CoA reductasa que usa NADH. Las HMG-CoA reductasas (EC 1.1.1.34; EC 1.1.1.88) catalizan la desacilación reductora de (S)-HMG-CoA en (R)-mevalonato, y pueden clasificarse en dos clases, las HMGr de clase I y de clase II. La clase I incluye las enzimas de eucariotas y de la mayoría de las arqueas, y la clase II incluye las HMG-CoA reductasas de ciertos procariotas y arqueas. Además de la divergencia en las secuencias, las enzimas de las dos clases también difieren con respecto a su especificidad de cofactor. A diferencia de las enzimas de clase I, que utilizan NADPH exclusivamente, las HMG-CoA reductasas de clase II varían en la capacidad de distinguir entre NADPH y NADH. Véase, *por ejemplo*, Hedl et

al., Journal of Bacteriology 186 (7): 1927-1932 (2004). A continuación se proporcionan las especificidades de cofactor para seleccionar HMG-CoA reductasas de clase II.

Tabla 1. Especificidades de cofactor para seleccionar HMG-CoA reductasas de clase II

Fuente	Especificidad de coenzima	K_m^{NADPH} (μM)	K_m^{NADH} (μM)
<i>P. mevalonii</i>	NADH		80
<i>A. fulgidus</i>	NAD(P)H	500	160
<i>S. aureus</i>	NAD(P)H	70	100
<i>E. faecalis</i>	NADPH	30	

Las HMG-CoA reductasas útiles para las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento incluyen hMG-CoA reductasas que son capaces de utilizar NADH como cofactor, *por ejemplo*, la HMG-CoA reductasa de *P. mevalonii*, *A. fulgidus* o *S. aureus*. En realizaciones particulares, la HMG-CoA reductasa es capaz de utilizar solo NADH como cofactor, *por ejemplo*, la HMG-CoA reductasa de *P. mevalonii*, *S. pomeroyi* o *D. acidovorans*.

En algunas realizaciones, la HMG-CoA reductasa que usa NADH procede de *Pseudomonas mevalonii*. La secuencia del gen *mvaA* de tipo silvestre de *Pseudomonas mevalonii*, que codifica la HMG-CoA reductasa (E.C. 1.1.1.88), se ha descrito previamente. Véase Beach y Rodwell, J. Bacteriol. 171:2994-3001 (1989). Las secuencias de nucleótidos representativas de *mvaA* de *Pseudomonas mevalonii* incluyen el número de registro M24015 y la SEQ ID NO: 17 como se proporciona en el presente documento. Las secuencias representativas de la proteína HMG-CoA reductasa de *Pseudomonas mevalonii* incluyen los números de registro AAA25837, P13702, MVAA_PSEMV y la SEQ ID NO: 18 como se proporciona en el presente documento.

En algunas realizaciones, la HMG-CoA reductasa que usa NADH procede de *Silicibacter pomeroyi*. Las secuencias de nucleótidos representativas de la HMG-CoA reductasa de *Silicibacter pomeroyi* incluyen el número de registro NC_006569.1 y la SEQ ID NO: 19 como se proporciona en el presente documento. Las secuencias representativas de la proteína HMG-CoA reductasa de *Silicibacter pomeroyi* incluyen el número de registro YP_164994 y la SEQ ID NO: 20 como se proporciona en el presente documento.

En algunas realizaciones, la HMG-CoA reductasa que usa NADH procede de *Delftia acidovorans*. Una secuencia de nucleótidos representativa de la HMG-CoA reductasa de *Delftia acidovorans* incluye NC_010002 REGION: complemento (319980..321269) y la SEQ ID NO: 21 como se proporciona en el presente documento. Las secuencias de proteína representativas de la HMG-CoA reductasa de *Delftia acidovorans* incluyen el número de registro YP_001561318 y la SEQ ID NO: 22 como se proporciona en el presente documento.

En algunas realizaciones, las HMG-CoA reductasas que usan NADH proceden de *Solanum tuberosum* (Crane et al., J. Plant Physiol. 159:1301-1307 (2002)).

Las HMG-CoA reductasas que usan NADH también útiles en las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento incluyen las moléculas que se dice que son "derivados" de cualquiera de las HMG-CoA reductasas que usan NADH descritas en el presente documento, *por ejemplo*, de *P. mevalonii*, *S. pomeroyi* y *D. acidovorans*. Dicho "derivado" tiene las siguientes características: (1) comparte una homología sustancial con cualquiera de las HMG-CoA reductasas que usan NADH descritas en el presente documento; y (2) es capaz de catalizar la desacilación reductora de (S)-HMG-CoA en (R)-mevalonato mientras que usa preferentemente NADH como cofactor. Se dice que un derivado de una HMG-CoA reductasa que usa NADH comparte una "homología sustancial" con la HMG-CoA reductasa que usa NADH si las secuencias de aminoácidos del derivado son al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 %, y aún más preferentemente al menos un 95 %, iguales que la de la HMG-CoA reductasa que usa NADH.

Como se usa en el presente documento, la frase "que usa NADH" significa que la HMG-CoA reductasa que usa NADH es selectiva para NADH con respecto a NADPH como cofactor, *por ejemplo*, al demostrar una mayor actividad específica para NADH que para NADPH. En algunas realizaciones, la selectividad por NADH como cofactor se expresa como una relación $k_{cat}^{(NADH)}/k_{cat}^{(NADPH)}$. En algunas realizaciones, la HMG-CoA reductasa que usa NADH tiene una relación $k_{cat}^{(NADH)}/k_{cat}^{(NADPH)}$ de al menos 5, 10, 15, 20, 25 o más de 25. En algunas realizaciones, la HMG-CoA reductasa que usa NADH usa NADH exclusivamente. *Por ejemplo*, una HMG-CoA reductasa que usa NADH que usa NADH exclusivamente presenta alguna actividad con NADH suministrado como único cofactor *in vitro* (véase, *por ejemplo*, el Ejemplo 1 y la Sección 6.1.1.3 presentada más adelante) y no presenta actividad detectable cuando se suministra NADPH como único cofactor. Para identificar HMG-CoA reductasas que tienen una preferencia por NADH como cofactor, puede utilizarse cualquier método para determinar la especificidad del cofactor conocido en la técnica, incluyendo los descritos por Kim et al., Protein Science 9:1226-1234 (2000); y Wilding et al., J. Bacteriol. 182(18):5147-52 (2000).

En algunas realizaciones, la HMG-CoA reductasa que usa NADH se modifica por ingeniería genética para ser selectiva por NADH con respecto a NADPH, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida de la cavidad de unión al cofactor. Se describen métodos para modificar por ingeniería genética la selectividad por NADH en Watanabe et al., Microbiology 153:3044-3054 (2007), y se describen métodos para determinar la especificidad de cofactor de HMG-CoA reductasas en Kim et al., Protein Sci. 9:1226-1234 (2000).

En algunas realizaciones, la HMG-CoA reductasa que usa NADH procede de una especie de hospedador que comprende de forma nativa una ruta de degradación de mevalonato, por ejemplo, una especie hospedadora que cataboliza mevalonato como su única fuente de carbono. Dentro de estas realizaciones, la HMG-CoA reductasa que usa NADH, que normalmente cataliza la acilación oxidativa de (R)-mevalonato internalizado en (S)-HMG-CoA dentro de su célula hospedadora nativa, se utiliza para catalizar la reacción inversa, es decir, la desacilación reductora de (S)-HMG-CoA en (R)-mevalonato, en una célula hospedadora modificada genéticamente que comprende una ruta biosintética de mevalonato. Se han descrito procariotas capaces de crecer en mevalonato como única fuente de carbono por: Anderson et al., J. Bacteriol. 171(12):6468-6472 (1989); Beach et al., J. Bacteriol. 171:2994-3001 (1989); Bensch et al., J. Biol. Chem. 245:3755-3762; Fimongnari et al., Biochemistry 4:2086-2090 (1965); Siddiqi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 8:110-113 (1962); Siddiqi et al., J. Bacteriol. 93:207-214 (1967); y Takatsuji et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 110:187-193 (1983).

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la célula hospedadora comprende tanto una HMGr que usa NADH como una HMG-CoA reductasa que usa NADPH. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican una HMG-CoA reductasa que usa NADPH incluyen, pero sin limitación: (NM_206548; *Drosophila melanogaster*), (NC_002758, Locus tag SAV2545, GeneID 1122570; *Staphylococcus aureus*), (AB015627; *Streptomyces* sp. KO 3988), (AX128213, que proporciona la secuencia que codifica una HMG-CoA reductasa truncada; *Saccharomyces cerevisiae*), y (NC_001145: complemento 115734.118898; *Saccharomyces cerevisiae*).

5.2.5.4 Conversión de mevalonato en mevalonato-5-fosfato

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima que puede convertir mevalonato en mevalonato 5-fosfato, *por ejemplo*, una mevalonato quinasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican dicha enzima incluyen, pero sin limitación: (L77688; *Arabidopsis thaliana*), y (X55875; *Saccharomyces cerevisiae*).

5.2.5.5 Conversión de mevalonato-5-fosfato en mevalonato-5-pirofosfato

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima que puede convertir mevalonato 5-fosfato en mevalonato 5-pirofosfato, *por ejemplo*, una fosfomevalonato quinasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican dicha enzima incluyen, pero sin limitación: (AF429385; *Hevea brasiliensis*), (NM_006556; *Homo sapiens*), y (NC_001145: complemento 712315.713670; *Saccharomyces cerevisiae*).

5.2.5.6 Conversión de mevalonato-5-pirofosfato en IPP

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima que puede convertir mevalonato 5-pirofosfato en isopentenil difosfato (IPP), *por ejemplo*, una mevalonato pirofosfato descarboxilasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican dicha enzima incluyen, pero sin limitación: (X97557; *Saccharomyces cerevisiae*), (AF290095; *Enterococcus faecium*), y (U49260; *Homo sapiens*).

5.2.5.7 Conversión de IPP en DMAPP

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima que puede convertir el IPP generado a través de la ruta de MEV en dimetilalil pirofosfato (DMAPP), *por ejemplo*, una IPP isomerasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican dicha enzima incluyen, pero sin limitación: (NC_000913, 3031087.3031635; *Escherichia coli*), y (AF082326; *Haematococcus pluvialis*).

5.2.5.8 Poliprenil sintasas

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende además una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una poliprenil sintasa que puede condensar moléculas de IPP y/o DMAPP para formar compuestos de poliprenilo que contienen más de cinco carbonos.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima que puede condensar una molécula de IPP con una molécula de DMAPP para formar una molécula de geranil pirofosfato ("GPP"), *por ejemplo*, una GPP sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos

que codifican dicha enzima incluyen, pero sin limitación: (A513111; *Abies grandis*), (AF513112; *Abies grandis*), (AF513113; *Abies grandis*), (AY534686; *Antirrhinum majus*), (AY534687; *Antirrhinum majus*), (Y17376; *Arabidopsis thaliana*), (AE016877, Locus AP11092; *Bacillus cereus*; ATCC 14579), (AJ243739; *Citrus sinensis*), (AY534745; *Clarkia breweri*), (AY953508; *Ips pini*), (DQ286930; *Lycopersicon esculentum*), (AF182828; *Mentha x piperita*), (AF182827; *Mentha x piperita*), (MPI249453; *Mentha x piperita*), (PZE431697, Locus CAD24425; *Paracoccus zeaxanthinifaciens*), (AY866498; *Picrorhiza kurrooa*), (AY351862; *Vitis vinifera*), y (AF203881, Locus AAF12843; *Zymomonas mobilis*).

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima que puede condensar dos moléculas de IPP con una molécula de DMAPP, o añadir una molécula de IPP a una molécula de GPP, para formar una molécula de farnesil pirofosfato ("FPP"), por ejemplo, una FPP sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican dicha enzima incluyen, pero sin limitación: (ATU80605; *Arabidopsis thaliana*), (ATHFPS2R; *Arabidopsis thaliana*), (AAU36376; *Artemisia annua*), (AF461050; *Bos taurus*), (D00694; *Escherichia coli* K-12), (AE009951, Locus AAL95523; *Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum* ATCC 25586), (GFFPPSGEN; *Gibberella fujikuroi*), (CP000009, Locus AAW60034; *Gluconobacter oxydans* 621H), (AF019892; *Helianthus annuus*), (HUMFAPS; *Homo sapiens*), (KLPFPSQCR; *Kluyveromyces lactis*), (LAU15777; *Lupinus albus*), (LAU20771; *Lupinus albus*), (AF309508; *Mus musculus*), (NCFPPSGEN; *Neurospora crassa*), (PAPS1; *Parthenium argentatum*), (PAFPS2; *Parthenium argentatum*), (RATFAPS; *Rattus norvegicus*), (YSCFPP; *Saccharomyces cerevisiae*), (D89104; *Schizosaccharomyces pombe*), (CP000003, Locus AAT87386; *Streptococcus pyogenes*), (CP000017, Locus AAZ51849; *Streptococcus pyogenes*), (NC_008022, Locus YP_598856; *Streptococcus pyogenes* MGAS10270), (NC_008023, Locus YP_600845; *Streptococcus pyogenes* MGAS2096), (NC_008024, Locus YP_602832; *Streptococcus pyogenes* MGAS10750), (MZEFP; *Zea mays*), (AE000657, Locus AAC06913; *Aquifex aeolicus* VF5), (NM_202836; *Arabidopsis thaliana*), (D84432, Locus BAA12575; *Bacillus subtilis*), (U12678, Locus AAC28894; *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110), (BACFDPS; *Geobacillus stearothermophilus*), (NC_002940, Locus NP_873754; *Haemophilus ducreyi* 35000HP), (L42023, Locus AAC23087; *Haemophilus influenzae* Rd KW20), (J05262; *Homo sapiens*), (YP_395294; *Lactobacillus sakei subsp. sakei* 23K), (NC_005823, Locus YP_000273; *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130), (AB003187; *Micrococcus luteus*), (NC_002946, Locus YP_208768; *Neisseria gonorrhoeae* FA 1090), (U00090, Locus AAB91752; *Rhizobium* sp. NGR234), (J05091; *Saccharomyces cerevisiae*), (CP000031, Locus AAV93568; *Silicibacter pomeroyi* DSS-3), (AE008481, Locus AAK99890; *Streptococcus pneumoniae* R6) y (NC_004556, Locus NP_779706; *Xylella fastidiosa* Temecula1).

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende además una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima que puede combinar IPP y DMAPP o IPP y FPP para formar geranilgeranil pirofosfato ("GGPP"). Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican dicha enzima incluyen, pero sin limitación: (ATHGERPYRS; *Arabidopsis thaliana*), (BT005328; *Arabidopsis thaliana*), (NM_119845; *Arabidopsis thaliana*), (NZ_AAJM01000380, Locus ZP_00743052; *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis, ATCC 35646 sq1563), (CRGGPPS; *Catharanthus roseus*), (NZ_AABF02000074, Locus ZP_00144509; *Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii*, ATCC 49256), (GFGGPPSGN; *Gibberella fujikuroi*), (AY371321; *Ginkgo biloba*), (AB055496; *Hevea brasiliensis*), (AB017971; *Homo sapiens*), (MC1276129; *Mucor circinelloides f. lusitanicus*), (AB016044; *Mus musculus*), (AABX01000298, Locus NCU01427; *Neurospora crassa*), (NCU20940; *Neurospora crassa*), (NZ_AAKL01000008, Locus ZP_00943566; *Ralstonia solanacearum* UW551), (AB118238; *Rattus norvegicus*), (SCU31632; *Saccharomyces cerevisiae*), (AB016095; *Synechococcus elongatus*), (SAGGPS; *Sinapis alba*), (SSOGDS; *Sulfolobus acidocaldarius*), (NC_007759, Locus YP_461832; *Syntrophus aciditrophicus* SB), (NC_006840, Locus YP_204095; *Vibrio fischeri* ES 114), (NM_112315; *Arabidopsis thaliana*), (ERWCRT; *Pantoea agglomerans*), (D90087, Locus BAA14124; *Pantoea ananatis*), (X52291, Locus CAA36538; *Rhodobacter capsulatus*), (AF195122, Locus AAF24294; *Rhodobacter sphaeroides*), y (NC_004350, Locus NP_721015; *Streptococcus mutans* UA159).

5.2.5.9 Síntesis de terpeno

En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende además una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una enzima que puede modificar un poliprenilo para formar un hemiterpeno, un monoterpeno, un sesquiterpeno, un diterpeno, un triterpeno, un tetraterpeno, un politerpeno, un compuesto esteroide, un carotenoide o un compuesto de isoprenoide modificado.

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una careno sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (AF461460, REGION 43.1926; *Picea abies*) y (AF527416, REGION: 78,1871; *Salvia stenophylla*).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una geraniol sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (AJ457070; *Cinnamomum tenuipilum*), (AY362553; *Ocimum basilicum*), (DQ234300; *Perilla frutescens* cepa 1864), (DQ234299; *Perilla citriodora* cepa 1861), (DQ234298; *Perilla citriodora* cepa 4935), y (DQ088667; *Perilla citriodora*).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una linalool sintasa. Los ejemplos ilustrativos de una secuencia de nucleótidos adecuada incluyen, pero sin limitación: (AF497485; *Arabidopsis thaliana*), (AC002294, Locus AAB71482; *Arabidopsis thaliana*), (AY059757; *Arabidopsis thaliana*), (NM_104793; *Arabidopsis thaliana*), (AF154124; *Artemisia annua*), (AF067603; *Clarkia breweri*), (AF067602; *Clarkia concinna*), (AF067601; *Clarkia breweri*), (U58314; *Clarkia breweri*), (AY840091; *Lycopersicon esculentum*), (DQ263741; *Lavandula angustifolia*), (AY083653; *Mentha citrate*), (AY693647; *Ocimum basilicum*), (XM_463918; *Oryza sativa*), (AP004078, Locus BAD07605; *Oryza sativa*), (XM_463918, Locus XP_463918; *Oryza sativa*), (AY917193; *Perilla citriodora*), (AF271259; *Perilla frutescens*), (AY473623; *Picea abies*), (DQ195274; *Picea sitchensis*), y (AF444798; *Perilla frutescens* var. *crispa* cultivar No. 79).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una limoneno sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (+)-limoneno sintasas (AF514287, REGION: 47,1867; *Citrus limon*) y (AY055214, REGION: 48,1889; *Agastache rugosa*) y (-)-limoneno sintasas (DQ195275, REGION: 1,1905; *Picea sitchensis*), (AF006193, REGION: 73,1986; *Abies grandis*), y (MHC4SLSP, REGION: 29,1828; *Mentha spicata*).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una mirceno sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (U87908; *Abies grandis*), (AY195609; *Antirrhinum majus*), (AY195608; *Antirrhinum majus*), (NM_127982; *Arabidopsis thaliana* TPS10), (NM_113485; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (NM_113483; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (AF271259; *Perilla frutescens*), (AY473626; *Picea abies*), (AF369919; *Picea abies*), y (AJ304839; *Quercus ilex*).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una ocimeno sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (AY195607; *Antirrhinum majus*), (AY195609; *Antirrhinum majus*), (AY195608; *Antirrhinum majus*), (AK221024; *Arabidopsis thaliana*), (M_113485; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (NM_113483; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (NM_117775; *Arabidopsis thaliana* ATTPS03), (NM_001036574; *Arabidopsis thaliana* ATTPS03), (NM_127982; *Arabidopsis thaliana* TPS10), (AB110642; *Citrus unshiu* CitMTSL4), y (AY575970; *Lotus corniculatus* var. *japonicus*).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una α -pineno sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (+) α -pineno sintasa (AF543530, REGION: 1,1887; *Pinus taeda*), (-) α -pineno sintasa (AF543527, REGION: 32,1921; *Pinus taeda*), y (+)/(-) α -pineno sintasa (AGU87909, REGION: 6111892; *Abies grandis*).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una β -pineno sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (-) β -pineno sintasas (AF276072, REGION: 1,1749; *Artemisia annua*) y (AF514288, REGION: 26,1834; *Citrus limon*).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una sabineno sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de nucleótidos adecuada incluye, pero sin limitación, AF051901, REGION: 26.1798 de *Salvia officinalis*.

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una γ -terpineno sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen: (AF514286, REGION: 30.1832 de *Citrus limon*) y (AB110640, REGION 1.1803 de *Citrus unshiu*).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una terpinoleno sintasa. Los ejemplos ilustrativos de una secuencia de nucleótidos adecuada incluyen, pero sin limitación: (AY693650 de *Ocimum basilicum*) y (AY906866, REGION: 10.1887 de *Pseudotsuga menziesii*).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una amorfadieno sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de nucleótidos adecuada es la SEQ ID NO. 37 de la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2004/0005678.

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una α -farneseno sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación, DQ309034 de *Pyrus communis* cultivar d'Anjou (pera; nombre del gen AFS1) y AY182241 de *Malus domestica* (manzana; gen AFS1). Pechouus et al., Planta 219(1): 84-94 (2004).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una β -farneseno sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación, el número de registro AF024615 de *Mentha x piperita* (menta; gen Tspa11) y AY835398 de *Artemisia annua*. Picaud et al., Phytochemistry 66(9): 961-967 (2005).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una farnesol sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación, el número de registro AF529266 de *Zea mays* e YDR481C de *Saccharomyces cerevisiae* (gen Pho8). Song, L., Applied Biochemistry and Biotechnology 128:149-158 (2006).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una nerolidol sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de nucleótidos adecuada incluye, pero sin limitación, AF529266 de *Zea mays* (maíz; gen tps1).

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una patchouliol sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación AY508730 REGION: 1.1659 de *Pogostemon cablin*.

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una nootkatona sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación AF441124 REGION: 1.1647 de *Citrus sinensis* y AY917195 REGION: 1.1653 de *Perilla frutescens*.

En algunas realizaciones, el nucleótido heterólogo codifica una abietadieno sintasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (U50768; *Abies grandis*) y (AY473621; *Picea abies*).

En algunas realizaciones, la célula hospedadora produce un isoprenoide C₅. Estos compuestos proceden de una unidad de isopreno y también se denominan hemiterpenos. Un ejemplo ilustrativo de un hemiterpeno es isopreno. En otras realizaciones, el isoprenoide es un isoprenoide C₁₀. Estos compuestos proceden de dos unidades de isopreno y también se denominan monoterpenos. Son ejemplos ilustrativos de monoterpenos limoneno, citranelol, geraniol, mentol, alcohol perillílico, linalool, tujona y mircenol. En otras realizaciones, el isoprenoide es un isoprenoide C₁₅. Estos compuestos proceden de tres unidades de isopreno y también se denominan sesquiterpenos. Son ejemplos ilustrativos de sesquiterpenos periplanona B, ginkgólido B, amorfadieno, artemisinina, ácido artemisinínico, valenceno, nootkatona, epi-cedrol, epi-aristoloqueno, farnesol, gopiol, sanonina, periplanona, forscolina y patchoulol (que también se conoce como alcohol de patchouli). En otras realizaciones, el isoprenoide es un isoprenoide C₂₀. Estos compuestos proceden de cuatro unidades de isopreno y también se denominan diterpenos. Son ejemplos ilustrativos de diterpenos casbeno, eleuterobina, paclitaxel, prostratina, pseudopterisina y taxadieno. En otros ejemplos, el isoprenoide es un isoprenoide C₂₀₊. Estos compuestos proceden de más de cuatro unidades de isopreno e incluyen: triterpenos (compuestos de isoprenoide C₃₀ derivados de 6 unidades de isopreno) tales como arbusidaE, bruceantina, testosterona, progesterona, cortisona, digitoxina y escualeno; tetraterpenos (compuestos isoprenoides C₄₀ derivados de 8 isoprenoides) tales como β-caroteno; y politerpenos (compuestos isoprenoides C₄₀₊ derivados de más de 8 unidades de isopreno) tales como poliisopreno. En algunas realizaciones, el isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en abietadieno, amorfadieno, careno, α-farneseno, β-farneseno, farnesol, geraniol, geranilgeraniol, isopreno, linalool, limoneno, mircenol, nerolidol, ocimeno, patchoulol, β-pineno, sabineno, γ-terpineno, terpinoleno y valenceno. Los compuestos de isoprenoide también incluyen, pero sin limitación, carotenoides (tales como licopeno, α- y β-caroteno, α- y β-criptoxantina, bixina, zeaxantina, astaxantina y luteína), compuestos esteroideos y compuestos que están compuestos de isoprenoides modificados por otros grupos químicos, tales como terpeno-alcaloides mixtos y coenzima Q-10.

5.3 Métodos para fabricar células modificadas genéticamente

En la presente invención también se proporcionan métodos para producir una célula hospedadora que está modificada por ingeniería genética para comprender una o más de las modificaciones descritas anteriormente, *por ejemplo*, uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más enzimas seleccionadas entre ADA, HMG-CoA reductasa que usa NADH, AACS, PK, PTA y otras enzimas de la ruta de mevalonato. La expresión de una enzima heteróloga en una célula hospedadora puede conseguirse introduciendo en las células hospedadoras un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima bajo el control de elementos reguladores que permiten la expresión en la célula hospedadora. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un plásmido extracromosómico. En otras realizaciones, el ácido nucleico es un vector de integración cromosómico que puede integrar la secuencia de nucleótidos en el cromosoma de la célula hospedadora.

Los ácidos nucleicos que codifican estas proteínas pueden introducirse en la célula hospedadora por cualquier método conocido por un experto en la materia sin limitación (véase, por ejemplo, Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1292-3; Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376-3385; Goeddel et al. eds, 1990, Methods in Enzymology, vol. 185, Academic Press, Inc., CA; Krieger, 1990, Gene Transfer and Expression -- A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning -- A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY; y Ausubel et al., eds., Edición actual, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY). Las técnicas ejemplares incluyen, pero sin limitación, formación de esferoplastos, electroporación, transformación mediada por PEG 1000 y transformación mediada por acetato de litio o cloruro de litio.

El número de copias de una enzima en una célula hospedadora puede alterarse modificando la transcripción del gen que codifica la enzima. Esto puede conseguirse, por ejemplo, modificando el número de copias de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima (por ejemplo, mediante el uso de un vector de expresión de mayor o menor número de copias que comprende la secuencia de nucleótidos, o mediante la introducción de copias adicionales de la secuencia de nucleótidos en el genoma de la célula hospedadora o mediante delección o rotura de la secuencia de nucleótidos en el genoma de la célula hospedadora), mediante el cambio del orden de secuencias codificantes en un ARNm policistrónico de un operón o la ruptura de un operón en genes individuales cada uno con su propio elemento

de control, o mediante el aumento de la fuerza del promotor u operador al que se une operativamente la secuencia de nucleótidos. Como alternativa o además, el número de copias de una enzima en una célula hospedadora puede alterarse modificando el nivel de traducción de un ARNm que codifica la enzima. Esto puede conseguirse, por ejemplo, modificando la estabilidad del ARNm, modificando la secuencia del sitio de unión a ribosomas, modificando la distancia o secuencia entre el sitio de unión a ribosomas y el codón de iniciación de la secuencia codificante de la enzima, modificando la región intercistronica entera localizada "cadena arriba de" o adyacente al lado 5' del codón de iniciación de la región codificante de la enzima, estabilizando el extremo 3' del transcrito de ARNm usando horquillas y secuencias especializadas, modificando el uso de codones de la enzima, alterando la expresión de ARNt de codones raros usados en la biosíntesis de la enzima y/o aumentando la estabilidad de la enzima, tal como, por ejemplo, mediante mutación de su secuencia codificante.

La actividad de una enzima en una célula hospedadora puede alterarse de varias formas, incluyendo, pero sin limitación, expresando una forma modificada de la enzima que presenta mayor o menor solubilidad en la célula hospedadora, expresando una forma alterada de la enzima que carece de un dominio a través del cual se inhibe la actividad de la enzima, expresando una forma modificada de la enzima que tiene un valor de Kcat mayor o menor o un valor de Km mayor o menor por el sustrato, o expresando una forma alterada de la enzima que está más o menos afectada por retroalimentación o compensación por otra molécula en la ruta.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico usado para modificar genéticamente una célula hospedadora comprende uno o más marcadores de selección útiles para la selección de células hospedadoras transformadas y para aplicar presión selectiva sobre la célula hospedadora para mantener el ADN extraño.

En algunas realizaciones, el marcador de selección es un marcador de resistencia a antibióticos. Los ejemplos ilustrativos de marcadores de resistencia a antibióticos incluyen, pero sin limitación, los productos génicos de *BLA*, *NAT1*, *PAT*, *AUR1-C*, *PDR4*, *SMR1*, *CAT*, dhfr de ratón, *HPH*, *DSDA*, *KAN* y *SH BLE*. El producto génico de *BLA* de *E. coli* confiere resistencia a antibióticos beta-lactámicos (por ejemplo, cefalosporinas de espectro reducido, cefamicinas y carbapenems (ertapenem), cefamandol y cefoperazona) y a todas las penicilinas contra bacterias gram negativas excepto temocilina; el producto génico de *NAT1* de *S. noursei* confiere resistencia a nourseotricina; el producto génico de *PAT* de *Tu94* de *Sviridochromogenes* confiere resistencia a bialofos; el producto génico de *AUR1-C* de *Saccharomyces cerevisiae* confiere resistencia a Auerobasidina A (AbA); el producto génico de *PDR4* confiere resistencia a cerulenina; el producto génico de *SMR1* confiere resistencia a sulfometuron metil; el producto génico de *CAT* del transposón Tn9 confiere resistencia a cloranfenicol; el producto génico de dhfr de ratón confiere resistencia a metotrexato; el producto génico de *HPH* de *Klebsiella pneumonia* confiere resistencia a Higromicina B; el producto génico de *DSDA* de *E. coli* permite que las células crezcan en placas con D-serina como única fuente de nitrógeno; el gen *KAN* del transposón Tn903 confiere resistencia a G418; y el producto génico de *SH BLE* de *Streptoalloteichus hindustanus* confiere resistencia a Zeocina (bleomicina). En algunas realizaciones, el marcador de resistencia a antibiótico se delecciona después de aislar la célula hospedadora modificada genéticamente desvelada en el presente documento.

En algunas realizaciones, el marcador de selección rescata una auxotrofia (por ejemplo, una auxotrofia nutricional) en el microorganismo modificado genéticamente. En dichas realizaciones, un microorganismo parental comprende una alteración funcional en uno o más productos génicos que funcionan en una ruta biosintética de aminoácidos o nucleótidos y que, cuando no es funcional, hace que una célula parental sea incapaz de crecer en medio sin complementación con uno o más nutrientes. Dichos productos génicos incluyen, pero sin limitación, los productos génicos de *HIS3*, *LEU2*, *LYS1*, *LYS2*, *MET15*, *TRP1*, *ADE2* y *URA3* en levadura. El fenotipo auxotrófico después puede rescatarse transformando la célula parental con un vector de expresión o construcción de integración cromosómica que codifica una copia funcional del producto génico alterado, y la célula hospedadora modificada genéticamente generada puede seleccionarse basándose en la pérdida del fenotipo auxotrófico de la célula parental. La utilización de los genes *URA3*, *TRP1* y *LYS2* como marcadores de selección tiene una notable ventaja ya que son posibles las selecciones tanto positivas como negativas. La selección positiva se realiza por complementación auxotrófica de las mutaciones en *URA3*, *TRP1* y *LYS2*, mientras que la selección negativa se basa en inhibidores específicos, es decir, ácido 5-fluoro-orótico (FOA), ácido 5-fluoroantranílico y ácido aminoadípico (aAA), respectivamente, que impiden el crecimiento de las cepas prototróficas pero permite el crecimiento de los mutantes de *URA3*, *TRP1* y *LYS2*, respectivamente. En otras realizaciones, el marcador de selección rescata otras deficiencias o no letales o fenotipos que pueden identificarse por un método de selección conocido.

En el presente documento se describen genes y proteínas específicas útiles en los métodos, composiciones y organismos de la divulgación; sin embargo, se reconocerá que no es necesaria una identidad absoluta con dichos genes. Por ejemplo, pueden realizarse cambios en un gen o polinucleótido particular que comprende una secuencia que codifica un polipéptido o enzima, y explorarse con respecto a la actividad. Típicamente, dichos cambios comprenden mutaciones conservativas y mutaciones silenciosas. Dichos polinucleótidos y polipéptidos modificados o mutados pueden seleccionarse con respecto a la expresión de una enzima funcional usando métodos conocidos en la técnica.

Debido a la degeneración intrínseca del código genético, también pueden usarse otros polinucleótidos que codifican sustancialmente los mismos polipéptidos o polipéptidos funcionalmente equivalentes para clonar y expresar los polinucleótidos que codifican dichas enzimas.

- 5 Como entenderán los expertos en la materia, puede ser ventajoso modificar una secuencia codificante para potenciar su expresión en un hospedador particular. El código genético es redundante con 64 codones posibles, pero la mayoría de los organismos típicamente usan una subserie de estos codones. Los codones que se utilizan con más frecuencia en una especie se denominan codones óptimos, y los no utilizados con mucha frecuencia se clasifican como codones raros o de bajo uso. Los codones pueden sustituirse para reflejar el uso de codones preferido del hospedador, en un proceso algunas veces denominado "optimización de codones" o "control de sesgo de codones entre especies".

- Pueden prepararse secuencias codificantes optimizadas que contienen codones preferidos por un hospedador procarionta o eucarionta (Murray et al., 1989, Nucl Acids Res. 17: 477-508), por ejemplo, para aumentar la velocidad de traducción o para producir transcritos de ARN recombinante que tengan propiedades deseables, tales como una mayor semivida, en comparación con los transcritos producidos a partir de una secuencia no optimizada. También pueden modificarse codones de terminación de la traducción para reflejar la preferencia por el hospedador. Por ejemplo, son codones de terminación típicos para *S. cerevisiae* y mamíferos UAA y UGA, respectivamente. El codón de terminación típico para plantas monocotiledóneas es UGA, mientras que los insectos y *E. coli* normalmente usan UAA como codón de terminación (Dalphin et al., 1996, Nucl Acids Res. 24: 216-8).

- Los expertos en la materia reconocerán que, debido a la naturaleza degenerada del código genético, puede usarse una diversidad de moléculas de ADN que difieren en sus secuencias de nucleótidos para codificar una enzima dada de la divulgación. La secuencia de ADN nativa que codifica las enzimas biosintéticas descritas anteriormente se menciona en el presente documento simplemente para ilustrar una realización de la divulgación, y la divulgación incluye moléculas de ADN de cualquier secuencia que codifica las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos y proteínas de las enzimas utilizadas en los métodos de la divulgación. De forma similar, un polipéptido típicamente puede tolerar una o más sustituciones, delecciones e inserciones de aminoácidos en su secuencia de aminoácidos sin pérdida o pérdida significativa de una actividad deseada. La divulgación incluye tales polipéptidos con secuencias de aminoácidos diferentes a las de las proteínas específicas descritas en el presente documento siempre que los polipéptidos modificados o variantes tengan la actividad anabólica o catabólica enzimática del polipéptido de referencia. Además, las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN mostradas en el presente documento simplemente ilustran realizaciones de la divulgación.

- Además, la divulgación incluye homólogos de enzimas útiles para las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, dos proteínas (o una región de las proteínas) son sustancialmente homólogas cuando las secuencias de aminoácidos tienen al menos aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con el objetivo de realizar una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o en ambas de una primera y una segunda secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo y pueden descartarse secuencias no homólogas con fines comparativos). En una realización, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos es al menos un 30 %, típicamente al menos un 40 %, más típicamente al menos un 50 %, incluso más típicamente al menos un 60 % e incluso más típicamente al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los restos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesita introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

- Cuando se usa "homólogo" haciendo referencia a proteínas o péptidos, se reconoce que las posiciones de restos que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que un resto de aminoácidos se sustituye por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de homología puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Pearson W. R., 1994, Methods in Mol Biol 25: 365-89).

- Cada uno de los seis grupos siguientes contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido Aspártico (D), Ácido Glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina

(R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Alanina (A), Valina (V), y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

La homología de secuencia para polipéptidos, que también se denomina porcentaje de identidad de secuencia, se mide típicamente usando un software de análisis de secuencias. Un algoritmo típico usado que compara la secuencia de una molécula con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST. Cuando se busca una base de datos que contiene secuencias de un gran número de organismos diferentes, es típico comparar secuencias de aminoácidos.

Además, cualquiera de los genes que codifican las enzimas anteriores (o cualquier otra mencionada en el presente documento) (o cualquiera de los elementos reguladores que controlan o modulan su expresión)) puede optimizarse por técnicas de modificación por ingeniería genética/de proteínas, tales como evolución dirigida o mutagénesis racional, que se conocen por los expertos en la materia. Dicha acción permite a los expertos en la materia optimizar las enzimas para su expresión y actividad en levaduras.

Además, pueden identificarse genes que codifican estas enzimas a partir de otras especies fúngicas y bacterianas y pueden expresarse para la modulación de esta ruta. Una diversidad de organismos podrían servir como fuentes para estas enzimas, incluyendo, pero sin limitación, *Saccharomyces spp.*, incluyendo *S. cerevisiae* y *S. uvarum*, *Kluyveromyces spp.*, incluyendo *K. thermotolerans*, *K. lactis*, y *K. marxianus*, *Pichia spp.*, *Hansenula spp.*, incluyendo *H. polymorpha*, *Candida spp.*, *Trichosporon spp.*, *Yamadazyma spp.*, incluyendo *Y. spp. stipitis*, *Torulaspora pretoriensis*, *Issatchenkia orientalis*, *Schizosaccharomyces spp.*, incluyendo *S. pombe*, *Cryptococcus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Neurospora spp.*, o *Ustilago spp.* Las fuentes de genes de hongos anaerobios incluyen, pero sin limitación, *Piromyces spp.*, *Orpinomyces spp.*, o *Neocallimastix spp.* Las fuentes de enzimas procariotas que son útiles incluyen, pero sin limitación, *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Lactococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, y *Salmonella spp.*

Las técnicas conocidas por los expertos en la materia pueden ser adecuadas para identificar genes homólogos y enzimas homólogas adicionales. En general, los genes análogos y/o las enzimas análogas pueden identificarse por análisis funcional y tendrán similitudes funcionales. Para identificar genes análogos y enzimas análogas pueden ser adecuadas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, para identificar genes, proteínas o enzimas homólogas o análogas a ADA, las técnicas pueden incluir, pero sin limitación, la clonación de un gen por PCR usando cebadores basados en una secuencia publicada de un gen/enzima ADA o mediante PCR degenerada usando cebadores degenerados diseñados para amplificar una región conservada entre genes de ADA. Además, un experto en la materia puede usar técnicas para identificar genes, proteínas o enzimas homólogas o análogas con homología o similitud funcional. Las técnicas incluyen el examen de una célula o cultivo celular con respecto a la actividad catalítica de una enzima a través de un ensayo enzimático *in vitro* de dicha actividad (por ejemplo, como se describe en el presente documento o en Kiritani, K., *Branched-chain Amino Acids Methods Enzymology*, 1970), después el aislamiento de la enzima con dicha actividad mediante purificación, La determinación de la secuencia proteica de la enzima mediante técnicas tales como degradación de Edman, el diseño de cebadores de PCR para la secuencia de ácido nucleico probable, La amplificación de dicha secuencia de ADN a través de PCR y clonación de dicha secuencia de ácido nucleico. Para identificar a genes homólogos o similares y/o enzimas homólogas o similares, genes análogos y/o enzimas o proteínas análogas, las técnicas también incluyen la comparación de datos relacionados con un gen o enzima candidata con bases de datos tales como BRENDA, KEGG o MetaCYC. El gen o enzima candidata puede identificarse dentro de las bases de datos mencionadas anteriormente de acuerdo con las enseñanzas del presente documento.

5.4 Métodos para producir isoprenoides

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para la producción de un isoprenoide, comprendiendo el método las etapas de: (a) cultivar una población de cualquiera de las células hospedadoras modificadas genéticamente descritas en el presente documento en un medio con una fuente de carbono en condiciones adecuadas para fabricar un compuesto isoprenoide; y (b) recuperar dicho compuesto isoprenoide del medio.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora modificada genéticamente comprende una o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en: expresión heteróloga de una ADA, expresión heteróloga de una HMG-CoA reductasa que usa NADH, expresión heteróloga de una AACS, expresión heteróloga de una fosfocetolasa, expresión heteróloga de una fosfotransacetilasa y expresión heteróloga de una o más enzimas de la ruta de mevalonato; y la célula hospedadora modificada genéticamente produce una cantidad aumentada del compuesto isoprenoide en comparación con una célula parental que no comprende dichas una o más modificaciones, o una célula parental que comprende solo una subserie de dichas una o más modificaciones de la célula hospedadora modificada genéticamente, pero por lo demás es genéticamente idéntica. En algunas realizaciones, la cantidad aumentada es al menos un 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o mayor del 100 %, medida, por ejemplo, en rendimiento, producción, productividad, en gramos por litro de cultivo celular, miligramos por gramo de peso celular seco, en una base por unidad de volumen

o al menos aproximadamente 1.000 veces o más, mayor que el nivel de isoprenoide producido por la célula parental, en una base por unidad de peso celular seco por unidad de tiempo.

En la mayoría de las realizaciones, la producción del nivel elevado de isoprenoide por la célula hospedadora es inducible por un compuesto de inducción. Dicha célula hospedadora puede manipularse con facilidad en ausencia del compuesto de inducción. El compuesto de inducción después se añade para inducir la producción del nivel elevado de isoprenoide por la célula hospedadora. En otras realizaciones, la producción del nivel elevado de isoprenoide por la célula hospedadora es inducible mediante el cambio de las condiciones de cultivo, tales como, por ejemplo, la temperatura de crecimiento, los constituyentes del medio y similares.

5.4.1 Medio y condiciones de cultivo

Los materiales y métodos para el mantenimiento y crecimiento de cultivos microbianos son bien conocidos para los expertos en la materia de la microbiología o ciencia de fermentación (véase por ejemplo, Bailey et al., *Biochemical Engineering Fundamentals*, segunda edición, McGraw Hill, Nueva York, 1986). Debe darse consideración al medio de cultivo apropiado, al pH, a la temperatura y a los requisitos para condiciones aerobias, microaerobias o anaerobias, dependiendo de los requisitos específicos de la célula hospedadora, la fermentación y el proceso.

Los métodos de producción de isoprenoides proporcionados en el presente documento pueden realizarse en un medio de cultivo adecuado (por ejemplo, con o sin complementación con pantotenato) en un recipiente adecuado incluyendo, pero sin limitación, una placa de cultivo celular, un matraz o un fermentador. Además, los métodos pueden realizarse a cualquier escala de fermentación conocida en la técnica que soporte la producción industrial de productos microbianos. Puede usarse cualquier fermentador adecuado incluyendo un fermentador de tanque agitado, un fermentador agitado por aire, un fermentador de burbujas o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones particulares que utilizan *Saccharomyces cerevisiae* como célula hospedadora, las cepas pueden cultivarse en un fermentador como se describe en detalle por Kosaric, et al, en *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Sexta Edición, Volumen 12, páginas 398-473, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo es cualquier medio de cultivo en el que puede subsistir un microorganismo modificado genéticamente capaz de producir un isoprenoide, es decir, mantener el crecimiento y la viabilidad. En algunas realizaciones, el medio de cultivo es un medio acuoso que comprende fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato. Dicho medio también puede incluir sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados. En algunas realizaciones, la fuente de carbono y cada uno de los nutrientes celulares esenciales, se añaden en cantidades crecientes o continuamente al medio de fermentación, y cada nutriente requerido se mantiene esencialmente al nivel mínimo necesario para la asimilación eficaz por las células en crecimiento, por ejemplo, de acuerdo con una curva de crecimiento celular predeterminada basándose en la función metabólica o respiratoria de las células que convierten la fuente de carbono en una biomasa.

En la técnica son bien conocidas condiciones adecuadas y medios adecuados para cultivar microorganismos. En algunas realizaciones, el medio adecuado se complementa con uno o más agentes adicionales, tales como, por ejemplo, un inductor (por ejemplo, cuando una o más secuencias de nucleótidos que codifican un producto génico están bajo el control de un promotor inducible), un represor (por ejemplo, cuando una o más secuencias de nucleótidos que codifican un producto génico están bajo el control de un promotor reprimible) o como un agente de selección (por ejemplo, un antibiótico para seleccionar microorganismos que comprenden las modificaciones genéticas).

En algunas realizaciones, la fuente de carbono es un monosacárido (azúcar sencillo), un disacárido, un polisacárido, una fuente de carbono no fermentable o una o más combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de monosacáridos adecuados incluyen glucosa, galactosa, manosa, fructosa, ribosa y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de disacáridos adecuados incluyen sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, celobiosa y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de polisacáridos adecuados incluyen almidón, glucógeno, celulosa, quitina y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de fuentes de carbono no fermentables adecuadas incluyen acetato y glicerol.

La concentración de una fuente de carbono, tal como glucosa, en el medio de cultivo debe promover el crecimiento celular, pero no tan alto que se reprima el crecimiento del microorganismo usado. Típicamente, los cultivos se realizan con una fuente de carbono, tal como glucosa, que se añade a niveles para conseguir el nivel deseado de crecimiento y biomasa, pero a niveles indetectables (siendo los límites de detección aproximadamente <0,1 g/l). En otras realizaciones, la concentración de una fuente de carbono, tal como glucosa, en el medio de cultivo es mayor de aproximadamente 1 g/l, preferentemente mayor de aproximadamente 2 g/l y, más preferentemente, mayor de aproximadamente 5 g/l. Además, la concentración de una fuente de carbono, tal como glucosa, en el medio de cultivo es típicamente menor de aproximadamente 100 g/l, preferentemente menor de aproximadamente 50 g/l y más preferentemente menor de aproximadamente 20 g/l. Debe indicarse que las referencias a las concentraciones de componentes de cultivo pueden referirse a las concentraciones de componentes iniciales y/o en curso. En algunos casos, puede ser deseable dejar que en el medio de cultivo se agote la fuente de carbono durante el cultivo.

Las fuentes de nitrógeno asimilable que pueden usarse en un medio de cultivo adecuado incluyen, pero sin limitación, fuentes de nitrógeno sencillas, fuentes de nitrógeno orgánico y fuentes de nitrógeno complejas. Dichas fuentes de nitrógeno incluyen amoníaco anhidro, sales de amonio y sustancias de origen animal, vegetal y/o microbiano. Las fuentes de nitrógeno adecuadas incluyen, pero sin limitación, hidrolizados de proteína, hidrolizados de biomasa microbiana, peptona, extracto de levadura, sulfato amónico, urea y aminoácidos. Típicamente, la concentración de las fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo es mayor de aproximadamente 0,1 g/l, preferentemente mayor de aproximadamente 0,25 g/l y más preferentemente mayor de aproximadamente 1,0 g/l. Por encima de ciertas concentraciones, sin embargo, la adición de una fuente de nitrógeno al medio de cultivo no es ventajosa para el crecimiento de los microorganismos. Como resultado, la concentración de las fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo es menor de aproximadamente 20 g/l, preferentemente menor de aproximadamente 10 g/l y, más preferentemente, menor de aproximadamente 5 g/l. Además, en algunos casos puede ser deseable dejar que en el medio de cultivo se agoten las fuentes de nitrógeno durante el cultivo.

El medio de cultivo eficaz puede contener otros compuestos tales como sales inorgánicas, vitaminas, pequeñas cantidades de metales o promotores del crecimiento. Estos otros compuestos también pueden estar presentes en fuentes de carbono, nitrógeno o minerales en el medio eficaz o pueden añadirse específicamente al medio.

El medio de cultivo también puede contener una fuente de fosfato adecuada. Dichas fuentes de fosfato incluyen fuentes de fosfato tanto inorgánico como orgánico. Las fuentes de fosfato preferidas incluyen, pero sin limitación, sales fosfato tales como fosfato sódico y potásico mono o dibásico, fosfato amónico y mezclas de los mismos. Típicamente, la concentración de fosfato en el medio de cultivo es mayor de aproximadamente 1,0 g/l, preferentemente mayor de aproximadamente 2,0 g/l y, más preferentemente, mayor de aproximadamente 5,0 g/l. Por encima de ciertas concentraciones, sin embargo, la adición de fosfato al medio de cultivo no es ventajosa para el crecimiento de los microorganismos. Por consiguiente, la concentración de fosfato en el medio de cultivo típicamente es menor de aproximadamente 20 g/l, preferentemente menor de aproximadamente 15 g/l y, más preferentemente, menor de aproximadamente 10 g/l.

Un medio de cultivo adecuado también puede incluir una fuente de magnesio, preferentemente en forma de una sal fisiológicamente aceptable, tal como sulfato de magnesio heptahidrato, aunque pueden usarse otras fuentes de magnesio en concentraciones que aportan cantidades similares de magnesio. Típicamente, la concentración de magnesio en el medio de cultivo es mayor de aproximadamente 0,5 g/l, preferentemente mayor de aproximadamente 1,0 g/l y, más preferentemente, mayor de aproximadamente 2,0 g/l. Por encima de ciertas concentraciones, sin embargo, la adición de magnesio al medio de cultivo no es ventajosa para el crecimiento de los microorganismos. Por consiguiente, la concentración de magnesio en el medio de cultivo típicamente es menor de aproximadamente 10 g/l, preferentemente menor de aproximadamente 5 g/l y, más preferentemente, menor de aproximadamente 3 g/l. Además, en algunos casos puede ser deseable dejar que en el medio de cultivo se agote la fuente de magnesio durante el cultivo.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo también puede incluir un agente quelante biológicamente aceptable, tal como el dihidrato de citrato trisódico. En tales casos, la concentración de un agente quelante en el medio de cultivo es mayor de aproximadamente 0,2 g/l, preferentemente mayor de aproximadamente 0,5 g/l y más preferentemente mayor de aproximadamente 1 g/l. Por encima de ciertas concentraciones, sin embargo, la adición de un agente quelante al medio de cultivo no es ventajosa para el crecimiento de los microorganismos. Por consiguiente, la concentración de un agente quelante en el medio de cultivo típicamente es menor de aproximadamente 10 g/l, preferentemente menor de aproximadamente 5 g/l y, más preferentemente, menor de aproximadamente 2 g/l.

El medio de cultivo también puede incluir inicialmente un ácido o base biológicamente aceptable para mantener el pH deseado del medio de cultivo. Los ácidos biológicamente aceptables incluyen, pero sin limitación, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y mezclas de los mismos. Las bases biológicamente aceptables incluyen, pero sin limitación, hidróxido amónico, hidróxido sódico, hidróxido potásico y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, la base usada es hidróxido amónico.

El medio de cultivo también puede incluir una fuente de calcio biológicamente aceptable, incluyendo, pero sin limitación, cloruro cálcico. Típicamente, la concentración de la fuente de calcio, tal como el cloruro cálcico, dihidrato, en el medio de cultivo está dentro del intervalo de aproximadamente 5 mg/l a aproximadamente 2000 mg/l, preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 1000 mg/l y, más preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 500 mg/l.

El medio de cultivo también puede incluir cloruro sódico. Típicamente, la concentración de cloruro sódico en el medio de cultivo está dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 5 g/l, preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l y, más preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 4 g/l.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo también puede incluir pequeñas cantidades de metales. Dichas pequeñas cantidades de metales pueden añadirse al medio de cultivo como una solución madre que, por comodidad, puede prepararse por separado del resto del medio de cultivo. Típicamente, la cantidad de dicha

solución con pequeñas cantidades de metales añadida al medio de cultivo es mayor de aproximadamente 1 ml/l, preferentemente mayor de aproximadamente 5 ml/l y más preferentemente mayor de aproximadamente 10 ml/l. Por encima de ciertas concentraciones, sin embargo, la adición de pequeñas cantidades de metales al medio de cultivo no es ventajosa para el crecimiento de los microorganismos. Por consiguiente, la cantidad de dicha solución de pequeñas cantidades de metales añadida al medio de cultivo típicamente es menor de aproximadamente 100 ml/l, preferentemente menor de aproximadamente 50 ml/l y, más preferentemente, menor de aproximadamente 30 ml/l. Debe indicarse que, además de añadir pequeñas cantidades de metales en la solución madre, los componentes individuales pueden añadirse por separado, cada uno dentro de intervalos correspondientes independientemente a las cantidades de los componentes dictados por los intervalos anteriores de la solución de pequeñas cantidades de metales.

El medio de cultivo puede incluir otras vitaminas, tales como pantotenato, biotina, calcio, pantotenato, inositol, piridoxina-HCl y tiamina-HCl. Dichas vitaminas pueden añadirse al medio de cultivo como una solución madre que, por comodidad, puede prepararse por separado del resto del medio de cultivo. Por encima de ciertas concentraciones, sin embargo, la adición de vitaminas al medio de cultivo no es ventajosa para el crecimiento de los microorganismos.

Los métodos de fermentación descritos en el presente documento pueden realizarse en modos de cultivo convencionales, que incluyen, pero sin limitación, discontinuo, discontinuo alimentado, reciclado celular, continuo y semicontinuo. En algunas realizaciones, la fermentación se realiza en modo discontinuo alimentado. En dicho caso, algunos de los componentes del medio se agotan durante el cultivo, incluyendo el pantotenato durante la etapa de producción de la fermentación. En algunas realizaciones, el cultivo puede complementarse con concentraciones relativamente altas de dichos componentes al principio, por ejemplo, de la etapa de producción, de forma que el crecimiento y/o la producción de isoprenoides se soporten durante un periodo de tiempo antes de que se requieran las adiciones. Los intervalos preferidos de estos componentes se mantienen a lo largo de todo el cultivo realizando adiciones hasta que los niveles se agoten por el cultivo. Los niveles de componentes en el medio de cultivo pueden monitorizarse, por ejemplo, mediante el muestreo del medio de cultivo periódicamente y ensayo de las concentraciones. Como alternativa, una vez que se desarrolla un procedimiento de cultivo convencional, pueden realizarse adiciones a intervalos de tiempo correspondientes a niveles conocidos a tiempos particulares a lo largo del cultivo. Como reconocerán los expertos en la materia, la velocidad de consumo de nutrientes aumenta durante el cultivo según aumenta la densidad celular del medio. Además, para evitar la introducción de microorganismos extraños en el medio de cultivo, la adición se realiza usando métodos de adición asépticos, como se conoce en la técnica. Además, durante el cultivo puede añadirse una pequeña cantidad de agente antiespumante.

La temperatura del medio de cultivo puede ser cualquier temperatura adecuada para el crecimiento de las células modificadas genéticamente y/o la producción de isoprenoides. Por ejemplo, antes de la inoculación del medio de cultivo con un inóculo, el medio de cultivo puede llevarse y mantenerse a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, preferentemente a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C y, más preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 32 °C.

El pH del medio de cultivo puede controlarse mediante la adición de un ácido o base al medio de cultivo. En los casos en los que se usa amoníaco para controlar el pH, también sirve convenientemente como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. Preferentemente, el pH se mantiene a un valor de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, más preferentemente de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,0 y, aún más preferentemente, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,5.

En algunas realizaciones, la concentración de fuente de carbono, tal como la concentración de glucosa, del medio de cultivo se monitoriza durante el cultivo. La concentración de glucosa del medio de cultivo puede monitorizarse usando técnicas conocidas, tales como, por ejemplo, el uso del ensayo de enzima glucosa oxidasa o cromatografía líquida de alta presión, que puede usarse para monitorizar la concentración de glucosa en el sobrenadante, por ejemplo, un componente sin células del medio de cultivo. Como se ha indicado previamente, la concentración de fuente de carbono debe mantenerse por debajo del nivel al que se produce la inhibición del crecimiento celular. Aunque dicha concentración puede variar de un organismo a otro, en el caso de la glucosa como fuente de carbono, la inhibición del crecimiento celular tiene lugar a concentraciones de glucosa mayores de aproximadamente 60 g/l y puede determinarse fácilmente por ensayo. Por consiguiente, cuando se usa glucosa como fuente de carbono, la glucosa preferentemente se suministra al fermentador y se mantiene por debajo de los límites de detección. Como alternativa, la concentración de glucosa en el medio de cultivo se mantiene en el intervalo de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 100 g/l, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 50 g/l y, aún más preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l. Aunque la concentración de fuente de carbono puede mantenerse dentro de los niveles deseados por la adición de, por ejemplo, una solución de glucosa sustancialmente pura, es aceptable y puede preferirse, mantener la concentración de fuente de carbono del medio de cultivo por adición de alícuotas del medio de cultivo original. El uso de alícuotas del medio de cultivo original puede ser deseable porque las concentraciones de otros nutrientes en el medio (por ejemplo, las fuentes de nitrógeno y fosfato) pueden mantenerse simultáneamente. De forma similar, las

concentraciones de pequeñas cantidades de metales pueden mantenerse en el medio de cultivo mediante la adición de alícuotas de la solución de pequeñas cantidades de metales.

5.4.2 Recuperación de isoprenoides

Una vez que se ha producido el isoprenoide por la célula hospedadora, puede recuperarse o aislarse para un uso posterior usando cualquier método adecuado de separación y purificación conocido en la técnica. En algunas realizaciones, una fase orgánica que comprende el isoprenoide se separa de la fermentación por centrifugación. En otras realizaciones, una fase orgánica que comprende el isoprenoide se separa de la fermentación espontáneamente. En otras realizaciones, una fase orgánica que comprende el isoprenoide se separa de la fermentación añadiendo un desemulsionante y/o agente de nucleación en la reacción de fermentación. Los ejemplos ilustrativos de desemulsionantes incluyen floculantes y coagulantes. Los ejemplos ilustrativos de agentes de nucleación incluyen pequeñas gotas del propio isoprenoide y disolventes orgánicos tales como dodecano, miristato de isopropilo y oleato de metilo.

El isoprenoide producido en estas células puede estar presente en el sobrenadante de cultivo y/o asociado con las células hospedadoras. En realizaciones en las que el isoprenoide está asociado con la célula hospedadora, la recuperación del isoprenoide puede comprender un método para permeabilizar o lisar las células. Como alternativa o simultáneamente, el isoprenoide en el medio de cultivo puede recuperarse usando un proceso de recuperación que incluye, pero sin limitación, cromatografía, extracción, extracción de disolvente, separación en membrana, electrodiálisis, ósmosis inversa, destilación, derivatización química y cristalización.

En algunas realizaciones, el isoprenoide se separa de otros productos que pueden estar presentes en la fase orgánica. En algunas realizaciones, la separación se consigue usando adsorción, destilación, extracción gas-líquido (stripping), extracción líquido-líquido (extracción con disolvente), ultrafiltración y técnicas cromatográficas convencionales.

6. Ejemplos

6.1 Ejemplo 1:

Identificación y caracterización de HMG-CoA reductasas específicas de NADH

Este ejemplo describe la identificación y caracterización de HMG-CoA reductasas que no se sabía previamente que tenían especificidad por el cofactor NADH.

6.1.1 Materiales y métodos

6.1.1.1 Modificación por ingeniería de la cepa

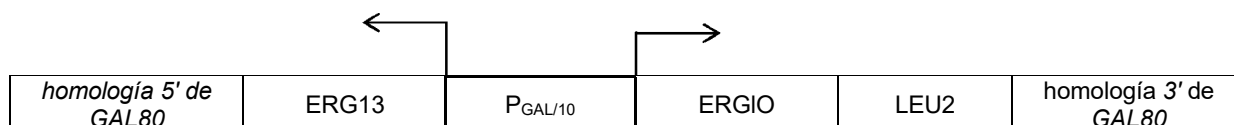
Se usó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de tipo silvestre (CEN.PK2, Mat a, *ura3*⁺, *TRP1*⁺, *leu2*⁻, MAL2-8C, SUC2,) como hospedador para la expresión de la ruta de mevalonato (MevT) (por la que la acetil-CoA tiolasa (ERG10) convierte la acetil-CoA en acetoacetil-CoA; la HMG-CoA sintasa (ERG 13) convierte la acetoacetil-CoA en HMG-CoA; y la HMG-CoA reductasa convierte la HMG-CoA en mevalonato (FIG. 1)).

Esta cepa se transformó con un plásmido que codificaba una HMG-CoA reductasa de clase II heteróloga derivada de *Staphylococcus aureus* (ZP_06815052), *Herpetosiphon aurantiacus* (YP_001546303), *Pseudomonas mevalonii* (P13702), *Delftia acidovorans* (YP_001561318), *Menthanosaeta thermofila* (YP_843364) o *Silicibacter pomeroyi* (YT_164994); o una versión truncada en el extremo N de la HMG-CoA reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* (tHMG-CoA reductasa) (EEU05004). Las HMG-CoA reductasas de clase II se sometieron a optimización de codones para la expresión en levaduras y se sintetizaron químicamente con etiquetas FLAG-HIS C-terminales, con la excepción de que la HMG-CoA reductasa de *P. mevalonii* se sintetizó con las siguientes modificaciones adicionales:

sitio *NotI*-promotor GAL1-sitio *NdeI*-[*P. mevalonii* HMG-CoA reductasa]—sitio *EcoRI*-etiqueta FLAG-etiqueta HIS-codón de TERMINACIÓN---terminador PK1---sitio *NotI*

Este ADN se clonó en el sitio *NotI* del vector pBluescript SK+ (Stratagene). El promotor Gal7 de levadura se amplificó por PCR usando el extracto de ADN genómico de una cepa CENPK2 de tipo silvestre como plantilla y usando los oligonucleótidos YT_164_30_Gal7F (que contiene un sitio de restricción *SacI* y *NotI* en el extremo 5') e YT_164_30_Gal7R (que contiene un sitio de restricción *NdeI* en el extremo 3') (véase la Tabla 2). El producto de PCR se clonó en el vector pCR II-TOPO (Invitrogen). Los dos plásmidos se cortaron usando *SacI* y *NotI*, y el promotor Sc.GAL7 escindido se usó para cambiar el promotor Gal1 cadena arriba del gen de la HMG-CoA reductasa de *P. mevalonii*. El plásmido resultante y pAM70 (SEQ ID NO: 23), un vector episomal de levaduras pRS426 con un marcador URA3, se digirieron con *NotI*. El plásmido pAM01147 (SEQ ID NO: 24) después se construyó ligando el fragmento *NotI* en el sitio digerido por *NotI* de pAM70. Este plásmido se usó como plásmido base para cambiar la secuencia codificante de la HMG-CoA reductasa de *P. mevalonii* por cualquier secuencia codificante de HMG-CoA

- reductasa de interés (incluyendo la tHMG-CoA reductasa de levadura) mediante digestión del plásmido con NdeI y EcoRI y ligando una secuencia codificante de HMG-CoA reductasa de interés que tenía sitios NdeI y EcoRI en los extremos 5' y 3', respectivamente. La propagación del ADN plasmídico se realizó en la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Después, la cepa Y1389 se transformó con los plásmidos que llevaban secuencias codificantes de diferentes HMG-CoA reductasas y los transformantes se seleccionaron en placas de medio CSM sin uracilo que contenían un 2 % de glucosa. Toda la transformación mediada por ADN en *S. cerevisiae* se realizó usando el procedimiento convencional de Acetato de Litio como se describe por Gietz RW y Woods RA, Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part B. San Diego, CA: Academic Press Inc. págs. 87-96 (2002).
- 10 La integración genómica de *Sc. acetoacetyl-CoA tiolasa* (ERG10) y *Sc.HMG-CoA Sintasa* (ERG 13) se dirigió al locus Ga180 de la cepa hospedadora usando la construcción de integración mostrada más adelante (SEQ ID NO: 25).



- 15 Cada componente de la construcción de integración se amplificó por PCR usando 100 ng de ADN genómico de Y002 como plantilla. La amplificación por PCR del locus GAL80 cadena arriba de las posiciones -1000 a -1 se realizó con los oligonucleótidos YT_164_36_001 e YT_164_36_003 (véase la Tabla 2). La amplificación por PCR de los genes de levadura ERG10 y ERG 13 se realizó usando el par de oligonucleótidos YT_164_36_002 e YT_164_36_005 para ERG13 e YT_164_36_006 e YT_164_36_009 para ERG10. Los oligonucleótidos YT_164_36_004 e YT_164_36_007 se usaron para amplificar el promotor GAL1/10, mientras que los cebadores YT_164_36_008 e YT_164_36_011 se usaron para amplificar el gen LEU2. La amplificación por PCR de las posiciones 23 a 1000 del locus GAL80 cadena abajo (después del codón de terminación) se realizó con los oligonucleótidos YT_164_36_010 e YT_164_36_012. Se añadieron cien fmoles de cada pieza de ADN en un solo tubo y se ensamblaron mediante reacción de PCR con ensamblaje (como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 8.221.982) usando los cebadores YT_164_36_001 e YT_164_36_012. Los productos de PCR que tenían los pesos moleculares esperados se purificaron en gel.

Tabla 2. Cebadores usados para la modificación por ingeniería genética de la cepa

Nombre del cebador	SEQ ID NO:	Secuencia de Cebador
YT_164_36_001	SEQ ID NO:26	GCCTGTCTACAGGATAAAGACGGG
YT_164_36_002	SEQ ID NO:27	TCCCGTTCTTTCCACTCCCGTCTATATATATA TCATTGTTATTA
YT_164_36_003	SEQ ID NO:28	TAATAACAATGATATATATATAGACGGGAGT GGAAAGAACGGGA
YT_164_36_004	SEQ ID NO:29	CCAACAAAGTTTAGTTGAGAGTTTCATTTAT ATTGAATTTTCAAAAATTCTTAC
YT_164_36_005	SEQ ID NO:30	GTAAGAATTTTGTAAAATTCAATATAAATGA AACTCTCAACTAAACTTTGTTGG
YT_164_36_006	SEQ ID NO:31	GTCAAGGAGAAAAAACTATAATGTCTCAGA ACGTTTACATTGTATCGACTGCCAGAACCC
YT_164_36_007	SEQ ID NO:32	GGGTTCTGGCAGTCGATACAATGTAAACGTT CTGAGACATTATAGTTTTTCTCCTTGAC
YT_164_36_008	SEQ ID NO:33	GTGTGCCTTTTGA CT TACTTTTACGTTGAGCC ATTAGTATCA
YT_164_36_009	SEQ ID NO:34	TGATACTAATGGCTCAACGTAAAAGTAAGTC AAAAGGCACAC
YT_164_36_010	SEQ ID NO:35	GATATTTCTTGAATCAGGCGCCTTAGACCCC CCAGTGCAGCGAACGTTATAAAAAC
YT_164_36_011	SEQ ID NO:36	GTTTTTATAACGTTTCGCTGCACTGGGGGGTC TAAGGCGCCTGATTCAAGAAATATC

Nombre del cebador	SEQ ID NO:	Secuencia de Cebador
YT_164_36_012	SEQ ID NO:37	AAATATGACCCCCAATATGAGAAATTAAGG C
YT_164_30_Gal3F	SEQ ID NO:38	GAGCTCGCGGCCGC GTACATACCTCTCTCCGTATCCTCGTAATCAT TTTCTTGT
YT_164_30_Gal3R	SEQ ID NO:39	CATATGACTATGTGT TGCCCTACCTTTTTACTTTTATTTTCTCTTT
YT_164_30_Gal7F	SEQ ID NO:40	GAGCTCGCGGCCGC GTGTCACAGCGAATTCCTCACATGTAGGGA CCGAATTGT
YT_164_30_Gal7R	SEQ ID NO:41	CATATGTTTTGAGGGAATATTCAACTGTTTTT
		TTTTATCATGTTGA
RYSE 0	SEQ ID NO:42	GACGGCACGGCCACGCGTTTAAACCGCC
RYSE 19	SEQ ID NO:43	CCCGCCAGGCGCTGGGGTTTAAACACC

Se transformaron derivados de Y1389 transformados con diferentes HMG-CoA reductasas (como se ha indicado anteriormente) con la construcción de integración ERG 10/ERG13 para crear las cepas indicadas más adelante en la Tabla 3. Los transformantes se seleccionaron en placas de medio CSM que contenía un 2 % de glucosa sin uracilo y leucina. Todas las roturas y reemplazos de genes se confirmaron por análisis fenotípico y PCR de colonias.

Tabla 3: Descripción de Cepa

Cepa n.º	Descripción	cepa n.º después de Knockout de adh1
Y1431	MevT con tHMG-CoA reductasa de <i>S. cerevisiae</i>	Y1804
Y1432	MevT con HMG-CoA reductasa de <i>S. aureus</i>	
Y1433	MevT con HMG-CoA reductasa de <i>P. mevalonii</i>	Y1805
Y1435	MevT con HMG-CoA reductasa de <i>D. acidovorans</i>	Y1806
Y1436	MevT con HMG-CoA reductasa de <i>M. thermofila</i>	
Y1486	MevT con HMG-CoA reductasa de <i>H. aurantiacus</i>	
Y1487	MevT con HMG-CoA reductasa de <i>S. pomeroyi</i>	Y1807

Para las cepas Y1431, Y1433, Y1435 y Y1487, el gen ADH1 se anuló usando la construcción de rotura mostrada más adelante (SEQ ID NO:44):

Homología 5' de ADH1	Kan A	Homología 3' de ADH1
-------------------------	-------	-------------------------

La construcción de alteración se generó por los métodos de ensamblaje de polinucleótidos descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 8.221.982. La región de homología 5' de ADH1 de la construcción de integración era homóloga a las posiciones -563 a -77 de la secuencia codificante de ADH1, y la región de homología 3' de ADH1 era homóloga a las posiciones 87 a 538 (después del codón de terminación del gen ADH1). Para amplificar el producto se usaron cebadores RYSE 0 y RYSE 19. La cepa Y1431, Y1433, Y1435 e Y1487 (Tabla 2) se transformaron con el producto, y los transformantes se seleccionaron en placa con medio YPD que contenía un 2 % de glucosa y G418 (*Geneticina*). La alteración del gen de ADH1 se confirmó por análisis fenotípico y PCR de colonias.

6.1.1.2 Cultivo celular

Una sola colonia de una cepa de levadura dada se cultivó en 3 ml de medio Base con Nitrógeno de Levadura (YNB) con un 2 % de sacarosa como cultivo iniciador de una noche. Al día siguiente, se prepararon matraces de producción con una DO₆₀₀ inicial de 0,05 diluida a partir del cultivo iniciador en 40 ml de YNB-medio de cultivo de producción de sacarosa al 4 % en matraces estériles desechables PETG de 250 ml (Nalgene). Los matraces se incubaron a 30 °C por agitación a 250 RPM durante los periodos de tiempo indicados más adelante.

6.1.1.3 Ensayo de actividad HMG-CoA reductasa usando extracto sin células

- 10 Se cultivaron células de levadura durante 48 horas para los ensayos de actividad HMG-CoA reductasa (FIG. 8) o 72 horas para los ensayos de mevalonato (Tabla 4) y se recogieron por centrifugación en un tubo Falcon de 15 ml durante 10 minutos a 4000 x g en un rotor de cubo pivotante JS-5.3 con un soporte apropiado para los tubos Falcon. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml y se lavó una vez usando tampón de lisis frío (Tris 100 mM pH 7,0 con Mini, comprimido de inhibidor de proteasa sin EDTA (Roche) añadido, DTT 1 mM y EDTA 1 mM). Las células
- 15 después se transfirieron a un tubo de microcentrifuga de tapa a rosca de plástico de 2 ml con tapa de junta tórica (Fisher Brand 520-GRD) y las células se lisaron usando perlas de rotura (Disruption beads, 0,5 Mm, Fisher) y una batidora de perlas durante 1 minuto a 6 M/S. Los tubos se pusieron inmediatamente en un baño de agua con hielo durante al menos 5 minutos. Los tubos se centrifugaron a un mínimo de 8000 xg durante 20 minutos. Después, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo frío. La concentración de proteína se midió usando el ensayo clásico de
- 20 Bradford para proteínas (método rápido y sensible Bradford MM A para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteína utilizando el principio de unión de proteína-colorante. Anal. Biochem 72, 248-254 (1976)).

- Para los ensayos de HMG-CoA reductasa, el tampón de reacción (tampón fosfato 100 mM pH 7,0, KCl 100 mM, DTT 1 mM y EDTA 1 mM) inicialmente se preincubó en una placa de 96 pocillos a 30 °C. Se añadió NADH o NADPH a
- 25 una concentración final de 150 µM, una concentración final de 400 µM de HMG-CoA y una concentración final de 5 mM de DTT o un volumen total de 190 µl en cada pocillo. El ensayo se inició añadiendo diez microlitros de extracto sin células diluido al intervalo de actividad lineal. La reacción se monitorizó midiendo la reducción de absorbancia de NADPH o NADH a 340 nm usando un lector de placas Molecular Devices Spectramax M5. La pendiente de la línea de absorbancia a 340 nm junto con la concentración de proteína se usó para calcular la actividad específica de
- 30 HMGr para cada extracto sin células.

6.1.1.4 Medición de ácidos orgánicos y alcohol

- Las muestras para el ensayo de ácidos orgánicos y alcoholes se prepararon cogiendo 1 ml de caldo de fermentación y transfiriendo las muestras a tubos eppendorf de 1,5 ml. Las muestras se centrifugaron durante 1 min a 13.000 RPM usando las centrifugas eppendorf de la tabla. Los sobrenadantes después se diluyeron (1:1 v/v) en ácido sulfúrico 15 mM. La mezcla se sometió a agitación vortical y se centrifugó durante 1 min a 13.000 RPM. El sobrenadante clarificado se transfirió a un vial para el análisis de HPLC.
- 40 El análisis de HPLC se realizó con respecto al contenido de glicerol y mevalonato usando HPLC Thermofisher y por cromatografía de exclusión iónica usando Column Waters IC-Pak 7.8 mm x 300 mm, 7 µm, 50 Å (Waters) y con detección del índice de refracción (IR) (Thermofisher). La elución se realizó isocráticamente usando una fase móvil acuosa de ácido sulfúrico 15 mM con un caudal de 0,6 ml/min.

6.1.2 Resultados

6.1.2.1 Determinación de especificidad de cofactor para HMG-CoA reductasas de clase II

- Como se muestra en la FIG. 8, las HMG-CoA reductasas de *D. acidovorans* y *S. pomeroyi* presentan una alta especificidad por el NADH y una alta actividad específica *in vitro*. Estas HMG-CoA reductasas no presentaron prácticamente ninguna actividad específica en presencia de NADPH, mientras que la actividad específica se aproximaba a 400 nmol/mg/min en presencia de NADH. De forma similar, la HMG-CoA reductasa de *P. mevalonii* demostró selectividad por NADH como cofactor, lo cual es coherente con los informes publicados previamente. Véase, por ejemplo, Hedl et al., J. Bacteriol 186(7): 1927-1932 (2004). Por el contrario, las HMG-CoA reductasas de
- 55 *S. cerevisiae*, *S. aureus* y *H. aurantiacus* no mostraron actividad medible en presencia de NADH, y la HMG-CoA reductasa de *M. thermofila* mostró una actividad apenas detectable en presencia tanto de NADPH como de NADH. Estos resultados indican que las HMG-CoA reductasas de *D. acidovorans* y *S. pomeroyi* son HMG-CoA reductasa selectivas por NADH, de forma similar a la HMG-CoA reductasa de *P. mevalonii*.

- Además, la Tabla 4 indica que las cepas que comprendían una ruta de MevT que comprende una HMG-CoA reductasa que usa NADH (de *P. mevalonii*, *D. acidovorans* y *S. pomeroyi*, respectivamente) producían sustancialmente menos mevalonato que las cepas que comprendían una ruta de MevT que comprende una HMG-CoA reductasa que usa NADPH (de *S. cerevisiae*, *S. aureus* y *H. aurantiacus*, respectivamente). Esto sugiere que *in vivo*, se necesita una fuente adicional de NADH para utilizar la capacidad catalítica completa de las HMG-CoA reductasas que usan NADH hacia el mevalonato y la producción de isoprenoides cadena abajo.
- 65

Tabla 4. Producción de mevalonato por HMG-CoA reductasas que usan NADPH frente a HMG-CoA reductasas que usan NADH

Fuente de HMG-CoA reductasa	Producción de mevalonato (g/l)	Especificidad de cofactor
<i>S. cerevisiae</i>	1,11	NADPH
<i>S. aureus</i>	1,74	NADPH
<i>H. aurantiacus</i>	1,84	NADPH
<i>P. mevalonii</i>	0,41	NADH
<i>D. acidovorans</i>	0,42	NADH
<i>S. pomeoyri</i>	0,57	NADH

6.1.2.2 El aumento del NADH intracelular mejora la actividad HMG-CoA reductasa que usa NADH

Como se indica en las FIG. 9-11, la producción de mevalonato se mejora sustancialmente en células que comprenden una ruta MevT que comprenden una HMG-CoA reductasa que usa NADH cuando se introduce una perturbación metabólica que aumenta la concentración intracelular de NADH. El NADH1 reduce el acetaldehído a etanol de una manera dependiente de NADH. En un entorno *adh1Δ*, las células hospedadoras sufren un crecimiento reducido (FIG. 9) y un aumento de la producción de glicerol (FIG. 10), que es indicativo de un desequilibrio redox probablemente resultante de la acumulación de NADH intracelular. Sin embargo, aunque las células que comprenden una ruta MevT que comprende una HMG-CoA reductasa que usa NADPH (*S. cerevisiae* (Sc.) tHMG-CoA reductasa) presentan una producción de mevalonato reducida en el entorno *adh1Δ*, las células que comprenden una ruta MevT que comprende una HMG-CoA reductasa que usa NADH ((de *P. mevalonii*, *D. acidovorans* y *S. pomeroyi*, respectivamente) presentan mejoras sustanciales en la producción de mevalonato (FIG. 11), a pesar de que también muestren signos de estrés redox. Estos datos sugieren que las HMG-CoA reductasas que usan NADH pueden utilizar reservas aumentadas de NADH intracelular para reforzar la producción de mevalonato. Estos resultados también sugieren que en ausencia de una mayor fuente intracelular de NADH, las HMG-CoA reductasas que usan NADH están limitadas por el cofactor.

Notablemente, los informes publicados previos han indicado que la HMG-CoA reductasa de *P. mevalonii* se utiliza en la degradación del mevalonato. Véase Anderson et al., J. Bacteriol., (171(12): 6468-6472 (1989). *P. mevalonii* se encuentra entre los pocos procariotas que se han identificado como capaces de subsistir con mevalonato como única fuente de carbono. Sin embargo, los resultados presentados en el presente documento demuestran la utilidad inesperada de la HMG-CoA reductasa de *P. mevalonii* para uso en una ruta biosintética de mevalonato.

6.2 Ejemplo 2: Aumento de la producción de isoprenoides y equilibrio redox con rutas alternativas para acetil-CoA y enzimas alternativas de la ruta de MEV

Este ejemplo demuestra que el mevalonato y la producción de isoprenoides posterior a partir de la ruta de MEV puede mejorarse utilizando rutas alternativas a la producción de acetil-CoA citosólica, por ejemplo, a través de la expresión heteróloga de acetaldehído deshidrogenasa, acetilación (ADA, E.C. 1.2.1.10), en lugar del bypass de PDH de tipo silvestre, y en diversas combinaciones con enzimas alternativas de la ruta de MEV. Estos resultados demuestran que el desequilibrio redox introducido por el reemplazo de las enzimas de bypass de PDH productoras de NADPH con ADA productora de NADH puede aliviarse en parte mediante la combinación de la expresión de ADA con una HMG-CoA reductasa que usa NADH de la ruta de MEV, y/o con la expresión heteróloga de fosfoacetolasa y fosfotransacetilasa, que también pueden proporcionar una ruta alternativa adicional a la producción de acetil-CoA citosólica. Estos resultados además demuestran que la capacidad catalítica de ADA para proporcionar el sustrato acetil-CoA a la ruta de MEV se mejora sustancialmente al proporcionar una conversión termodinámicamente favorable posterior de acetil-CoA en acetoacetil-CoA, tal como la proporcionada por la acetil-CoA:malonil-CoA aciltransferasa.

6.2.1 Materiales y métodos

6.2.1.1 Modificación por ingeniería de la cepa

Se construyeron las cepas indicadas en la Tabla 5 para determinar: (1) los efectos sobre el crecimiento celular y la producción de isoprenoides heterólogos cuando ADA se empareja con HMG-CoA reductasa que usa NADH frente a una HMG-CoA reductasa que usa NADPH; (2) el efecto de la expresión de fosfoacetolasa y fosfotransacetilasa sobre el desequilibrio redox creado por la expresión de ADA; y (3) el efecto de la expresión de acetoacetil-CoA sintasa sobre los niveles de mevalonato en cepas que expresan ADA.

Tabla 5.

Nombre de la Cepa	Descripción
Y968	CEN.PK2 tipo silvestre
Y12869	<i>acs1⁺acs2⁺ald6⁺; 2x Dz.eutE</i>
Y12746	<i>acs1⁺acs2⁺ald6⁺; 2x Dz.eutE; 3x Lm.PK; 1x Ck.PTA</i>
Y12869.ms63908	Y12869 con construcción ms63908
Y12869.ms63909	Y12869 con construcción ms63909
Y968.ms63908	Y968 con construcción ms63908
Y968.ms63909	Y968 con construcción ms63909
Y12869.ms63907.ms64472	Y12869.ms63907 con construcción ms64472
Y12869.ms63909.ms64472	Y12869.ms63909 con construcción ms64472
Y968.ms63907.ms64472	Y968.ms63907 con construcción ms64472
Y968.ms63909.ms64472	Y968.ms63909 con construcción ms64472

6.2.1.1.1 Y968

- 5 Y968 es *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2 de tipo silvestre, Matalpha. La cepa de partida para Y12869, Y12746, y todos sus derivados, fue la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (CEN.PK2, Mat alpha, ura3-52, trp1-289, leu2-3.122, his3⁺), Y003. Todas las transformaciones mediadas por ADN en *S. cerevisiae* se realizaron usando el procedimiento convencional de Acetato de Litio como se describe por Gietz RW y Woods RA, Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology. Part B. San Diego, CA: Academic Press Inc. págs. 87-96 (2002) y, en
- 10 todos los casos, la integración de las construcciones se confirmó por amplificación por PCR del ADN genómico.

6.2.1.1.2 Y12869

- 15 Y12869 se generó a través de tres integraciones sucesivas en Y003. En primer lugar, el gen ACS2 se deletionó introduciendo una construcción de integración (i2235; SEQ ID NO:45) que consistía en el gen *LEU2* de *S. cerevisiae* nativo, flanqueado por secuencias que consistían en secuencias de nucleótidos cadena arriba y cadena abajo del locus de ACS2. Tras la introducción de una célula hospedadora *S. cerevisiae*, esta construcción puede integrarse por recombinación homóloga en el locus ACS2 del genoma, rompiendo funcionalmente ACS2 al reemplazar la
- 20 secuencia codificante de ACS2 por su secuencia de integración. Los transformantes se cultivaron en placas CSM-leu que contenían un 2 % de ETOH como única fuente de carbono y se confirmaron por amplificación por PCR. La cepa resultante fue Y4940.

A continuación, se deletionó ALD6 y se introdujo *eutE* de *Dickeya zeae* en Y4940 con la construcción de integración (i74804; SEQ ID NO:46) representada más adelante.

25

ALD6U5	pTDH3	Dz.eutE	tTEF2	TRP1	ZEF2	Dz.eutE	pTDH3	ALD6D5
--------	-------	---------	-------	------	------	---------	-------	--------

- Esta construcción de integración comprende un marcador de selección (TRP1), así como dos copias de una secuencia con codones optimizados para levadura que codificaba el gen *eutE* de *Dickeya zeae* (Secuencia de Referencia NCBI: YP_003003316.1) bajo el control del promotor de *TDH3* (840 pares de bases cadena arriba de la
- 30 región codificante de *TDH3* de *S. cerevisiae* nativa) y el terminador de *TEF2* (508 pares de bases cadena abajo de la región codificante de *TEF2* de *S. cerevisiae* nativa). Estos componentes están flanqueados por secuencias de nucleótidos cadena arriba y cadena abajo del locus de *ALD6*. Tras la introducción en una célula hospedadora, esta construcción se integra por recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora, rompiendo
- 35 funcionalmente *ALD6* al reemplazar la secuencia codificante de *ALD6* por su secuencia de integración. La construcción se ensambló usando los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 8.221.982. La construcción se utilizó para transformar Y4940 y los transformantes se seleccionaron en placas de CSM-TRP con un 2 % de glucosa y se confirmaron por amplificación por PCR. La cepa resultante fue 12602.

- 40 A continuación, ACS1 se deletionó en Y12602 introduciendo una construcción de integración (i76220; SEQ ID NO:47) que consistía en las secuencias de nucleótidos cadena arriba y cadena abajo de ACS1, que flanqueaban el gen *HIS3* de *S. cerevisiae* nativa bajo su propio promotor y terminador. Los transformantes se cultivaron en placas

de CSM-his que contenían un 2 % de glucosa como única fuente de carbono y se confirmaron por amplificación por PCR. La cepa resultante era Y12747.

A continuación, Y12747 se transformó con un producto de PCR amplificado a partir de la secuencia de *URA3* nativa. Esta secuencia restaura la mutación *ura3-52*. Véase Rose y Winston, Mol Gen Genet 193: 557-560 (1984). Los transformantes se cultivaron en placas de CSM-ura que contenían un 2 % de glucosa como única fuente de carbono y se confirmaron por amplificación por PCR. La cepa resultante era Y12869.

6.2.1.1.3 Y12746

Y12746 se generó a través de tres integraciones sucesivas en Y4940. En primer lugar, Y4940 se transformó con la construcción de integración (i73830; SEQ ID NO:48) representada más adelante.

BUD9US	pTDH3	Lm.PK	tTDH3	URA3	PGK1	CK.PTA	pTDH3	BUD9DS
--------	-------	-------	-------	------	------	--------	-------	--------

Esta construcción de integración comprende un marcador de selección (*URA3*); una versión de codones optimizados para levadura de la fosfocetolasa de *Leuconostoc mesenteroides* (Secuencia de Referencia NCBI YP_819405.1) bajo el promotor de *TDH3* (870 pb cadena arriba de la secuencia codificante de *TDH3*) y el terminador de *TDH3* (259 pb cadena abajo de la secuencia codificante de *TDH3*); una versión de codones optimizados para levadura de la fosfotransacetilasa de *Clostridium kluyveri* (Secuencia de Referencia NCBI: YP_001394780.1) bajo el control del promotor de *TDH3* (870 pb cadena arriba de la secuencia codificante de *TDH3*) y el terminador de *PGK1* (259 pb cadena abajo de la secuencia codificante de *PGK1*); flanqueada por secuencias homólogas que consisten en las secuencias de nucleótidos cadena arriba y cadena abajo del locus *BUD9* de *S. cerevisiae*. Tras la introducción en una célula hospedadora, esta construcción se integra por recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora, alterando funcionalmente *BUD9* al reemplazar la secuencia codificante de *BUD9* con su secuencia de integración. La construcción se ensambló usando los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 8.221.982. Los transformantes se seleccionaron en placas CSM-URA con un 2 % de glucosa.

La cepa resultante se transformó con la construcción (i74810; SEQ ID NO:49) mostrada a continuación.

ALD6US	pTDH3	Lm.PK	tTDH3	TRP1	TDH3	Lm.PK	pTDH3	ALD6DS
--------	-------	-------	-------	------	------	-------	-------	--------

Comprendiendo esta construcción un marcador de selección (*TRP1*); dos copias de la fosfocetolasa de *Leuconostoc mesenteroides* bajo el promotor de *TDH3* (870 pb cadena arriba de la secuencia codificante de *TDH3*) y el terminador de *TDH3* (259 pb cadena abajo de la secuencia codificante de *TDH3*); flanqueada por secuencias homólogas que consisten en las secuencias de nucleótidos cadena arriba y cadena abajo del locus de *ALD6*. Tras la introducción en una célula hospedadora, esta construcción se integra por recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora, rompiendo funcionalmente *ALD6* al reemplazar la secuencia codificante de *ALD6* por su secuencia de integración. La construcción se ensambló usando los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 8.221.982. Los transformantes se seleccionaron en placas de CSM-URA con un 2 % de glucosa y se confirmaron por amplificación por PCR.

Finalmente, la cepa resultante se transformó con la construcción (i76221; SEQ ID NO:50) mostrada a continuación.

ACS1US	pTDH3	Dz.eutE	tTEF2	HIS3	TEF2	Dz.eutE	pTDH3	ACS1DS
--------	-------	---------	-------	------	------	---------	-------	--------

Esta construcción comprende un marcador de selección (*HIS3*); así como dos copias de una secuencia con codones optimizados para levadura que codifica el gen *eutE* de *Dickeya zeae* (Secuencia de Referencia NCBI: YP_003003316.1) bajo el control del promotor de *TDH3* (840 pares de bases cadena arriba de la región codificante de *TDH3* de *S. cerevisiae* nativa) y el terminador de *TEF2* (508 pares de bases cadena abajo de la región codificante de *TEF2* de *S. cerevisiae* nativa). Estos componentes están flanqueados por secuencias de nucleótidos cadena arriba y cadena abajo del locus de *ACS1*. Tras la introducción en una célula hospedadora, esta construcción se integra por recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora, rompiendo funcionalmente *ACS1* al reemplazar la secuencia codificante de *ACS1* por su secuencia de integración. La construcción se ensambló usando los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 8.221.982. Los transformantes se seleccionaron en placas CSM-HIS con un 2 % de glucosa y se confirmaron por amplificación por PCR. La cepa resultante era Y12746.

6.2.1.1.4 ms63907, construcciones de integración ms63908, ms63909 y ms64472

A continuación se muestra la construcción de integración ms63907 (i84022; SEQ ID NO:51).

HO US	GAL4	pGWH5	pGAL10	ERG10	URA3	ERG8	pGAL7	pGAL10	pGAL1	Sp.HMG	HO DS
-------	------	-------	--------	-------	------	------	-------	--------	-------	--------	-------

Esta construcción comprende secuencias de nucleótidos que codifican un marcador de selección (*URA3*); una copia del factor de transcripción *GAL4* de levadura nativo bajo su propio promotor; dos enzimas de levadura nativas de la ruta de mevalonato (*ERG10* que codifica Acetoacetyl-CoA tiolasa y *ERG13*, que codifica HMG-CoA sintasa), así como dos copias de una versión de codones optimizados para levadura de HMG-CoA reductasa de *Silicibacter pomeroyi*, todos bajo promotores inducibles por galactosa (promotores de los genes *GAL1* y *GAL10* de *S. cerevisiae*, flanqueados por secuencias homólogas que consisten en las secuencias de nucleótidos cadena arriba y cadena abajo del locus de endonucleasa *HO* de *S. cerevisiae*. Tras la introducción en una célula hospedadora, la construcción ms63907 se integra por integración homóloga en el genoma de la célula hospedadora, alterando funcionalmente *HO* al reemplazar la secuencia codificante de *HO* con su secuencia de integración. La construcción se ensambló usando los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 8.221.982. Los transformantes se seleccionaron en placas de CSM-URA con un 2 % de glucosa y se confirmaron por amplificación por PCR.

La construcción de integración ms63908 (i84024; SEQ ID NO:52) es idéntica a ms63907, con dos excepciones: en primer lugar, *ERG10* se reemplaza por una versión de codones optimizados para levadura del gen *nph77* de *Streptomyces sp. CL190* que codifica acetil-CoA:malonil-CoA aciltransferasa (n.º de registro AB540131.1) fusionado al terminador de *AHP1* (125 pb cadena abajo de la secuencia codificante de *AHP1* en *S. cerevisiae*); en segundo lugar, las secuencias que codifican la HMG-CoA reductasa de *S. pomeroyi* se reemplazan por *HMG*, la secuencia codificante de *HMG1* truncada que codifica la HMG-CoA reductasa de *S. cerevisiae* nativa.

La construcción de integración ms63909 (i84026; SEQ ID NO:53) es idéntica a ms63907, con una excepción: las secuencias que codifican la HMG-CoA reductasa de *S. pomeroyi* se reemplazan por *tHMG*, la secuencia codificante de *HMG1* truncada que codifica la HMG-CoA reductasa de *S. cerevisiae* nativa.

La construcción de integración ms64472 (i85207; SEQ ID NO:54) se muestra a continuación.

GAL80 US	pGAL7	ID11	AaFS	pGAL1	pGAL10	ERG20	URA3	ERG8	pGAL7	ERG19	pGAL10	pGAL1	ERG12	GAL80 DS
----------	-------	------	------	-------	--------	-------	------	------	-------	-------	--------	-------	-------	----------

Esta construcción comprende secuencias de nucleótidos que codifican un marcador de selección (*URA3*); cinco enzimas de levadura nativas de la ruta de ergosterol (*ERG12* que codifica mevalonato quinasa, *ERG8* que codifica fosfomevalonato quinasa, *ERG19* que codifica mevalonato pirofosfato descarboxilasa, *ID11* que codifica dimetilalil difosfato isomerasa y *ERG20* que codifica farnesil pirofosfato sintetasa), así como una versión de codones optimizados para levadura evolucionada de la farneseno sintasa de *Artemisia annua*, todos bajo promotores inducibles por galactosa (Promotores de los genes *GAL1*, *GAL10* y *GAL7* de *S. cerevisiae*). Estas secuencias están flanqueadas por secuencias homólogas que consisten en las secuencias de nucleótidos cadena arriba y cadena abajo de *GAL80*. Tras la introducción en una célula hospedadora, la construcción ms64472 se integra por integración homóloga en el genoma de la célula hospedadora, rompiendo funcionalmente *GAL80* al reemplazar la secuencia codificante de *GAL80* por su secuencia de integración. La construcción se ensambló usando los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 8.221.982. Los transformantes se seleccionaron en placas de CSM-URA con un 2 % de glucosa y se confirmaron por amplificación por PCR.

6.2.1.2 Cuantificación de mevalonato

Se inocularon colonias individuales en pocillos de una placa de 96 pocillos en medio de siembra (15 g/l de sulfato amónico, 8 g/l de fosfato potásico, 6,1 g/l de sulfato de magnesio, 150 mg/l de EDTA, 57,5 mg/l de sulfato de cinc, 4,8 mg/l de cloruro cobalto, 3,24 mg/l de cloruro de manganeso, 5 mg/l de sulfato de cobre, 29,4 mg/l de cloruro cálcico, 27,8 mg/l de sulfato de hierro, 4,8 mg/l de molibdato sódico, 0,6 mg/l de biotina, 12 mg/l de pantotenato cálcico, 12 mg/l de ácido nicotínico, 30 mg/l de inositol, 12 mg/l de clorhidrato de tiamina, 12 mg/l de clorhidrato de piridoxina, 0,24 mg/l de ácido para-aminobenzoico) con succinato 50 mM pH 5,0 y 20 g/l de sacarosa, y se cultivaron a 30 °C durante tres días. Después, se subcultivaron 14,4 ul de cultivo en medio de siembra con succinato 50 mM pH 5,0 y 40 g/l de galactosa, y se cultivaron a 30 °C durante 2 días.

Para cuantificar el mevalonato secretado, primero se centrifugó caldo de células enteras a 14.000 RPM durante 5 min. Después se incubaron 10 ul de caldo clarificado con 190 ul de tampón de ensayo (CoA 1 mM, NAD 2 mM, HMG-CoA reductasa de *Pseudomonas mevalonii* purificada y liofilizada a 0,2 mg/ml, HMG-CoA liasa de *Pseudomonas mevalonii* purificada y liofilizada a 0,1 mg/ml, TrisCl 95 mM pH 8,5, MgCl2 20 mM y DTT 5 mM). La muestra se incubó durante 30 minutos a 30 °C, después se ensayó por absorbancia a 340 nm en un lector de placas Beckman M5. La concentración de mevalonato se cuantificó mediante representación en una curva patrón generada con mevalonato purificado.

6.2.1.3 Cuantificación de farneseno

Los cultivos primero se dejaron crecer como se ha descrito anteriormente. Para cuantificar el farneseno, se añadieron 600 µl de 2-butoxietanol a 150 µl de caldo de células enteras en tres adiciones de 200 µl cada una, con 90 segundos de agitación a 1000 rpm en un agitador de placa de 96 pocillos entre cada adición. Después las muestras se incubaron durante 40 minutos. Se mezclaron 8 µl del extracto de 2-butoxietanol con 200 µl de alcohol isopropílico en una placa UV de 96 pocillos (Costar 3635), y después se realizó la lectura en un lector de placas por absorbancia 222.

6.2.1.4 Cuantificación de densidad óptica

En una placa de ensayo de 96 pocillos, se mezclaron 8 µl de cultivo con diluyente (PEG 200 al 20 %, Etanol al 20 %, Triton X-114 al 2 %) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa de ensayo se sometió a agitación vortical antes de medir la DO_{600} en un lector de placas Beckman M5.

6.2.1.5 Fermentación discontinua

Se dejaron crecer cultivos de inóculo de Y967, Y12869 y Y12746 procedentes de colonias individuales en 5 ml de medio de siembra con succinato 50 mM pH 5,0 y 20 g/l de sacarosa. Después de 3 días de crecimiento, los precultivos se subcultivaron en 25 ml de medio de siembra con succinato 50 mM pH 5,0 y 40 g/l de sacarosa a una densidad óptica inicial (DO) de 0,1. Después de 10 horas, los cultivos se subcultivaron de nuevo en 50 ml de medio de siembra con succinato 50 mM pH 5,0 y 40 g/l de sacarosa a una DO de 0,05. Los cultivos se dejaron crecer a 30 °C. Cuando la DO era aproximadamente 3, los 3 matraces se dividieron por la mitad, se centrifugaron y se desechó el medio. Los cultivos se resuspendieron en 1,5 l de medio de siembra con 40 g/l de glucosa (sin succinato) y se transfirieron al fermentador. Los experimentos de fermentación se realizaron en un recipiente Biostat B plus de 2 l (Sartorius, Alemania). La agitación se controló a 1200 rpm y el fermentador se purgó de forma continua con 0,5 l/min de aire. El pH se mantuvo a 5,0 con NH_4OH 14,4 M y la temperatura se mantuvo a 30 °C. Aproximadamente cada 1,5 horas, se extrajo una muestra para medir la DO, el peso celular seco y los ácidos orgánicos y azúcares.

6.2.2 Resultados

6.2.2.1 Las cepas de ADA producen más isoprenoides cuando se emparejan con una HMGr que usa NADH frente a una HMGr que usa NADPH

La FIG. 12A muestra que la cepa Y12869, que comprende una delección del bypass de PDH (*acs1Δ acs2Δ ald6Δ*) y que expresa de forma heteróloga ADA (Dz.eutE), produce más farneseno cuando expresa una ruta de MEV que comprende una HMGr que usa NADH (construcción ms63907) en comparación con una ruta de MEV que comprende una HMGr que usa NADPH (construcción ms63909). Por el contrario, la FIG. 12B muestra que la cepa Y968, que comprende un bypass de PDH intacto, produce más farneseno cuando se empareja con una HMGr que usa NADPH. Estos resultados demuestran que la utilización de ADA para la producción de isoprenoides a partir de la ruta de MEV se mejora cuando la ruta de MEV comprende una HMG que usa NADH.

6.2.2.2 La expresión de ADA produce un desequilibrio redox que se alivia cuando PK y PTA comparten flujo con glicólisis

La levadura nativa produce dos NADH por glucosa consumida a través de la glicólisis. Cuando se fermenta a etanol, los dos NADH se reoxidan a NAD^+ . Sin embargo, una fracción de la glucosa se convierte en biomasa en lugar de fermentarse para producir etanol, dando como resultado un exceso de NADH. Este exceso de NADH se reoxida a NAD^+ a través de la reducción de dihidroxiacetona fosfato para dar glicerol 3-fosfato, que se hidroliza para a glicerol. Las cepas que usan la acetaldéhidó deshidrogenasa de acilación en lugar del bypass de PDH nativo producen NADH en lugar de NADPH, dando como resultado un exceso adicional de NADH. Por cada glucosa convertida en biomasa, una cepa que usa ADA en lugar del bypass de PDH nativo produce exactamente dos veces la cantidad de NADH, lo que significa que debe producirse dos veces más glicerol para reoxidar el exceso de NADH. Como se muestra en la FIG. 13A, Y12869 (una cepa que usa ADA en lugar del bypass de PDH de tipo silvestre) produce dos veces la cantidad de glicerol que Y968 (que comprende un bypass de PDH intacto) mientras que consume niveles comparables de glucosa en una fermentación de glucosa discontinua. Estos resultados demostraron que Y12869 tiene un desequilibrio redox como se predijo por la estequiometría de la reacción de ADA.

La adición de fosfocetolasa y fosfotransacetilasa a una cepa de ADA proporciona una ruta no glicolítica alternativa para generar AcCoA a partir de glucosa, reduciendo el NADH producido a través de la glicólisis y mejorando el equilibrio redox. Como se muestra en la FIG. 13B, Y12745 (una cepa que lleva fosfocetolasa y fosfotransacetilasa además de la ADA) produce la mitad de glicerol que Y12869, mientras que consume niveles comparables de glucosa en una fermentación de glucosa discontinua.

6.2.2.3 Los ahorros de ATP en una cepa de ADA se realizan a costa de la fuerza impulsora termodinámica, que se alivia por un fuerte impulso cadena abajo sobre la acetil-CoA

5 La reacción de bypass de PDH nativo para formar Acetil-CoA es termodinámicamente favorable porque la reacción se acopla a la hidrólisis de ATP para dar AMP. Por el contrario, la reacción de la acetaldehído deshidrogenasa de acilación no se acopla a ATP, y está mucho más próxima al equilibrio que las reacciones de bypass de PDH nativo para formar Acetil-CoA. Entonces, cuando se usan genes de la ruta de *S. cerevisiae* nativa para producir mevalonato, las cepas que usan la ADA producen mucho menos mevalonato que las cepas que usan el bypass de PDH de tipo silvestre a pesar de las propiedades cinéticas comparables de ADA y Ald6 *in vitro*. Como se muestra en la FIG. 14 (1ª y 2ª columnas), la producción de mevalonato en una cepa de ADA (Y12869.ms63909) es solo ~30 % de la de una cepa equivalente de tipo silvestre (Y968.ms63909), a pesar de la suficiente capacidad cinética medida *in vitro*. Este resultado refleja la ausencia de una fuerza impulsora termodinámica detrás de la conversión de acetaldehído en acetil-CoA por la ADA.

15 La Erg10 acetil-CoA tiolasa cataliza la formación de acetoacetil-CoA a partir de dos acetil-CoA, una reacción que es termodinámicamente desfavorable. La acetoacetil-CoA sintasa (es decir, acetil-CoA:malonil-CoA aciltransferasa), codificada por *nphT7*, cataliza la formación de acetoacetil-CoA a partir de acetil-CoA y malonil-CoA, una reacción que es termodinámicamente favorable debido a la descarboxilación de malonil-CoA. Poniendo esta reacción termodinámicamente favorable directamente cadena abajo de la producción de AcCoA, se proporciona una fuerza impulsora termodinámica que aumenta la actividad directa de ADA. Como se muestra en la FIG. 14 (3ª y 4ª columnas), Cuando se sobreexpresa *nphT7* en lugar de *ERG10*, Y968.ms63908 y Y12869.ms63908 fabrican niveles comparables de mevalonato. Además, producen sustancialmente más mevalonato que cepas equivalentes que usan *ERG10* para la primera etapa de la ruta de MEV (Y968.ms63909 y Y12869.63909.).

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMYRIS, INC.
GARDNER, Timothy Stevens
HAWKINS, Kristy Michelle
30 MEADOWS, Adam Leon
TSONG, Annie Ening
TSEGAYE, Yoseph

<120> PRODUCCIÓN DE ISOPRENOIDES DERIVADOS DE ACETIL-COENZIMA A

<130> 107345.00374

<150> US 61/557.893

<151> 09-11-2011

<160> 54

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1380
<212> ADN
<213> *Dickeya zeae*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1380)
<223> secuencia del gen *eutE* de *Dickeya zeae*

<400> 1

```

atggagcatt cagttatcga accgacagtg cccatgccgc tgccagccat gtttgacgcg      60
ccatctggaa tcttttctag cctggacgat gcagtccagg cggcaaccct ggcacaacaa      120
cagttgtcgt ctgtggagtt acgccagcaa gttattaaag caattagagt tgcaggcgaa      180
cgctatgcac aggttctggc ggaaatggcg gtggctgaaa caggtatggg tcgggtagtg      240
gataaataca ttaaaaatgt ttcacaggct cgccatacac ccggcattga atgtctgagc      300
gcggaagttc tgacaggcga caatggcctg aactgattg aaaatgccc ttggggagtg      360
gtggcttcgg tgacgccaag cacgaacca gcgccacag tcatcaataa tgcaatttcc      420
atgattgcgg caggggaattc agtcgttttt gcaccgcacc catccgcaa aaatgtgtcc      480
ttacgcacaa tatcgcttct taacaaagca attgtggcga caggtgggcc agaaaatctg      540
ctggatatcg tcgcaaatcc caacatcgaa acagctcaac gcctgttcgg ttatccaggt      600
attggattac tcgtcgtaac aggtggtgag gcggtggtgg aagcggcgcg caaacacact      660
gataaacgtt taattgccgc aggcgccgga aacccccag tagtcgttga cgaaacagcg      720
gatataccga aagccgctcg cgcaatagta aaggcgctt cgtttgacaa caatattatt      780
tgtgccgacg agaaagtatt aatcgtggtt gatcgcttag ccgacgcctt attagccgaa      840
atgcaacgca acaatgctgt tttactgacg cctgaacaga cagaacgact tctgcccgct      900
ttgctgagcg atatagatga gcaggggaag ggacgcgtga accgcgatta tgtggggagg      960

gatgccgcta aactagcggc ggccattggt ttagaagtgt cagaacacac aagattatta      1020
cttgctgaaa cagatgctga tcatcctttt gcagtaaccg aattaatgat gcccgtattg      1080
cctgttatcc gtgtaaaaaa cggtgatgac gccattgcc tcgctgtaaa acttgagagt      1140
ggttgctcgc aactgcagc aatgcattcg acaaacatta ggaacctgaa tcggatggca      1200
aatgctataa atacatcaat ttttgtaaaa aatgggccgt gtatcgctgg gctgggcctg      1260
ggtggcgagg gctggacgct gatgactata tctacacca caggggaagg agttacctca      1320
gcacgcacct tcgtacgttt acgtagatgt gtattggttg acatgttcag aatcgcgtaa      1380

```

<210> 2
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> *Dickeya zeae*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(459)
 <223> secuencia de proteína eutE de *Dickeya zeae*

<400> 2

ES 2 628 847 T3

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

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

385		390		395		400									
Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Ser	Ile	Phe	Val	Lys	Asn	Gly	Pro	Cys	Ile	Ala
			405						410					415	
Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Gly	Glu	Gly	Trp	Thr	Ser	Met	Thr	Ile	Ser	Thr
			420					425						430	
Pro	Thr	Gly	Glu	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Arg	Thr	Phe	Val	Arg	Leu	Arg
		435					440					445			
Arg	Cys	Val	Leu	Val	Asp	Met	Phe	Arg	Ile	Ala					
	450					455									

<210> 3
 <211> 2728
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2728)
 <223> secuencia de nucleótidos de ACS1 de *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

acctccgcg	acctccaaa	tcgaactacc	ttcacaatgt	cgccctctgc	cgtacaatca	60
tcaaaactag	aagaacagtc	aagtgaatt	gacaagttga	aagcaaaaat	gtcccagtct	120
gcctccactg	cgcagcagaa	gaaggaacat	gagtatgaac	atttgacctc	ggtcaagatc	180
gtgccacaac	ggcccatctc	agatagactg	cagcccgcaa	ttgtacccca	ctattctcca	240
cacttgagcg	gggtgcagga	ctatcagcgc	ttgcacaagg	agtctattga	agaccctgct	300
aagttcttcg	gttctaaagc	taccaatctt	ttaaactggg	ctaagccatt	cgataaggtg	360
ttcatcccag	actctaaaac	gggtaggccc	tccttcagga	acaatgcatg	gttctctaac	420
ggccaattaa	acgcctgtta	caactgtgtt	gacagacatg	ccttgaagac	ccctaacaag	480
aaagccatta	ttttcgaagg	tgacgagcct	ggccaaggct	attccattac	ctacaaggaa	540
ctacttgaag	aagtttgtca	agtggcacia	gtgtgactt	actctatggg	cgttcgcaag	600
ggcgatactg	ttgccgtgta	catgcctatg	gtcccagaag	caatcataac	cttggtggcc	660
atttcccgtg	tcggcgccat	tcactccgta	gtctttgccc	ggttttcttc	caactccttg	720
agagatcgta	tcaacgatgg	ggactctaaa	gttgatcatca	ctacagatga	atccaacaga	780
ggtggtaaa	tcattgagac	taaaagaatt	gttgatgacg	cgctaagaga	gaccccaggc	840
gtgagacacg	tcttggttta	tagaaagacc	aacaatccat	ctgttgcttt	ccatgcccc	900
agagatttag	attgggcaac	agaaaagaag	aaatacaaga	cctactatcc	atgcacaccc	960

ES 2 628 847 T3

```

gttgattctg aggatccatt attcttgttg tatacgtctg gttctactgg tgccccaag 1020
gggtgtcaac attctaccgc aggttacttg ctgggagctt tgttgaccat gcgctacact 1080
tttgacactc accaagaaga cgttttcttc acagctggag acattggctg gattacaggc 1140
cacacttatg tggtttatgg tcccttacta tatggttgtg ccactttggt ctttgaaggg 1200
actcctgcgt acccaaatta ctcccgttat tgggatatta ttgatgaaca caaagtcacc 1260
caattttatg ttgcccacac tgctttgcgt ttgttgaaaa gagctggtga ttcctacatc 1320
gaaaatcatt ccttaaaatc tttgcgttgc ttgggttcgg tcggtgaacc aattgctgct 1380
gaagtgtggg agtgggtactc tgaaaaaata ggtaaaaatg aaatcccat tgtagacacc 1440
tactggcaaa cagaatctgg ttgcgcatcg gtcaccccg cggctggtgg tgtcacacca 1500
atgaaaccgg gttctgcctc attccccttc ttcggtattg atgcagttgt tcttgaccct 1560
aacactggtg aagaacttaa taccagccac gcagagggtg tccttgccgt caaagctgca 1620
tggccatcat ttgcaagaac tatttgaaa aatcatgata ggtatctaga cacttatttg 1680
aaccttacc ctggctacta tttcactggg gatgggtgctg caaaggataa ggatggttat 1740
atctggattt tgggtcgtgt agacgatgtg gtgaacgtct ctggtcaccg tctgtctacc 1800
gctgaaattg aggtgctat tatcgaagat ccaattgtgg ccgagtgtgc tgtgtcggg 1860
ttcaacgatg acttgactgg tcaagcagtt gctgcatttg tgggtgtgaa aaacaaatct 1920
aattggtcca ccgcaacaga tgatgaatta caagatatca agaagcattt ggtctttact 1980
gttagaaaag acatcgggcc atttgccgca ccaaaattga tcattttagt ggtgacttg 2040
cccaagacaa gatctggcaa aattatgaga cgtattttaa gaaaaatcct agcaggagaa 2100
agtgaccaac taggcgacgt ttctacattg tcaaaccctg gcattgttag acatctaatt 2160
gattcgggtc agttgtaatg atgatttctt tcctttttat attgacgact tttttttttt 2220
cgtgtgtttt tgttctctta taaccgagct gcttacttat tattatttca ccttctcttt 2280
ttatttatac ttataattat ttattcttta catactgtta caagaaactc ttttctacat 2340
taattgcata aagtgtcaat cagcacatcc tctatatcgc tatcaacaac aaatttgaca 2400
aacctgccta tatcttcagg aacaactgcc gcacgcgtac caccactact tgtgaagtcc 2460
ctggagttta atatgcactg aaatttacct agccgtttta cacaagacca taatccatcc 2520
atgctatcgc agtatatgat tttgtgttcg tttttcgtct tgcgaaaggc atcctcaatg 2580
gcttgtttca ttgatccatc agtgtggctc gtaggtacca gcaaaaccac ttcacagcg 2640
gcgtactcct cccactttat gggcagtcct tgtatcgact tgctcattat aatacatttg 2700
ctctatcccc gcgtgcttgg ccggccgt 2728

```

<210> 4
 <211> 713
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(713)
 <223> secuencia de proteína ACS1 de *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4

```

Met Ser Pro Ser Ala Val Gln Ser Ser Lys Leu Glu Glu Gln Ser Ser
1           5           10           15

Glu Ile Asp Lys Leu Lys Ala Lys Met Ser Gln Ser Ala Ser Thr Ala
20           25           30

Gln Gln Lys Lys Glu His Glu Tyr Glu His Leu Thr Ser Val Lys Ile
35           40           45

Val Pro Gln Arg Pro Ile Ser Asp Arg Leu Gln Pro Ala Ile Ala Thr
50           55           60

His Tyr Ser Pro His Leu Asp Gly Leu Gln Asp Tyr Gln Arg Leu His
65           70           75           80

Lys Glu Ser Ile Glu Asp Pro Ala Lys Phe Phe Gly Ser Lys Ala Thr
85           90           95

Gln Phe Leu Asn Trp Ser Lys Pro Phe Asp Lys Val Phe Ile Pro Asp
100          105          110

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

Gly Gln Leu Asn Ala Cys Tyr Asn Cys Val Asp Arg His Ala Leu Lys
130          135          140

Thr Pro Asn Lys Lys Ala Ile Ile Phe Glu Gly Asp Glu Pro Gly Gln
145          150          155          160

Gly Tyr Ser Ile Thr Tyr Lys Glu Leu Leu Glu Glu Val Cys Gln Val
165          170          175

Ala Gln Val Leu Thr Tyr Ser Met Gly Val Arg Lys Gly Asp Thr Val
180          185          190

Ala Val Tyr Met Pro Met Val Pro Glu Ala Ile Ile Thr Leu Leu Ala
195          200          205

```

Ile	Ser	Arg	Ile	Gly	Ala	Ile	His	Ser	Val	Val	Phe	Ala	Gly	Phe	Ser	210	215	220	
Ser	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Arg	Ile	Asn	Asp	Gly	Asp	Ser	Lys	Val	Val	225	230	235	240
Ile	Thr	Thr	Asp	Glu	Ser	Asn	Arg	Gly	Gly	Lys	Val	Ile	Glu	Thr	Lys	245	250	255	
Arg	Ile	Val	Asp	Asp	Ala	Leu	Arg	Glu	Thr	Pro	Gly	Val	Arg	His	Val	260	265	270	
Leu	Val	Tyr	Arg	Lys	Thr	Asn	Asn	Pro	Ser	Val	Ala	Phe	His	Ala	Pro	275	280	285	
Arg	Asp	Leu	Asp	Trp	Ala	Thr	Glu	Lys	Lys	Lys	Tyr	Lys	Thr	Tyr	Tyr	290	295	300	
Pro	Cys	Thr	Pro	Val	Asp	Ser	Glu	Asp	Pro	Leu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Thr	305	310	315	320
Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Ala	Pro	Lys	Gly	Val	Gln	His	Ser	Thr	Ala	Gly	325	330	335	
Tyr	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Leu	Thr	Met	Arg	Tyr	Thr	Phe	Asp	Thr	His	340	345	350	
Gln	Glu	Asp	Val	Phe	Phe	Thr	Ala	Gly	Asp	Ile	Gly	Trp	Ile	Thr	Gly	355	360	365	
His	Thr	Tyr	Val	Val	Tyr	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Cys	Ala	Thr	Leu	370	375	380	
Val	Phe	Glu	Gly	Thr	Pro	Ala	Tyr	Pro	Asn	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Trp	Asp	385	390	395	400
Ile	Ile	Asp	Glu	His	Lys	Val	Thr	Gln	Phe	Tyr	Val	Ala	Pro	Thr	Ala	405	410	415	
Leu	Arg	Leu	Leu	Lys	Arg	Ala	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ile	Glu	Asn	His	Ser	420	425	430	
Leu	Lys	Ser	Leu	Arg	Cys	Leu	Gly	Ser	Val	Gly	Glu	Pro	Ile	Ala	Ala	435	440	445	
Glu	Val	Trp	Glu	Trp	Tyr	Ser	Glu	Lys	Ile	Gly	Lys	Asn	Glu	Ile	Pro	450	455	460	

Ile Val Asp Thr Tyr Trp Gln Thr Glu Ser Gly Ser His Leu Val Thr
 465 470 475 480
 Pro Leu Ala Gly Gly Val Thr Pro Met Lys Pro Gly Ser Ala Ser Phe
 485 490 495
 Pro Phe Phe Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Asp Pro Asn Thr Gly Glu
 500 505 510
 Glu Leu Asn Thr Ser His Ala Glu Gly Val Leu Ala Val Lys Ala Ala
 515 520 525
 Trp Pro Ser Phe Ala Arg Thr Ile Trp Lys Asn His Asp Arg Tyr Leu
 530 535 540
 Asp Thr Tyr Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr Tyr Phe Thr Gly Asp Gly
 545 550 555 560
 Ala Ala Lys Asp Lys Asp Gly Tyr Ile Trp Ile Leu Gly Arg Val Asp
 565 570 575
 Asp Val Val Asn Val Ser Gly His Arg Leu Ser Thr Ala Glu Ile Glu
 580 585 590
 Ala Ala Ile Ile Glu Asp Pro Ile Val Ala Glu Cys Ala Val Val Gly
 595 600 605
 Phe Asn Asp Asp Leu Thr Gly Gln Ala Val Ala Ala Phe Val Val Leu
 610 615 620
 Lys Asn Lys Ser Asn Trp Ser Thr Ala Thr Asp Asp Glu Leu Gln Asp
 625 630 635 640
 Ile Lys Lys His Leu Val Phe Thr Val Arg Lys Asp Ile Gly Pro Phe
 645 650 655
 Ala Ala Pro Lys Leu Ile Ile Leu Val Asp Asp Leu Pro Lys Thr Arg
 660 665 670
 Ser Gly Lys Ile Met Arg Arg Ile Leu Arg Lys Ile Leu Ala Gly Glu
 675 680 685
 Ser Asp Gln Leu Gly Asp Val Ser Thr Leu Ser Asn Pro Gly Ile Val
 690 695 700
 Arg His Leu Ile Asp Ser Val Lys Leu
 705 710

<210> 5
 <211> 2287
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2287)
 <223> secuencia de nucleótidos de ACS2 de *Saccharomyces cerevisiae*

10

<400> 5

acctcccgcg acctccaaaa tcgaactacc ttcacaatga caatcaagga acataaagta	60
gtttatgaag ctccacaacgt aaaggctctt aaggctcctc aacattttta caacagccaa	120
cccggcaagg gttacgttac tgatatgcaa cattatcaag aaatgtatca acaatctatc	180
aatgagccag aaaaattctt tgataagatg gctaaggaat acttgcatg ggatgctcca	240
tacaccaaag ttcaatctgg ttcatgaac aatggtgatg ttgcatggtt ttgaacggt	300
aaattgaatg catcatacaa ttgtgttgac agacatgcct ttgctaatac cgacaagcca	360
gctttgatct atgaagctga tgacgaatcc gacaacaaaa tcatcacatt tggatgaatta	420
ctcagaaaag tttcccaaat cgctggtgtc ttaaaaagct ggggcgttaa gaaagggtgac	480
acagtggcta tctatttgcc aatgattcca gaagcggcca ttgctatgtt ggctgtggct	540
cgtattgggt ctattcactc tgttgtcttt gctgggttct ccgctggttc gttgaaagat	600
cgtgtcgttg acgctaattc taaagtgtc atcacttgtg atgaaggtaa aagagggtgt	660
aagaccatca acactaaaa aattgttgac gaagggttga acggagtoga tttggtttcc	720
cgtatcttgg tttccaaaag aactggtact gaagggtatt caatgaagga ccgtagagat	780
tactgggtggc atgaggaggc cgctaagcag agaacttacc tacctcctgt ttcattgtgac	840
gctgaagatc ctctattttt attatacact tccggttcca ctggttctcc aaagggtgtc	900
gttcacacta cagggtggtt tttattaggt gccgctttaa caactagata cgtttttgat	960
attcaccacg aagatgttct ctactgccc ggtgacgtcg gctggatcac gggtcacacc	1020
tatgctctat atggtccatt aaccttgggt accgcctcaa taattttcga atccactcct	1080
gcctaccacg attatggtag atattggaga attatccaac gtcacaagga taccatttc	1140
tatgtggctc caactgcttt aagattaatc aaacgtgtag gtgaagccga aattgccaaa	1200
tatgacactt cctcattacg tgtcttgggt tccgtcgtg aaccaatctc tccagactta	1260
tgggaatggt atcatgaaaa agtgggtaac aaaaactgtg tcatttgtga cactatgtgg	1320
caaacagagt ctggttctca ttttaattgct cctttggcag gtgctgtccc aacaaaacct	1380
ggttctgcta ccgtgccatt ctttggattt aacgcttgta tcattgacct tgttacagg	1440
gtggaattag aaggtaatga tgtcgaagggt gtccttgccg ttaaatacacc atggccatca	1500

```

atggctagat ctgtttggaa ccaccacgac cgttacatgg atacttactt gaaaccttat 1560
cctggtcact atttcacagg tgatgggtgct ggtagagatc atgatgggta ctactggatc 1620
aggggtagag ttgacgacgt tgtaaatggt tccggtcata gattatccac atcagaaatt 1680
gaagcatcta tctcaaatca cgaaaacgtc tcggaagctg ctgttgtcgg tattocagat 1740
gaattgaccg gtcaaaccgt cgttgcatat gtttccttaa aagatgggta tctacaaaac 1800
aacgctactg aaggtgatgc agaacacatc acaccagata atttacgtag agaattgatc 1860
ttacaagtta ggggtgagat tggtcctttc gcctcaccaa aaaccattat tctagttaga 1920
gatctaccaa gaacaaggtc aggaaagatt atgagaagag ttctaagaaa ggttgcttct 1980
aacgaagccg aacagctagg tgacctaaact actttggcca acccagaagt tgtacctgcc 2040
atcattttctg ctgtagagaa ccaatttttc tctcaaaaaa agaaataact taaatgagaa 2100
aaatttcgta atgagataaa atttcgctcc ttttctgttt tctattttct attttcccaa 2160
cttttgctct attcagttat aaattactat ttatccatca gttaaaaaac aagatctttt 2220
actggtcagc taggaaagcg aaaatacaaa gactttatgc actatccccg cgtgcttggc 2280
cggccgt 2287

```

<210> 6
 <211> 683
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(683)
 <223> secuencia de proteína ACS2 de *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 6

```

Met Thr Ile Lys Glu His Lys Val Val Tyr Glu Ala His Asn Val Lys
1              5              10              15

Ala Leu Lys Ala Pro Gln His Phe Tyr Asn Ser Gln Pro Gly Lys Gly
20              25              30

Tyr Val Thr Asp Met Gln His Tyr Gln Glu Met Tyr Gln Gln Ser Ile
35              40              45

Asn Glu Pro Glu Lys Phe Phe Asp Lys Met Ala Lys Glu Tyr Leu His
50              55              60

Trp Asp Ala Pro Tyr Thr Lys Val Gln Ser Gly Ser Leu Asn Asn Gly
65              70              75              80

```

Asp	Val	Ala	Trp	Phe	Leu	Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Ala	Ser	Tyr	Asn	Cys	
				85					90					95		
Val	Asp	Arg	His	Ala	Phe	Ala	Asn	Pro	Asp	Lys	Pro	Ala	Leu	Ile	Tyr	
			100					105					110			
Glu	Ala	Asp	Asp	Glu	Ser	Asp	Asn	Lys	Ile	Ile	Thr	Phe	Gly	Glu	Leu	
		115					120					125				
Leu	Arg	Lys	Val	Ser	Gln	Ile	Ala	Gly	Val	Leu	Lys	Ser	Trp	Gly	Val	
	130					135					140					
Lys	Lys	Gly	Asp	Thr	Val	Ala	Ile	Tyr	Leu	Pro	Met	Ile	Pro	Glu	Ala	
145					150					155					160	
Val	Ile	Ala	Met	Leu	Ala	Val	Ala	Arg	Ile	Gly	Ala	Ile	His	Ser	Val	
				165					170					175		
Val	Phe	Ala	Gly	Phe	Ser	Ala	Gly	Ser	Leu	Lys	Asp	Arg	Val	Val	Asp	
			180					185					190			
Ala	Asn	Ser	Lys	Val	Val	Ile	Thr	Cys	Asp	Glu	Gly	Lys	Arg	Gly	Gly	
		195					200					205				
Lys	Thr	Ile	Asn	Thr	Lys	Lys	Ile	Val	Asp	Glu	Gly	Leu	Asn	Gly	Val	
	210					215					220					
Asp	Leu	Val	Ser	Arg	Ile	Leu	Val	Phe	Gln	Arg	Thr	Gly	Thr	Glu	Gly	
225					230					235					240	
Ile	Pro	Met	Lys	Ala	Gly	Arg	Asp	Tyr	Trp	Trp	His	Glu	Glu	Ala	Ala	
				245					250					255		
Lys	Gln	Arg	Thr	Tyr	Leu	Pro	Pro	Val	Ser	Cys	Asp	Ala	Glu	Asp	Pro	
			260					265					270			
Leu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Pro	Lys	Gly	Val	
		275					280					285				
Val	His	Thr	Thr	Gly	Gly	Tyr	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Thr	Thr	Arg	
	290					295					300					
Tyr	Val	Phe	Asp	Ile	His	Pro	Glu	Asp	Val	Leu	Phe	Thr	Ala	Gly	Asp	
305					310					315					320	
Val	Gly	Trp	Ile	Thr	Gly	His	Thr	Tyr	Ala	Leu	Tyr	Gly	Pro	Leu	Thr	
				325					330					335		

Leu Gly Thr Ala Ser Ile Ile Phe Glu Ser Thr Pro Ala Tyr Pro Asp
 340 345 350

Tyr Gly Arg Tyr Trp Arg Ile Ile Gln Arg His Lys Ala Thr His Phe
 355 360 365

Tyr Val Ala Pro Thr Ala Leu Arg Leu Ile Lys Arg Val Gly Glu Ala
 370 375 380

Glu Ile Ala Lys Tyr Asp Thr Ser Ser Leu Arg Val Leu Gly Ser Val
 385 390 395 400

Gly Glu Pro Ile Ser Pro Asp Leu Trp Glu Trp Tyr His Glu Lys Val
 405 410 415

Gly Asn Lys Asn Cys Val Ile Cys Asp Thr Met Trp Gln Thr Glu Ser
 420 425 430

Gly Ser His Leu Ile Ala Pro Leu Ala Gly Ala Val Pro Thr Lys Pro
 435 440 445

Gly Ser Ala Thr Val Pro Phe Phe Gly Ile Asn Ala Cys Ile Ile Asp
 450 455 460

Pro Val Thr Gly Val Glu Leu Glu Gly Asn Asp Val Glu Gly Val Leu
 465 470 475 480

Ala Val Lys Ser Pro Trp Pro Ser Met Ala Arg Ser Val Trp Asn His
 485 490 495

His Asp Arg Tyr Met Asp Thr Tyr Leu Lys Pro Tyr Pro Gly His Tyr
 500 505 510

Phe Thr Gly Asp Gly Ala Gly Arg Asp His Asp Gly Tyr Tyr Trp Ile
 515 520 525

Arg Gly Arg Val Asp Asp Val Val Asn Val Ser Gly His Arg Leu Ser
 530 535 540

Thr Ser Glu Ile Glu Ala Ser Ile Ser Asn His Glu Asn Val Ser Glu
 545 550 555 560

Ala Ala Val Val Gly Ile Pro Asp Glu Leu Thr Gly Gln Thr Val Val
 565 570 575

Ala Tyr Val Ser Leu Lys Asp Gly Tyr Leu Gln Asn Asn Ala Thr Glu
 580 585 590

Gly Asp Ala Glu His Ile Thr Pro Asp Asn Leu Arg Arg Glu Leu Ile
595 600 605

Leu Gln Val Arg Gly Glu Ile Gly Pro Phe Ala Ser Pro Lys Thr Ile
610 615 620

Ile Leu Val Arg Asp Leu Pro Arg Thr Arg Ser Gly Lys Ile Met Arg
625 630 635 640

Arg Val Leu Arg Lys Val Ala Ser Asn Glu Ala Glu Gln Leu Gly Asp
645 650 655

Leu Thr Thr Leu Ala Asn Pro Glu Val Val Pro Ala Ile Ile Ser Ala
660 665 670

Val Glu Asn Gln Phe Phe Ser Gln Lys Lys Lys
675 680

<210> 7

<211> 1798

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1798)

<223> secuencia de nucleótidos de ALD4 de *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 7

gcacccaggg acacacagca gcgaagtatt ttcagaatgt tcagtagatc tacgctctgc	60
ttaaagacgt ctgcatcctc cattgggaga cttcaattga gatatttctc acaccttctc	120
atgacagtgc ctatcaagct gcccaatggg ttggaatatg agcaaccaac ggggttggtc	180
atcaacaaca agtttggtcc ttctaaacag aacaagacct tcgaagtcac taacccttcc	240
acggaagaag aaatatgtca tatttatgaa ggtagagagg acgatgtgga agaggccgtg	300
caggccgccc accgtgcctt ctctaattggg tcttggaaac gtatcgaccc tattgacagg	360
ggtaaggcctt tgtacaggtt agccgaatta attgaacagg acaaggatgt cattgcttcc	420
atcgagactt tggataacgg taaagctatc tcttcctcga gaggagatgt tgatttagtc	480
atcaactatt tgaaatcttc tgctggcttt gctgataaaa ttgatggtag aatgattgat	540
actggtagaa cccatttttc ttactaag agacagcctt tgggtgtttg tgggcagatt	600
attccttgga atttccact gttgatgtgg gcctggaaga ttgccctgc tttggtcacc	660
ggtaacaccg tcgtgttgaa gactgcccga tccaccccat tgcgcgcttt gtatgtgtct	720
aaatacatcc cacaggcggg tattccacct ggtgtgatca acattgtatc cgggtttggt	780

```

aagattgtgg gtgaggccat tacaaaccat ccaaaaatca aaaaggttgc cttcacaggg      840
tccacggcta cgggtagaca catttaccag tccgcagccg caggcttgaa aaaagtgact      900
ttggagctgg gtggtaaatc accaaacatt gtcttcgctg acgccgagtt gaaaaaagcc      960
gtgcaaaaca ttatccttgg tatctactac aattctggtg aggtctgttg tgcgggttca     1020
agggtgtatg ttgaagaatc tatttacgac aaattcattg aagagttcaa agccgcttct     1080
gaatccatca aggtgggcga cccttcgat gaatctactt tccaaggtgc acaaacctct     1140
caaatgcaac taaacaaaat cttgaaatac gttgacattg gtaagaatga aggtgctact     1200
ttgattaccg gtggtgaaag attaggtagc aagggttact tcattaagcc aactgtcttt     1260
ggtgacgtta aggaagacat gagaattgtc aaagaggaaa tctttggccc tgttgtcact     1320
gtaaccaaat tcaaactctg cgacgaagtc attaacatgg cgaacgattc tgaatacggg     1380
ttggctgctg gtattcacac ctctaataat aataccgcct taaaagtggc tgatagagtt     1440
aatgcgggta cggctctggat aaacacttat aacgatttcc accacgcagt tcctttcggg     1500
gggttcaatg catctggttt gggcagggaa atgtctgttg atgctttaca aaactacttg     1560
caagttaaag cggctccgtg caaattggac gagtaaggtc atcaataagc ctggtgtcca     1620
atcgatgctt acatacataa aattaaatat tctgtctctg ttatatattc acatgtcatc     1680
atttcaaata tatgtacttt aaagaaaata aaataaaaaa taaaattttt ttctcccgat     1740
aatcaatttt cttaattaat taattgcgtt acgaaacgcg atcgccgacg ccgccgat      1798

```

<210> 8

<211> 519

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> misc feature

10 <222> (1)..(519)

<223> secuencia de proteína ALD4 de *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 8

```

Met Phe Ser Arg Ser Thr Leu Cys Leu Lys Thr Ser Ala Ser Ser Ile
1           5           10           15

```

```

Gly Arg Leu Gln Leu Arg Tyr Phe Ser His Leu Pro Met Thr Val Pro
          20           25           30

```

```

Ile Lys Leu Pro Asn Gly Leu Glu Tyr Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe
          35           40           45

```

```

Ile Asn Asn Lys Phe Val Pro Ser Lys Gln Asn Lys Thr Phe Glu Val
          50           55           60

```

Ile	Asn	Pro	Ser	Thr	Glu	Glu	Glu	Ile	Cys	His	Ile	Tyr	Glu	Gly	Arg	
65					70				75						80	
Glu	Asp	Asp	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Asp	Arg	Ala	Phe	Ser	
				85				90						95		
Asn	Gly	Ser	Trp	Asn	Gly	Ile	Asp	Pro	Ile	Asp	Arg	Gly	Lys	Ala	Leu	
			100				105						110			
Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Ile	Glu	Gln	Asp	Lys	Asp	Val	Ile	Ala	Ser	
		115					120					125				
Ile	Glu	Thr	Leu	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Ile	Ser	Ser	Ser	Arg	Gly	Asp	
	130					135						140				
Val	Asp	Leu	Val	Ile	Asn	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Ala	Gly	Phe	Ala	Asp	
145					150					155					160	
Lys	Ile	Asp	Gly	Arg	Met	Ile	Asp	Thr	Gly	Arg	Thr	His	Phe	Ser	Tyr	
				165					170					175		
Thr	Lys	Arg	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	Cys	Gly	Gln	Ile	Ile	Pro	Trp	Asn	
			180					185					190			
Phe	Pro	Leu	Leu	Met	Trp	Ala	Trp	Lys	Ile	Ala	Pro	Ala	Leu	Val	Thr	
		195					200					205				
Gly	Asn	Thr	Val	Val	Leu	Lys	Thr	Ala	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Ser	Ala	
	210					215					220					
Leu	Tyr	Val	Ser	Lys	Tyr	Ile	Pro	Gln	Ala	Gly	Ile	Pro	Pro	Gly	Val	
225					230					235					240	
Ile	Asn	Ile	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Lys	Ile	Val	Gly	Glu	Ala	Ile	Thr	
				245					250					255		
Asn	His	Pro	Lys	Ile	Lys	Lys	Val	Ala	Phe	Thr	Gly	Ser	Thr	Ala	Thr	
			260					265					270			
Gly	Arg	His	Ile	Tyr	Gln	Ser	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Lys	Lys	Val	Thr	
		275					280					285				
Leu	Glu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ser	Pro	Asn	Ile	Val	Phe	Ala	Asp	Ala	Glu	
	290					295					300					
Leu	Lys	Lys	Ala	Val	Gln	Asn	Ile	Ile	Leu	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Ser	

305		310		315		320									
Gly	Glu	Val	Cys	Cys	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Tyr	Val	Glu	Glu	Ser	Ile
			325						330					335	
Tyr	Asp	Lys	Phe	Ile	Glu	Glu	Phe	Lys	Ala	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Lys
			340					345					350		
Val	Gly	Asp	Pro	Phe	Asp	Glu	Ser	Thr	Phe	Gln	Gly	Ala	Gln	Thr	Ser
		355					360					365			
Gln	Met	Gln	Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Lys	Tyr	Val	Asp	Ile	Gly	Lys	Asn
	370					375					380				
Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Ile	Thr	Gly	Gly	Glu	Arg	Leu	Gly	Ser	Lys	Gly
385					390					395					400
Tyr	Phe	Ile	Lys	Pro	Thr	Val	Phe	Gly	Asp	Val	Lys	Glu	Asp	Met	Arg
			405						410					415	
Ile	Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Phe	Gly	Pro	Val	Val	Thr	Val	Thr	Lys	Phe
			420					425					430		
Lys	Ser	Ala	Asp	Glu	Val	Ile	Asn	Met	Ala	Asn	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gly
		435					440					445			
Leu	Ala	Ala	Gly	Ile	His	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Thr	Ala	Leu	Lys	Val
	450					455					460				
Ala	Asp	Arg	Val	Asn	Ala	Gly	Thr	Val	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Asn	Asp
465				470						475				480	
Phe	His	His	Ala	Val	Pro	Phe	Gly	Gly	Phe	Asn	Ala	Ser	Gly	Leu	Gly
			485					490						495	
Arg	Glu	Met	Ser	Val	Asp	Ala	Leu	Gln	Asn	Tyr	Leu	Gln	Val	Lys	Ala
		500					505					510			
Val	Arg	Ala	Lys	Leu	Asp	Glu									
		515													

<210> 9
 <211> 2744
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2744)

5 <223> secuencia de nucleótidos de aldehído deshidrogenasa 6 citosólica (ALD46) de *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 9

```

catatggcgt atccaagccg aaaccctttg cctcatcccc acggaataag gcagccgaca      60
aaagaaaaac gaccgaaaag gaaccagaaa gaaaaaagag ggtgggcgcg ccgcggacgt      120
gtaaaaagat atgcatccag cttctatatc gctttaactt taccgttttg ggcatcggga      180
acgtatgtaa cattgatctc ctcttgggaa cggtgagtgc aacagatgcg atatagcacc      240
gaccatgtgg gcaaattcgt aataaattcg gggtgagggg gattcaagac aagcaacctt      300
gttagtcagc tcaaacagcg atttaacggg tgagtaacac atcaaaacac cgttcgaggt      360
caagcctggc gtgtttaaca agttcttgat atcatatata aatgtaataa gaagtttggt      420
aatattcaat tcgaagtgtt cagtctttta cttctcttgt tttatagaag aaaaaacatc      480
aagaaacatc tttaacatac acaaacacat actatcagaa tacaatgact aagctacact      540
ttgacactgc tgaaccagtc aagatcacac ttccaaatgg tttgacatac gagcaaccaa      600
coggtctatt cattaacaac aagtttatga aagctcaaga cggttaagacc tatcccgtcg      660
aagatccttc cactgaaaac accgtttgtg aggtctcttc tgccaccact gaagatgttg      720
aatatgctat cgaatgtgcc gaccgtgctt tccacgacac tgaatgggct acccaagacc      780
caagagaaaag aggccgtcta ctaagtaagt tggtgacga attggaaagc caaattgact      840
tggtttcttc cattgaagct ttggacaatg gtaaaacttt ggcctttaag gcccgtaggg      900
atgttaccat tgcaatcaac tgtctaagag atgctgctgc ctatgccgac aaagtcaacg      960
gtagaacaat caacaccggt gacggctaca tgaacttcac caccttagag ccaatcgggtg     1020
tctgtggtca aattattcca tggaaacttt caataatgat gttggcttgg aagatcgccc     1080
cagcattggc catgggtaac gtctgtatct tgaaaccgcg tgctgtcaca cctttaaatg     1140
ccctatactt tgcttcttta tgaagaagg ttggtattcc agctgggtgc gtcaacatcg     1200
ttccagggtc tggtagaact gttggtgctg ctttgaccaa cgaccaaga atcagaaagc     1260
tggtctttac cggttctaca gaagtcggta agagtgttgc tgctgactct tctgaatcta     1320
acttgaagaa aatcactttg gaactaggtg gtaagtccgc ccatttggtc tttgacgatg     1380
ctaacattaa gaagacttta ccaaacttag taaacgggat tttcaagaac gctggtcaaa     1440
tttgttcctc tggttctaga atttacgttc aagaaggat ttacgacgaa ctattggctg     1500
ctttcaaggc ttacttggaa accgaaatca aagttggtaa tccatttgac aaggctaact     1560
tccaaggtgc tatcactaac cgtaacaat tcgacacaat tatgaactac atcgatatcg     1620
gtaagaaaga aggcgccaag atcttaactg gtggcgaaaa agttggtgac aagggttact     1680
tcatcagacc aaccgttttc tacgatgtta atgaagacat gagaattggt aaggaagaaa     1740

```

```

tttttgacc agttgtcact gtcgcaaagt tcaagacttt agaagaaggt gtcgaaatgg      1800
ctaacagctc tgaattcggg ctaggttctg gtatcgaaac agaatctttg agcacagggt      1860
tgaagggtggc caagatgttg aaggccggta ccgtctggat caacacatac aacgattttg      1920
actccagagt tccattcggg ggtgttaagc aatctgggta cggtagagaa atgggtgaag      1980
aagtctacca tgcatacact gaagtaaaag ctgtcagaat taagttgtaa tgtaccaacc      2040
tgcatttctt tccgtcatat acacaaaata ctttcatata aacttacttg gtcttacgtc      2100
ataaataaat atgtatacat ataaattaaa aaatttggtt ttatatTTTTT acaaaaagaa      2160
tcgtttactt catttctccc ttttaagcga tacaatccat gaaaaaagag aaaaagagag      2220
aacaggcttg tgccttcttt aaaacatccc acacaaaatc atattgaatt gaattttaca      2280
tcttaagcta gtgtacaaca actgctatat ccaaagaaaa ctaacgtgga ccgcttttag      2340
agttgagaaa aaggtttgaa aaaaatagca atacaaagac ttgtttcata tataaaatac      2400
agggagcaca ttgagctaata ataacataaa cactgcgaac caattccaat caaaaggtag      2460
acatgagagc attccccga gtactgccat ttgccatca gagatcatat aataacatcc      2520
ttcttcgaac agtaaggctt ttggttcat cactttcttc ttttgatttc tctaggcaaa      2580
tgcctaaggt ggaccctgac aataccgtg caatgctact acagaaaaac ttgatccaaa      2640
gaaacaacat gctctatggg tatggatcag ggacaatacg atgtactttg ctagactcaa      2700
ctggacgagc caaatcacca ttagtagaga taaaacgtga ggat                          2744

```

<210> 10

<211> 500

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(500)

<223> secuencia de proteína aldehído deshidrogenasa 6 citosólica (ALD46) de *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 10

```

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu
1           5           10           15

```

```

Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn
          20           25           30

```

```

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
          35           40           45

```

```

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp
          50           55           60

```

ES 2 628 847 T3

Val	Glu	Tyr	Ala	Ile	Glu	Cys	Ala	Asp	Arg	Ala	Phe	His	Asp	Thr	Glu
65					70					75					80
Trp	Ala	Thr	Gln	Asp	Pro	Arg	Glu	Arg	Gly	Arg	Leu	Leu	Ser	Lys	Leu
			85						90					95	
Ala	Asp	Glu	Leu	Glu	Ser	Gln	Ile	Asp	Leu	Val	Ser	Ser	Ile	Glu	Ala
			100					105					110		
Leu	Asp	Asn	Gly	Lys	Thr	Leu	Ala	Leu	Ala	Arg	Gly	Asp	Val	Thr	Ile
		115					120					125			
Ala	Ile	Asn	Cys	Leu	Arg	Asp	Ala	Ala	Ala	Tyr	Ala	Asp	Lys	Val	Asn
	130					135					140				
Gly	Arg	Thr	Ile	Asn	Thr	Gly	Asp	Gly	Tyr	Met	Asn	Phe	Thr	Thr	Leu
145					150					155					160
Glu	Pro	Ile	Gly	Val	Cys	Gly	Gln	Ile	Ile	Pro	Trp	Asn	Phe	Pro	Ile
				165					170					175	
Met	Met	Leu	Ala	Trp	Lys	Ile	Ala	Pro	Ala	Leu	Ala	Met	Gly	Asn	Val
			180					185					190		
Cys	Ile	Leu	Lys	Pro	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Leu	Asn	Ala	Leu	Tyr	Phe
		195					200					205			
Ala	Ser	Leu	Cys	Lys	Lys	Val	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Asn	Ile
	210					215					220				
Val	Pro	Gly	Pro	Gly	Arg	Thr	Val	Gly	Ala	Ala	Leu	Thr	Asn	Asp	Pro
225					230				235						240
Arg	Ile	Arg	Lys	Leu	Ala	Phe	Thr	Gly	Ser	Thr	Glu	Val	Gly	Lys	Ser
				245					250					255	
Val	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Glu	Ser	Asn	Leu	Lys	Lys	Ile	Thr	Leu	Glu
			260					265					270		
Leu	Gly	Gly	Lys	Ser	Ala	His	Leu	Val	Phe	Asp	Asp	Ala	Asn	Ile	Lys
	275						280					285			
Lys	Thr	Leu	Pro	Asn	Leu	Val	Asn	Gly	Ile	Phe	Lys	Asn	Ala	Gly	Gln
	290					295					300				
Ile	Cys	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	Ile	Tyr	Val	Gln	Glu	Gly	Ile	Tyr	Asp

```

305                               310                               315                               320

Glu Leu Leu Ala Ala Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Thr Glu Ile Lys Val
      325                               330                               335

Gly Asn Pro Phe Asp Lys Ala Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Arg
      340                               345                               350

Gln Gln Phe Asp Thr Ile Met Asn Tyr Ile Asp Ile Gly Lys Lys Glu
      355                               360                               365

Gly Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp Lys Gly Tyr
      370                               375                               380

Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg Ile
385                               390                               395                               400

Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe Lys
      405                               410                               415

Thr Leu Glu Glu Gly Val Glu Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly Leu
      420                               425                               430

Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val Ala
      435                               440                               445

Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe
      450                               455                               460

Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg
465                               470                               475                               480

Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val
      485                               490                               495

Arg Ile Lys Leu
      500

```

<210> 11

<211> 2749

<212> ADN

<213> *Leuconostoc mesenteroides*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2749)

<223> secuencia del gen de fosfocetolasa (PK) de *Leuconostoc mesenteroides*

<400> 11

gttacggaag aagtcgtggt ttacggtggt tatgattctt gcaaaaaata aggagtactt	60
aatctcatgg cagatttcga ttcaaaagag tacttggaac ttgttgataa gtggtggcgc	120
gcaactaact atttgtcagc tgggatgac tttttgaaga gcaaccatt gttctcagtt	180
actaatacac ctatcaaggc tgaagatgta aaagttaagc caatcggaca ctggggtact	240
atctcaggtc agacattctt gtatgcacat gctaaccgtt tgatcaacaa gtatggtttg	300
aacatgtttt acgttggtgg tcctggtcac ggtggccaag ttatggttac taacgcttac	360
ttagacggcg catatactga agattatcct gaaattactc aagatatcga aggtatgagc	420
cacttgttca agcgtttctc attccctggc ggtattggat cacacatgac agctcaaaca	480
cctggttcat tacacgaagg tggatgaattg ggctattcat tgagccacgc ttttggtgcc	540
gttttggaaca atcctgacca agttgctttc gcagttggtg gtgatggtga agctgaaaca	600
ggctcctcaa tggcttcatg gcaactcaatt aagtttttga atgctaagaa tgatggtgcc	660
gttttgcttg tcttggtattt gaacggattc aagatttcaa acccaactat cttctcacgt	720
atgagtgatg aagaaatcac aaagttcttt gaaggttttg gttattcacc tcgcttcac	780
gaaaacgatg atattcatga ctacgcaaca tatcaccaac ttgcagcaaa cattttggtat	840
caagctattg aagatattca agctattcaa aatgatgcac gtgaaaatgg taagtatcaa	900
gatggtgaaa tccctgcatg gccagtaatt attgctcgct tgccaaaggg ctgggggtgga	960
ccaacgcacg atgcaagtaa caatcctatt gaaaactcat tccgtgcgca ccaagtgcc	1020
ttgcctcttg aacaacacga tcttgcaaca ttgcctgaat tcgaagactg gatgaactca	1080
tacaagcctg aagaattatt caatgctgat ggttctttga aggatgaatt gaaagctatc	1140
gctcctaagg gtgacaagcg tatgtcagct aaccctatta caaatggtgg tgctgatcgt	1200
tcagacttga agttgcctaa ctggagagaa ttcgctaacg atatcaatga tgatacacgt	1260
ggtaagggaat tcgctgatag caagcgcaat atggacatgg caacattgtc aaactacttg	1320
ggtgctgttt cacaattgaa cccaactcgt ttccgcttct tcggtcctga tgaaacaatg	1380
tcaaaccgtt tgtggggatt gttcaatggt acaccacgtc aatggatgga agaaatcaag	1440
gaaccacaag atcaattggt gagccctacg ggtcgcatta ttgattcaca attgtctgaa	1500
catcaagctg aaggttggct tgaaggatat actttgactg gtcgtggttg aatcttcgca	1560
tcatacagat cattcttgcg tgttgctgat acaatggtta cgcaacactt caagtgggtg	1620
cgtcacgctt cagaacaagc atggcgtaat gactatccat cattgaactt gattgcaact	1680
tcaactgctt tccaacaaga tcacaatgga tatactcacc aagatccagg tatgttgact	1740
cacttggtcg aaaagaagtc taactttatt cgtgaatatt tgccagctga tggtaactca	1800
ttgttggtcg ttcaagaacg tgctttctca gaacgtcata aggttaactt gttgattgct	1860
tctaagcaac cagctcaaca atggtttaca gttgaagaag ctgaagtatt ggctaacgaa	1920

```

ggtttgaaga tcattgattg ggcttctact gcaccttcta gtgatgttga tattacattc 1980
gcactctgctg gtactgaacc aacaattgaa actttggctg ctttgtggtt gattaaccaa 2040
gcattcccag atgttaagtt ccgttatgtt aacgttggtt aattactacg ttgcaaaaag 2100
aagtcagaac ctaacatgaa tgatgaacgt gaattatcag ccgaagaatt caacaagtat 2160
ttccaagctg atacaccagt tatcttogggt ttccatgctt atgaaaactt gattgaatca 2220
ttcttcttcg aacgtaagtt cacgggtgat gtatacgttc atggatatcg tgaagatggt 2280
gacatcacaa cgacatatga tatgcgtgta tattcacact tggatcgctt ccatcaagct 2340
aaggaagctg ctgaaatctt gtctgcaa at ggtaagattg atcaagctgc tgctgataca 2400
ttcatcgcta agatggatga tactttggca aagcatttcc aagttactcg taacgaaggt 2460
cgtgatatcg aagaattcac tgactggaca tggtcaccac ttaagtaatt taaaattatt 2520
ttatcaaaac caactattat ttttaatagt tgggtttttt atggctaaat tgactacata 2580
ctaaacgaaa ccatgtaaaa gtgccacata gttttactta ataagttcct tttatttttt 2640
gatttgcaat gcaaaattgt aagcgttaata tgaataataa aaaccccaa ttagttagct 2700
aattgggggt tttgtaaatc accatatcag ccgctcatag tcttagacg 2749

```

<210> 12
 <211> 813
 <212> PRT
 <213> *Leuconostoc mesenteroides*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(813)
 <223> secuencia de proteína fosfocetolasa (PK) de *Leuconostoc mesenteroides*
 <400> 12

```

Met Ala Asp Phe Asp Ser Lys Glu Tyr Leu Glu Leu Val Asp Lys Trp
1           5           10           15

Trp Arg Ala Thr Asn Tyr Leu Ser Ala Gly Met Ile Phe Leu Lys Ser
                20           25           30

Asn Pro Leu Phe Ser Val Thr Asn Thr Pro Ile Lys Ala Glu Asp Val
                35           40           45

Lys Val Lys Pro Ile Gly His Trp Gly Thr Ile Ser Gly Gln Thr Phe
50           55           60

Leu Tyr Ala His Ala Asn Arg Leu Ile Asn Lys Tyr Gly Leu Asn Met
65           70           75           80

```

Phe Tyr Val Gly Gly Pro Gly His Gly Gly Gln Val Met Val Thr Asn
 85 90 95

Ala Tyr Leu Asp Gly Ala Tyr Thr Glu Asp Tyr Pro Glu Ile Thr Gln
 100 105 110

Asp Ile Glu Gly Met Ser His Leu Phe Lys Arg Phe Ser Phe Pro Gly
 115 120 125

Gly Ile Gly Ser His Met Thr Ala Gln Thr Pro Gly Ser Leu His Glu
 130 135 140

Gly Gly Glu Leu Gly Tyr Ser Leu Ser His Ala Phe Gly Ala Val Leu
 145 150 155 160

Asp Asn Pro Asp Gln Val Ala Phe Ala Val Val Gly Asp Gly Glu Ala
 165 170 175

Glu Thr Gly Pro Ser Met Ala Ser Trp His Ser Ile Lys Phe Leu Asn
 180 185 190

Ala Lys Asn Asp Gly Ala Val Leu Pro Val Leu Asp Leu Asn Gly Phe
 195 200 205

Lys Ile Ser Asn Pro Thr Ile Phe Ser Arg Met Ser Asp Glu Glu Ile
 210 215 220

Thr Lys Phe Phe Glu Gly Leu Gly Tyr Ser Pro Arg Phe Ile Glu Asn
 225 230 235 240

Asp Asp Ile His Asp Tyr Ala Thr Tyr His Gln Leu Ala Ala Asn Ile
 245 250 255

Leu Asp Gln Ala Ile Glu Asp Ile Gln Ala Ile Gln Asn Asp Ala Arg
 260 265 270

Glu Asn Gly Lys Tyr Gln Asp Gly Glu Ile Pro Ala Trp Pro Val Ile
 275 280 285

Ile Ala Arg Leu Pro Lys Gly Trp Gly Gly Pro Thr His Asp Ala Ser
 290 295 300

Asn Asn Pro Ile Glu Asn Ser Phe Arg Ala His Gln Val Pro Leu Pro
 305 310 315 320

Leu Glu Gln His Asp Leu Ala Thr Leu Pro Glu Phe Glu Asp Trp Met
 325 330 335

Asn Ser Tyr Lys Pro Glu Glu Leu Phe Asn Ala Asp Gly Ser Leu Lys
 340 345 350
 Asp Glu Leu Lys Ala Ile Ala Pro Lys Gly Asp Lys Arg Met Ser Ala
 355 360 365
 Asn Pro Ile Thr Asn Gly Gly Ala Asp Arg Ser Asp Leu Lys Leu Pro
 370 375 380
 Asn Trp Arg Glu Phe Ala Asn Asp Ile Asn Asp Asp Thr Arg Gly Lys
 385 390 395 400
 Glu Phe Ala Asp Ser Lys Arg Asn Met Asp Met Ala Thr Leu Ser Asn
 405 410 415
 Tyr Leu Gly Ala Val Ser Gln Leu Asn Pro Thr Arg Phe Arg Phe Phe
 420 425 430
 Gly Pro Asp Glu Thr Met Ser Asn Arg Leu Trp Gly Leu Phe Asn Val
 435 440 445
 Thr Pro Arg Gln Trp Met Glu Glu Ile Lys Glu Pro Gln Asp Gln Leu
 450 455 460
 Leu Ser Pro Thr Gly Arg Ile Ile Asp Ser Gln Leu Ser Glu His Gln
 465 470 475 480
 Ala Glu Gly Trp Leu Glu Gly Tyr Thr Leu Thr Gly Arg Val Gly Ile
 485 490 495
 Phe Ala Ser Tyr Glu Ser Phe Leu Arg Val Val Asp Thr Met Val Thr
 500 505 510
 Gln His Phe Lys Trp Leu Arg His Ala Ser Glu Gln Ala Trp Arg Asn
 515 520 525
 Asp Tyr Pro Ser Leu Asn Leu Ile Ala Thr Ser Thr Ala Phe Gln Gln
 530 535 540
 Asp His Asn Gly Tyr Thr His Gln Asp Pro Gly Met Leu Thr His Leu
 545 550 555 560
 Ala Glu Lys Lys Ser Asn Phe Ile Arg Glu Tyr Leu Pro Ala Asp Gly
 565 570 575
 Asn Ser Leu Leu Ala Val Gln Glu Arg Ala Phe Ser Glu Arg His Lys
 580 585 590

Val Asn Leu Leu Ile Ala Ser Lys Gln Pro Arg Gln Gln Trp Phe Thr
595 600 605

Val Glu Glu Ala Glu Val Leu Ala Asn Glu Gly Leu Lys Ile Ile Asp
610 615 620

Trp Ala Ser Thr Ala Pro Ser Ser Asp Val Asp Ile Thr Phe Ala Ser
625 630 635 640

Ala Gly Thr Glu Pro Thr Ile Glu Thr Leu Ala Ala Leu Trp Leu Ile
645 650 655

Asn Gln Ala Phe Pro Asp Val Lys Phe Arg Tyr Val Asn Val Val Glu
660 665 670

Leu Leu Arg Leu Gln Lys Lys Ser Glu Pro Asn Met Asn Asp Glu Arg
675 680 685

Glu Leu Ser Ala Glu Glu Phe Asn Lys Tyr Phe Gln Ala Asp Thr Pro
690 695 700

Val Ile Phe Gly Phe His Ala Tyr Glu Asn Leu Ile Glu Ser Phe Phe
705 710 715 720

Phe Glu Arg Lys Phe Thr Gly Asp Val Tyr Val His Gly Tyr Arg Glu
725 730 735

Asp Gly Asp Ile Thr Thr Thr Tyr Asp Met Arg Val Tyr Ser His Leu
740 745 750

Asp Arg Phe His Gln Ala Lys Glu Ala Ala Glu Ile Leu Ser Ala Asn
755 760 765

Gly Lys Ile Asp Gln Ala Ala Ala Asp Thr Phe Ile Ala Lys Met Asp
770 775 780

Asp Thr Leu Ala Lys His Phe Gln Val Thr Arg Asn Glu Gly Arg Asp
785 790 795 800

Ile Glu Glu Phe Thr Asp Trp Thr Trp Ser Pro Leu Lys
805 810

<210> 13
<211> 1002
<212> ADN
<213> *Clostridium kluyveri*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1002)
 <223> secuencia de gen de fosfotransacetilasa (PTA) de *Clostridium kluyveri*

5

<400> 13

```

atgaaattaa tggaaaatat ttttggttta gccaaagcag ataagaaaa aattgttttg      60
gcagaaggag aagaagaaag gaacattaga gcttccgaag aaataataag ggatgggtatt    120
gcagatataa ttttagtagg aagtgaagt gtaataaaag agaatgcagc taaatttggg      180
gttaacttag ctggagtgga aatagtagat cctgaaactt caagtaaac tgcaggctat      240
gccaatgctt tttatgaaat tagaagaat aaaggagtta cactggaaaa agcagataaa      300
atagttagag atcctatata ttttgcaaca atgatgggtga aacttggaga tgcagatggg    360
ttagtttcag gtgcaataca tacaacggga gatcttttga gaccaggact tcaaatagtg      420
aagacagttc caggtgcttc tgtggtttcc agtgtatattt taatgagtgt accagattgt      480
gaatatggag aagatggatt cttgttattt gctgattgtg ctgtaaatgt atgtcctact      540
gctgaagaat tatcttcaat tgcaataact acagcagaaa ctgcaaaaaa tttgtgtaaa      600
atagaaccaa gagttgccat gctttcattt tctactatgg gaagtgctag tcatgaattg      660
gtagataaag ttacaaaagc aacaaaactt gctaaagaag ctagacctga tttggatata      720
gatggagaac ttcaattgga tgcttcctta gtaaaaaaag ttgcagactt aaaagctccg      780
ggcagtaaag tggcaggaaa agccaatgta cttatatcc ctgatataca agcaggaaat      840
ataggatata agttagttca aagatttgca aaagctgagg ctataggacc tatatgtcag      900
ggatttgcaa agcctataaa tgatttatca agaggtgca gcgttgatga tatagtaaag      960
gtagtggctg taactgcagt tcaagcacag gcacaggggt ag                          1002
    
```

10

<210> 14
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> *Clostridium kluyveri*

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(333)
 <223> secuencia de proteína fosfotransacetilasa (PTA) de *Clostridium kluyveri*

20

<400> 14

```

Met Lys Leu Met Glu Asn Ile Phe Gly Leu Ala Lys Ala Asp Lys Lys
1           5           10           15

Lys Ile Val Leu Ala Glu Gly Glu Glu Arg Asn Ile Arg Ala Ser
                20           25           30
    
```

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

Phe Ala Lys Ala Glu Ala Ile Gly Pro Ile Cys Gln Gly Phe Ala Lys
290 295 300

Pro Ile Asn Asp Leu Ser Arg Gly Cys Ser Val Asp Asp Ile Val Lys
305 310 315 320

Val Val Ala Val Thr Ala Val Gln Ala Gln Ala Gln Gly
325 330

<210> 15
<211> 2137
<212> ADN
<213> *Streptomyces* sp. CL190

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2137)
<223> secuencia del gen nphT7 de *Streptomyces* sp. CL190

<400> 15

cctgcaggcc gtcgagggcg cctggaagga ctacgcggag caggacggcc ggtcgctgga	60
ggagttcgcg gcgttcgtct accaccagcc gttcacgaag atggcctaca aggcgcaccg	120
ccacctgctg aacttcaacg gctacgacac cgacaaggac gccatcgagg gcgcctcg	180
ccagacgacg gcgtacaaca acgtcatcgg caacagctac accgcgtcgg tgtacctggg	240
cctggccgcc ctgctcgacc aggcggacga cctgacgggc cgttccatcg gcttcctgag	300
ctacggctcg ggcagcgtcg ccgagttctt ctcgggcacc gtcgtcgccg ggtaccgga	360
gcgtctgcgc accgaggcga accaggaggc gatcgcccgg cgcaagagcg tcgactacgc	420
cacctaccgc gagctgcacg agtacacgct ccggtccgac ggcggcgacc acgccacccc	480
ggtgcagacc accggcccct tccggctggc cgggatcaac gaccacaagc gcatctacga	540
ggcgcgctag cgacaccctt cggcaacggg gtgcgccact gttcggcgca ccccggtccg	600
ggctttcgca cagctattca cgaccatttg agggcggggc agccgcatga ccgacgtccg	660
attccgcatt atcggtagcg gtgcctacgt accggaacgg atcgtctcca acgatgaagt	720
cggcgcgcgg gccgggggtg acgacgactg gatcaccgcg aagaccggta tccggcagcg	780
tcgctgggcc gccgacgacc aggccacctc ggacctggcc acggccgcgg ggcgggcagc	840
gctgaaagcg gcgggcatca cgcccagca gctgaccgtg atcgcggtcg ccacctccac	900
gccggaccgg ccgcagccgc ccacggcggc ctatgtccag caccacctcg gtgcgaccgg	960
cactgcggcg ttcgacgtca acggggtctg ctccggcacc gtgttcgcgc tgtcctcggt	1020
ggcgggcacc ctcggtgacc gggggcggtta cgcgctggtc atcggcgcgg acctgtactc	1080
gcgcatactc aaccggcccg accgcaagac ggtcgtgctg ttcggggacg gcgcggcgcc	1140

ES 2 628 847 T3

```

aatggtcctc gggccgacct cgaccggcac gggcccccac gtccggcgcg tcgccctgca 1200
caccttcggc ggcctcaccg acctgatccg tgtgcccgcg ggcggcagcc gccagccgct 1260
ggacacggat ggcctcgacg cgggactgca gtacttcgcg atggacgggc gtgaggtgcg 1320
ccgcttcgtc acggagcacc tgccgcagct gatcaagggc ttcttcgacg aggcgggggt 1380
cgacgcggcc gacatcagcc acttcgtgcc gcacagggcc aacgggtgtca tgctcgacga 1440
ggtcttcggc gagctgcacg tgccgcgggc gaccatgcac cggacgggtcg agacctacgg 1500
caacacggga gcggcctcca tcccgatcac catggacgcg gccgtgcgcg ccggttcctt 1560
ccggccgggc gagctggtcc tgctggccgg gtccggcggc gccatggccg cgagcttcgc 1620
cctgatcgag tggtagtcgc ccgtaccacc acagcgggtcc ggcgccacct gttccctgcg 1680
ccgggcggcc ctgggggctt ttaggcccc caccgcccc gccgacggat tcagtgcgcg 1740
cagtacctca gatgtccgct gcgacggcgt cccggagagc ccgggcgaga tcgcggggccc 1800
ccttctgctc gtccccggcc cctcccgcca gcaccacccg cggcgggacgg ccgccgtcct 1860
ccgcgatacg ccgggcgagg tcgcaggcga gcacgcggga cccggagaag cccccagca 1920
ccagcgaccg gccgactccg tgccgggcca gggcaggctg cgcgccgtcg acgtcgggtga 1980
gcagcaccag gagctcctgc ggcccggcgt agaggtcggc cagccgggtcg tagcaggctg 2040
cgggcggccc cggcggcggg atcagacaga tcgtgccgcg ccgctcgtgc ctgcgccccc 2100
gcagcgtgac cagcggaatg tcccgcccag ctccgga 2137

```

<210> 16

<211> 325

<212> PRT

<213> *Streptomyces* sp. CL190

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(325)

<223> secuencia de proteína acetil-CoA:malonil-CoA aciltransferasa de *Streptomyces* sp. CL190

<400> 16

```

Arg Phe Arg Ile Ile Gly Thr Gly Ala Tyr Val Pro Glu Arg Ile Val
1           5           10           15

Ser Asn Asp Glu Val Gly Ala Pro Ala Gly Val Asp Asp Asp Trp Ile
20           25           30

Thr Arg Lys Thr Gly Ile Arg Gln Arg Arg Trp Ala Ala Asp Asp Gln
35           40           45

Ala Thr Ser Asp Leu Ala Thr Ala Ala Gly Arg Ala Ala Leu Lys Ala
50           55           60

```

Ala Gly Ile Thr Pro Glu Gln Leu Thr Val Ile Ala Val Ala Thr Ser
 65 70 75 80
 Thr Pro Asp Arg Pro Gln Pro Pro Thr Ala Ala Tyr Val Gln His His
 85 90 95
 Leu Gly Ala Thr Gly Thr Ala Ala Phe Asp Val Asn Ala Val Cys Ser
 100 105 110
 Gly Thr Val Phe Ala Leu Ser Ser Val Ala Gly Thr Leu Val Tyr Arg
 115 120 125
 Gly Gly Tyr Ala Leu Val Ile Gly Ala Asp Leu Tyr Ser Arg Ile Leu
 130 135 140
 Asn Pro Ala Asp Arg Lys Thr Val Val Leu Phe Gly Asp Gly Ala Gly
 145 150 155 160
 Ala Met Val Leu Gly Pro Thr Ser Thr Gly Thr Gly Pro Ile Val Arg
 165 170 175
 Arg Val Ala Leu His Thr Phe Gly Gly Leu Thr Asp Leu Ile Arg Val
 180 185 190
 Pro Ala Gly Gly Ser Arg Gln Pro Leu Asp Thr Asp Gly Leu Asp Ala
 195 200 205
 Gly Leu Gln Tyr Phe Ala Met Asp Gly Arg Glu Val Arg Arg Phe Val
 210 215 220
 Thr Glu His Leu Pro Gln Leu Ile Lys Gly Phe Leu His Glu Ala Gly
 225 230 235 240
 Val Asp Ala Ala Asp Ile Ser His Phe Val Pro His Gln Ala Asn Gly
 245 250 255
 Val Met Leu Asp Glu Val Phe Gly Glu Leu His Leu Pro Arg Ala Thr
 260 265 270
 Met His Arg Thr Val Glu Thr Tyr Gly Asn Thr Gly Ala Ala Ser Ile
 275 280 285
 Pro Ile Thr Met Asp Ala Ala Val Arg Ala Gly Ser Phe Arg Pro Gly
 290 295 300
 Glu Leu Val Leu Leu Ala Gly Phe Gly Gly Gly Met Ala Ala Ser Phe

	305	310	315	320
	Ala Leu Ile Glu Trp			
	325			
5	<210> 17 <211> 1287 <212> ADN <213> <i>Pseudomonas mevalonii</i>			
10	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1287) <223> secuencia del gen de HMG-CoA reductasa (mvaA) de <i>Pseudomonas mevalonii</i>			
	<400> 17			
	atgagcctcg attccgcgct gcccgctttc cgtaacctgt cccctgccgc ggcgctggac			60
	cacatcgggc agttgctcgg cctgagccac gacgatgtca gcctgctggc caacgccggt			120
	gccctgccga tggacatcgc caacggcatg atcgaaaacg tcatcgccac cttcgagctg			180
	ccctatgccg tggccagcaa cttccagatc aatggccgtg atgtgctggt gcgctggtg			240
	gtggaagagc cctcgatcgt cgccgctgct tcgtacatgg ccaagctggc ccgtgccaac			300
	ggcggcttca ccacctccag cagcgcgccg ctgatgcattg cccaggtaca gatcgtcggc			360
	atacaggacc cgctcaatgc acgcctgagc ctgctgcgcc gcaaagacga aatcattgaa			420
	ctggccaacc gcaaggacca gttgctcaac agcctoggcg gcggctgccg cgacatcgaa			480
	gtgcacacct tcgccgatac ccgcgctggc cogatgctgg tggcgccact gatcgtcgat			540
	gtacgcgatg ccatggggcg caacaccgtc aataccatgg ccgaggccgt tgccgccgtg			600
	atggaagcca tcaccggggg ccaggtaacg ctgcgcattc tgtccaacct ggccgacctg			660
	cgcctggcca gggcccagggt gcggattact ccgcagcaac tggaaacggc cgaattcagt			720
	ggcgaggcag tgatcgaagg catcctcgac gcctacgcct tcgctgcggt cgacccttac			780
	cgcgcgccca cccacaacaa gggcatcatg aatggcatcg acccactgat cgtcgccact			840
	ggcaacgact ggcgtgcagt ggaagccggc gcccatgcgt atgcctgccg cagtggtcac			900
	tacggctcgc tgaccacctg ggaaaaggac aacaacggcc atttggtcgg caccctggaa			960
	atgccgatgc ccgtaggcct ggtcggcggc gccacaaaaa cccatccgct ggcgcaactg			1020
	tcgctgcgca tcctcggcgt gaaaacagcc caggcgctcg ctgagattgc cgtggccgta			1080
	ggcctggcgc aaaacctcgg ggccatgcgc gccctggcca ccgaaggcat ccagcgcggc			1140
	cacatggccc tgcatgcgcg caatattgcc gtggtggcgg gcgcccagg cgatgaggtg			1200
	gactgggttg cccggcagtt ggtggaatac cagcagctgc gcgcgaccg cgccgtagca			1260
15	ctgctgaaac aaaagcggg ccaatga			1287
20	<210> 18 <211> 428 <212> PRT <213> <i>Pseudomonas mevalonii</i>			

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(428)

<223> secuencia de proteína hidroximetilglutaril-CoA reductasa de *Pseudomonas mevalonii*

5

<400> 18

```

Met Ser Leu Asp Ser Arg Leu Pro Ala Phe Arg Asn Leu Ser Pro Ala
 1           5           10           15

Ala Arg Leu Asp His Ile Gly Gln Leu Leu Gly Leu Ser His Asp Asp
 20           25           30

Val Ser Leu Leu Ala Asn Ala Gly Ala Leu Pro Met Asp Ile Ala Asn
 35           40           45

Gly Met Ile Glu Asn Val Ile Gly Thr Phe Glu Leu Pro Tyr Ala Val
 50           55           60

Ala Ser Asn Phe Gln Ile Asn Gly Arg Asp Val Leu Val Pro Leu Val
 65           70           75           80

Val Glu Glu Pro Ser Ile Val Ala Ala Ala Ser Tyr Met Ala Lys Leu
 85           90           95

Ala Arg Ala Asn Gly Gly Phe Thr Thr Ser Ser Ser Ala Pro Leu Met
100           105           110

His Ala Gln Val Gln Ile Val Gly Ile Gln Asp Pro Leu Asn Ala Arg
115           120           125

Leu Ser Leu Leu Arg Arg Lys Asp Glu Ile Ile Glu Leu Ala Asn Arg
130           135           140

Lys Asp Gln Leu Leu Asn Ser Leu Gly Gly Gly Cys Arg Asp Ile Glu
145           150           155           160

Val His Thr Phe Ala Asp Thr Pro Arg Gly Pro Met Leu Val Ala His
165           170           175

Leu Ile Val Asp Val Arg Asp Ala Met Gly Ala Asn Thr Val Asn Thr
180           185           190

```

ES 2 628 847 T3

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

<210> 19
<211> 1302
<212> ADN
<213> *Silicibacter pomeroyi*

5

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1302)
<223> secuencia del gen de hidroximetilglutaril-CoA reductasa de *Silicibacter pomeroyi*

10

<400> 19

atgacaggca agacgggtca catcgatggt ttgaactcgc gcattgaaaa gatgcgagat	60
ctcgaccccg cacaacggct ggtgcgcgtt gccgaggcgg cgggcctcga gcccgaggcg	120
atcagcgcgc tggcgggtaa cggcgccctg cccctctcgc tggccaacgg gatgatcgag	180
aacgtcatcg gcaaattcga actgccgctg ggcgtggcca cgaatttcac tgtgaacggc	240
cgcgactatc tgatcccgat ggcggtcgaa gagccctcgg tgggtggcggc cgcgtcctat	300
atggcgcgta tcgcgcgcga gaatggcgga ttcaccgcgc atggcacgcg gcccttgatg	360
cgcgcccaga tccaggtggt cgggttgggt gatcccgagg gcgcccggca gcgtctcctc	420
gcccacaagg ccgcgttcac ggaggcggcg gacgctgtcg atccggtgct tgtcgggctg	480
ggtggcggct gccgcgatat cgaggttcac gtgttccggg atacgccggt gggcgcgatg	540
gtcgtcctgc acctgatcgt cgatgtgcgc gacgcgatgg gggccaatac ggtcaacacg	600
atggccgaac ggctggcccc cgaggtcgag cggattgccg gtggcacccg gcggtgcgc	660
atcctgtcga acctcgccga cctgcgattg gtccgggcgc ggggtggaact ggccccggaa	720
acactgacaa cgcagggtta tgacggcgcc gacgtggcgc ggggcatggt cgaggcctgc	780
gcgcttgcca tcgtcgacct ctatcgcgcg gcgaccata acaaggggat catgaacggc	840
atcgaccccg tcgtcgtcgc caccggcaat gactggcgcg cgatcgaggc gggtgcccat	900
gcctatgccg cccgcacggg tcattatacc tcgtgacct gctgggaact ggcgaatgac	960
gggcggttg tgggcacgat cgaactgcc ctggcgcttg gccttgctcg cggcgcgacc	1020
aagacgcacc cgaccgcacg ggcggcgctg gccctgatgc aggtagagac tgcaaccgaa	1080
ctggcccagg tcaccgcgcg cgtgggtctg gcgcagaaca tggccgcat ccgcgcgctg	1140
gcgaccgaag gcatccagcg cggtcacatg acccttcctg cgcgcaacat cgcgatcatg	1200
gccggcgcaa caggcgccga tatcgaccgc gtcacccggg tcattgtcga agcgggagac	1260
gtcagcgtgg cccgtgcaaa acaggtgctg gaaaacacct ga	1302

15

<210> 20
<211> 433
<212> PRT
<213> *Silicibacter pomeroyi*

20

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(433)
<223> secuencia de proteína hidroximetilglutaril-CoA reductasa de *Silicibacter pomeroyi*

25

ES 2 628 847 T3

<400> 20

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

225		230		235		240									
Thr	Leu	Thr	Thr	Gln	Gly	Tyr	Asp	Gly	Ala	Asp	Val	Ala	Arg	Gly	Met
				245				250						255	
Val	Glu	Ala	Cys	Ala	Leu	Ala	Ile	Val	Asp	Pro	Tyr	Arg	Ala	Ala	Thr
			260					265					270		
His	Asn	Lys	Gly	Ile	Met	Asn	Gly	Ile	Asp	Pro	Val	Val	Val	Ala	Thr
		275					280					285			
Gly	Asn	Asp	Trp	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gly	Ala	His	Ala	Tyr	Ala	Ala
	290					295					300				
Arg	Thr	Gly	His	Tyr	Thr	Ser	Leu	Thr	Arg	Trp	Glu	Leu	Ala	Asn	Asp
305					310					315					320
Gly	Arg	Leu	Val	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Val
				325					330					335	
Gly	Gly	Ala	Thr	Lys	Thr	His	Pro	Thr	Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu
			340					345					350		
Met	Gln	Val	Glu	Thr	Ala	Thr	Glu	Leu	Ala	Gln	Val	Thr	Ala	Ala	Val
		355					360					365			
Gly	Leu	Ala	Gln	Asn	Met	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Leu	Ala	Thr	Glu	Gly
	370					375					380				
Ile	Gln	Arg	Gly	His	Met	Thr	Leu	His	Ala	Arg	Asn	Ile	Ala	Ile	Met
385					390					395					400
Ala	Gly	Ala	Thr	Gly	Ala	Asp	Ile	Asp	Arg	Val	Thr	Arg	Val	Ile	Val
				405					410					415	
Glu	Ala	Gly	Asp	Val	Ser	Val	Ala	Arg	Ala	Lys	Gln	Val	Leu	Glu	Asn
			420					425					430		

Thr

<210> 21

<211> 1290

<212> ADN

<213> *Delftia acidovorans*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1290)

<223> secuencia de nucleótidos de hidroximetilglutaril-CoA reductasa de *Delftia acidovorans*

<400> 21

atggttgccg attcgcgact gcccaatttc cgcgccctca caccggccca gcgcccggat	60
ttcctggccg atgcctgcgg cctgtccgat gccgagcgcg ccctgctcgc tgcccccggt	120
gccctgcccc tggcgcctggc cgacggcatg atcgagaacg tgttcggcag cttcgagctg	180
ccgctgggcg tggcgggcaa cttccgcgtc aacggccgcg acgtgctggt gcccatggcg	240
gtggaggagc cctcgtggtt ggccgcgcgc tcgtacatgg ccaagctggc gcgcgaggac	300
gggggctttc agacctcaag cagctgccc ctgatgcgcg cccaggtcca ggtgctgggc	360
gtgaccgatc cacacggcgc gcgcctggcc gtgctgcagg cgcgtgcgca gatcatcgag	420
cgcgccaaaca gccgcgacaa ggtgctgatc ggctggggcg gcggtcgaa ggacatcgag	480
gtccatgtct tccccgacac gccgcgcggc cccatgctgg tggccacct gatcgtggac	540
gtgcgcgacg ccatgggcgc caacaccgtc aacaccatgg ccgaatcggg ggccccctg	600
gtcgagaaga tcacgggcgg cagcgtgcgg ctgcgcaccc tgtccaacct ggccgacctg	660
cggctggccc gcgcccgcgt gcggctcacg ccgcagaccc tggccacgca ggatcgacg	720
ggcgaggaga tcacgaagg cgtgctggac gcctatacct tcgcggccat cgacccctac	780
cgcgcggcca cgcacaacaa gggaatcatg aacggcatcg accccgtcat cgtggccacg	840
ggcaacgact ggcggcgggt cgaggccggc gcccatgcct atgccagccg cagcggcagc	900
tacacctcgc tgacgcgctg ggaaaaggat gccggcgggc ccctggtcgg cagcatcgag	960
ctgcccacgc cgggtggcct tgtcgcgggc gccaccaaga cccatccgct ggacgcctg	1020
gcgctgaaga tcatggacct gcagtcggcc cagcagctgg gcgagatcgc cgcgcgcgtg	1080
ggcctggcgc agaacctggg cgcctcgcgc gccctggcca ccgaaggcat tcagcgcggc	1140
cacatggccc tgcacgccc caacatcgcc ctggtggccg gcgccacggg cgacgaggtc	1200
gatgccgtgg cgcgccagct ggccgcggag cagcagctgc gcaccgaccg cgcgctggaa	1260
gtgctggccg cgctgcgcgc cagggcctga	1290

5 <210> 22
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> *Delftia acidovorans*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(429)
 <223> secuencia de proteína hidroximetilglutaril-CoA reductasa de *Delftia acidovorans*

15

ES 2 628 847 T3

<400> 22

```

Met Val Ala Asp Ser Arg Leu Pro Asn Phe Arg Ala Leu Thr Pro Ala
1          5          10          15

Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ala Asp Ala Cys Gly Leu Ser Asp Ala Glu
20          25          30

Arg Ala Leu Leu Ala Ala Pro Gly Ala Leu Pro Leu Ala Leu Ala Asp
35          40          45

Gly Met Ile Glu Asn Val Phe Gly Ser Phe Glu Leu Pro Leu Gly Val
50          55          60

Ala Gly Asn Phe Arg Val Asn Gly Arg Asp Val Leu Val Pro Met Ala
65          70          75          80

Val Glu Glu Pro Ser Val Val Ala Ala Ala Ser Tyr Met Ala Lys Leu
85          90          95

Ala Arg Glu Asp Gly Gly Phe Gln Thr Ser Ser Thr Leu Pro Leu Met
100         105         110

Arg Ala Gln Val Gln Val Leu Gly Val Thr Asp Pro His Gly Ala Arg
115         120         125

Leu Ala Val Leu Gln Ala Arg Ala Gln Ile Ile Glu Arg Ala Asn Ser
130         135         140

Arg Asp Lys Val Leu Ile Gly Leu Gly Gly Gly Cys Lys Asp Ile Glu
145         150         155         160

Val His Val Phe Pro Asp Thr Pro Arg Gly Pro Met Leu Val Val His
165         170         175

Leu Ile Val Asp Val Arg Asp Ala Met Gly Ala Asn Thr Val Asn Thr
180         185         190

Met Ala Glu Ser Val Ala Pro Leu Val Glu Lys Ile Thr Gly Gly Ser
195         200         205

Val Arg Leu Arg Ile Leu Ser Asn Leu Ala Asp Leu Arg Leu Ala Arg
210         215         220

Ala Arg Val Arg Leu Thr Pro Gln Thr Leu Ala Thr Gln Asp Arg Ser
225         230         235         240

Gly Glu Glu Ile Ile Glu Gly Val Leu Asp Ala Tyr Thr Phe Ala Ala
245         250         255

```

Ile Asp Pro Tyr Arg Ala Ala Thr His Asn Lys Gly Ile Met Asn Gly
260 265 270

Ile Asp Pro Val Ile Val Ala Thr Gly Asn Asp Trp Arg Ala Val Glu
275 280 285

Ala Gly Ala His Ala Tyr Ala Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Thr Ser Leu
290 295 300

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

Leu Pro Met Pro Val Gly Leu Val Gly Gly Ala Thr Lys Thr His Pro
325 330 335

Leu Ala Arg Leu Ala Leu Lys Ile Met Asp Leu Gln Ser Ala Gln Gln
340 345 350

Leu Gly Glu Ile Ala Ala Ala Val Gly Leu Ala Gln Asn Leu Gly Ala
355 360 365

Leu Arg Ala Leu Ala Thr Glu Gly Ile Gln Arg Gly His Met Ala Leu
370 375 380

His Ala Arg Asn Ile Ala Leu Val Ala Gly Ala Thr Gly Asp Glu Val
385 390 395 400

Asp Ala Val Ala Arg Gln Leu Ala Ala Glu His Asp Val Arg Thr Asp
405 410 415

Arg Ala Leu Glu Val Leu Ala Ala Leu Arg Ala Arg Ala
420 425

<210> 23

<211> 5726

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética: plásmido pAM70

<400> 23

tcgcgcggttt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accataccac	agcttttcaa	ttcaattcat	catttttttt	ttattctttt	ttttgatttc	240

ggtttctttg aaatTTTTTT gattcggtaa tctccgaaca gaaggaagaa cgaaggaagg	300
agcacagact tagattggta tatatacgca tatgtagtgt tgaagaaaca tgaattgcc	360
cagtattcctt aaccCAACTg cacagaacaa aaacctgcag gaaacgaaga taaatcatgt	420
cgaagctac atataaggaa cgtgctgcta ctcatcctag tcctgttgct gccaaagctat	480
ttaatatcat gcacgaaaag caaacaAACT tgtgtgcttc attggatgtt cgtaccacca	540
aggaattact ggagttagtt gaagcattag gtcccaaaat ttgtttacta aaaacacatg	600
tggatatcctt gactgatttt tccatggagg gcacagttaa gccgctaaag gcattatccg	660
ccaagtacaa ttttttactc ttCGAAGACA gaaaatttgc tgacattgggt aatacagtca	720
aattgcagta ctctgcgggt gtatacagaa tagcagaatg ggcagacatt acgaatgcac	780
acggtgtggtt gggccaggt attgttagcg gtttgaagca ggcggcagaa gaagtaacaa	840
aggaacctag aggccttttg atgttagcag aattgtcatg caagggctcc ctatctactg	900
gagaatatac taagggtact gttgacattg cgaagagcga caaagatttt gttatcggct	960
ttattgtctca aagagacatg ggtggaagag atgaaggTTA cgattgggtg attatgacac	1020
ccggtgtggg tttagatgac aagggagacg cattgggtca acagtataga accgtggatg	1080
atgtggtctc tacaggatct gacattatta ttgttgaag aggactatTTT gcaaagggaa	1140
gggatgctaa ggtagagggt gaacgttaca gaaaagcagg ctgggaagca tatttgagaa	1200
gatcgggcca gcaaaactaa aaaactgtat tataagtaaa tgcattgata ctAAACTCAC	1260
aaattagagc ttcaatttaa ttatatcagt tattacccta tgcgggtgtga aataccgcac	1320
agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg aaattgtAAA cgTTAATATT ttgttaaaat	1380
tcgcgttaaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggaAAA	1440
tcctttataa atcaaaagaa tagaccgaga tagggttgag tgttgttcca gtttggaaca	1500
agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg	1560
gcgatggccc actacgtgaa ccatcacct aatcaagttt tttggggtcg aggtgccgta	1620
aagcactaaa tcggaaccct aaaggagacc cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg	1680
cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa	1740
gtgtagcgggt cacgctgcgc gtaaccacca caccgcgcgc gcttaatgcg ccgctacagg	1800
gcgctgcgcg ccattcgcca ttCAGGCTgc gcaactgttg ggaaggcgga tcggtgcggg	1860
cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg	1920
taacgccagg gttttccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagttag cgcgcgtaat	1980
acgactcact ataggcgaa ttgggtaccg gggccccct cgaggctgcac ggtatcgata	2040
agcttgatat cgaattcctg cagcccggg gatccactag ttctagagcg gccgccaccg	2100
cgggtggagct ccagcttttg ttcccttttag tgagggttaa ttgcgcgctt ggcgtaatca	2160

tggtcatagc	tgtttcctgt	gtgaaattgt	tatccgctca	caattccaca	caacatagga	2220
gccggaagca	taaagtgtaa	agcctggggt	gcctaataag	tgaggttaact	cacattaatt	2280
gcgttgcgct	cactgcccgc	tttccagtcg	ggaaacctgt	cgtgccagct	gcattaatga	2340
atcggccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	cgtattgggc	gctcttccgc	ttcctcgctc	2400
actgactcgc	tgcgctcggt	cgttcggtcg	cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	2460
gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaggc	2520
cagcaaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	2580
ccccctgacg	agcatcacaa	aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgacagga	2640
ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	2700
ctgccgctta	ccggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	2760
agctcacgct	gtaggtatct	cagttcggtg	taggtcggtc	gctccaagct	gggctgtgtg	2820
cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtc	2880
aaccggta	gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	2940
gcgaggtatg	taggcggtgc	tacagagttc	ttgaagtggg	ggcctaacta	cggtacact	3000
agaaggacag	tatttggtat	ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	3060
ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	gctggtagcg	gtgggttttt	tgtttgcaag	3120
cagcagatta	cgcgagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	3180
tctgacgctc	agtggaaacga	aaactcacgt	taagggattt	tggtcatgag	attatcaaaa	3240
aggatcttca	cctagatcct	tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	3300
tatgagtaaa	cttggtctga	cagttaccaa	tgcttaatca	gtgaggcacc	tatctcagcg	3360
atctgtctat	ttcggtcatc	catagttgcc	tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	3420
cgggagggct	taccatctgg	ccccagtgc	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcacccg	3480
gctccagatt	tatcagcaat	aaaccagcca	gccggaagg	ccgagcgag	aagtggctct	3540
gcaactttat	ccgcctccat	ccagtctatt	aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	3600
tcgccagtta	atagtttgcg	caacgttggt	gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	3660
tcgtcggttg	gtatggcttc	attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	3720
tcccccatgt	tgtgcaaaaa	agcggttagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	3780
aagttggccg	cagtgttata	actcatgggt	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	3840
atgccatccg	taagatgctt	ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	3900
tagtgatg	ggcgaccgag	ttgctcttgc	ccggcgctca	tacgggataa	taccgcgcca	3960
catagcagaa	ctttaaaggt	gctcatcatt	ggaaaacggt	cttcggggcg	aaaactctca	4020

```

aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct 4080
tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc 4140
gcaaaaaagg gaataagggc gacacgaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa 4200
tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt 4260
tagaaaaata aacaaatagg ggttcgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgaacga 4320
agcatctgtg cttcattttg tagaacaaaa atgcaacgcg agagcgctaa tttttcaaac 4380
aaagaatctg agctgcattt ttacagaaca gaaatgcaac gcgaaagcgc tattttacca 4440
acgaagaatc tgtgcttcat ttttgtaaaa caaaaatgca acgcgagagc gctaattttt 4500
caaacaaaga atctgagctg cattttttaca gaacagaaat gcaacgcgag agcgctatct 4560
taccaacaaa gaatctatac ttcttttttg ttctacaaa atgcatcccg agagcgctat 4620
ttttctaaca aagcatctta gattactttt ttctccttt gtgcgctcta taatgcagtc 4680
tcttgataac tttttgcact gtaggtccgt taaggtaga agaaggctac tttggtgtct 4740
atcttctctt ccataaaaa agcctgactc cacttccgc gtttactgat tactagcgaa 4800
gctgcgggtg cattttttca agataaaggc atccccgatt atattctata ccgatgtgga 4860
ttgogcatac tttgtgaaca gaaagtgata gcgttgatga ttcttcattg gtcagaaaat 4920
tatgaacggt ttcttctatt ttgtctctat atactacgta taggaaatgt ttacattttc 4980
gtattgtttt cgattcactc tatgaatagt tcttactaca atttttttgt ctaaagagta 5040
atactagaga taaacataaa aaatgtagag gtcgagtta gatgcaagtt caaggagcga 5100
aagggtgatg ggtaggttat atagggatat agcacagaga tatatagcaa agagatactt 5160
ttgagcaatg tttgtggaag cggatttcgc aatatttttag tagctcgta cagtccggtg 5220
cgtttttggt tttttgaaag tgcgtcttca gagcgctttt ggttttcaa agcgctctga 5280
agttcctata ctttctagag aataggaact tcggaatagg aacttcaaag cgtttccgaa 5340
aacgagcgct tccgaaaatg caacgcgagc tgcgcacata cagctcactg ttcacgtcgc 5400
acctatatct gcgtgttgcc tgtatatata tatacatgag aagaacggca tagtgcggtg 5460
ttatgcttaa atgcgtactt atatgctct atttatgtag gatgaaagg agtctagtac 5520
ctcctgtgat attatcccat tccatgcggg gtatcgtatg ctctctcag cactaccctt 5580
tagctgttct atatgctgcc actcctcaat tggattagtc tcatccttca atgctatcat 5640
ttcctttgat attggatcat actaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa 5700
taggcgtatc acgagccct ttcgtc 5726

```

<210> 24
 <211> 8125
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética: plásmido pAM01147

<400> 24

tcgcgcggttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accataccac agcttttcaa ttcaattcat catTTTTTTT ttattctttt ttttgatttc	240
ggtttctttg aaatTTTTTT gattcggtaa tctccgaaca gaaggaagaa cgaaggaagg	300
agcacagact tagattggtat tatatacgca tatgtagtgt tgaagaaaca tgaaattgcc	360
cagtattctt aacccaactg cacagaacaa aaacctgcag gaaacgaaga taaatcatgt	420
cgaagctac atataaggaa cgtgctgcta ctcatcctag tcctgttgct gccaaagctat	480
ttaatatcat gcacgaaaag caaacaaact tgtgtgcttc attggatggt cgtaccacca	540
aggaattact ggagttagtt gaagcattag gtcccaaaat ttgtttacta aaaacacatg	600
tggatatctt gactgatttt tccatggagg gcacagttaa gccgctaaag gcattatccg	660
ccaagtacaa ttttttactc ttcgaagaca gaaaatttgc tgacattggt aatacagtca	720
aattgcagta ctctgcgggt gtatacagaa tagcagaatg ggcagacatt acgaatgcac	780
acggtgtggt gggcccagggt attgttagcg gtttgaagca ggcggcagaa gaagtaacaa	840
aggaacctag aggccttttg atgttagcag aattgtcatg caagggtctc ctatctactg	900
gagaatatac taagggtact gttgacattg cgaagagcga caaagatttt gttatcggct	960
ttattgctca aagagacatg ggtggaagag atgaaggtaa cgattgggtg attatgacac	1020
ccggtgtggg tttagatgac aaggggagcg cattgggtca acagtataga accgtggatg	1080
atgtggtctc tacaggatct gacattatta ttgttggaag aggactattt gcaaagggaa	1140
gggatgctaa ggtagagggt gaacgttaca gaaaagcagg ctgggaagca tatttgagaa	1200
gatgcggcca gcaaaactaa aaaactgtat tataagtaaa tgcatgtata ctaaaactcac	1260
aaattagagc ttcaatttaa ttatatcagt tattacccta tgcgggtgtga aataccgcac	1320
agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg aaattgtaaa cgtaaatatt ttgttaaaat	1380
tcgcgttaaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa	1440
tcctttataa atcaaaagaa tagaccgaga taggggtgag tgttggtcca gtttggaaca	1500
agagtcact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg	1560
gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt tttggggctg aggtgccgta	1620
aagcactaaa tcggaaccct aaaggagagc cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg	1680
cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa	1740

gtgtagcggg	cacgctgccc	gtaaccacca	cacccgccc	gcttaatgcg	ccgctacagg	1800
gcgcgtcgcg	ccattcgcca	ttcaggctgc	gcaactgttg	ggaagggcga	tcgggtcggg	1860
cctcttcgct	attacgccag	ctggcgaaag	ggggatgtgc	tgcaaggcga	ttaagttggg	1920
taacgccagg	gttttcccag	tcacgacgtt	gtaaaacgac	ggccagttag	cgcgcgtaat	1980
acgactcact	atagggcgaa	ttgggtaccg	ggccccccct	cgaggtcgac	ggtatcgata	2040
agcttgatat	cgaattcctg	cagcccgggg	gatccactag	ttctagagcg	gccgcttatt	2100
gcagaagatt	agactttttt	tggtgcaagt	gggatgagct	tgagagcagga	agaatacact	2160
atactggatc	taaagagtac	aatagatgga	taagaatatt	ggcagcgcaa	aaaggcttca	2220
agcttacaca	acacggttta	tttcgaaata	atatccttct	cgaaagcttt	aacgaacgca	2280
gaatttttga	gttattaaac	ttaaaatacg	ctgaaccgga	acatagaaat	atcgaatggg	2340
aaaaaaaaac	tgcataaagg	cattaaaaga	ggagcgaatt	tttttttaat	aaaaatctta	2400
ataatcatta	aaagataaat	aatagtctat	atatacgtat	ataaataaaa	aatattcaaa	2460
aaataaaata	aactattatt	ttagcgtaaa	ggatggggaa	agagaaaaga	aaaaaattga	2520
tctatcgatt	tcaattcaat	tcaattcagt	ggtgatgggt	atgatgcctt	ttatcgtcac	2580
cgtccttata	atcgaattcc	tggcctctct	tttgtttttag	aagtgcgacg	gcacgatctg	2640
ctctgacatc	gtgatattca	actaattgtc	tggaacacca	atcgacttcg	tcgccccttg	2700
cacctgctac	aaccgctata	ttcctcgcat	gcaaggccat	gtgaccocct	tgaatacctt	2760
cagttgctaa	agccctcatt	gcacccaaat	tttgagcaag	accaacagcc	acagcgatct	2820
ctgccaaagg	ttgggcagtt	ttaaactcta	atattcttaa	agataattga	gccagagggt	2880
gggtcttcgt	tgaccacact	actaatccaa	ccggcatcgg	catctccaga	gtaccgacta	2940
aatgaccatt	attatccttc	tcccagtag	ttagagaacc	ataatgtccg	gacctacaag	3000
cgtacgcgtg	agccccagcc	tctacggctc	tccaatcggt	accagtagca	acaattagtg	3060
gatctatgcc	gttcataata	cctttattat	gtgtagcggc	tctgtatggg	tcaacagcgg	3120
cgaaagcata	agcgtctaga	ataccttcaa	tcacagcctc	ccccgaaaat	tccgctgttt	3180
ccaattgctg	tggggttatt	cttacttggt	cacgagctaa	tcttagatca	gctaaattag	3240
acaagatcct	tagacgcact	tgaccgccag	taattgcctc	cattaatggg	gcgacggctt	3300
cagccattgt	gtttactgtg	ttcgccccca	ttgcatcacg	aacatctacg	attaagttag	3360
caactaacat	aggtcctcta	ggagtgtcag	cgaatgtatg	cacttcgatg	tctctacaac	3420
caccacctaa	cgaatttaac	aattgatctt	ttctatttag	caattctatt	atctcatctt	3480
ttcttctcaa	caatgaaagt	ctggcggtta	aaggatcttg	tataccaacg	atttgacttt	3540
gagcatgcat	aagtggggct	gaactgctgg	tggtgaaacc	tccgttcgct	cttgccaatt	3600
tagccatgta	tgatgctgct	gcaactatag	atggttcctc	aacgactagt	gggacaaaaa	3660

catccctacc	attaatttga	aaattcgaag	caacggcgta	cggaagtctg	aaagtaccta	3720
taacattttc	gatcatacca	ttagcgatgt	ccataggcaa	tgtccagcg	ttggccaaca	3780
aagaaacgtc	atcatggctt	aatcccaata	gttgtcctat	gtgatctaaa	cgagcagccg	3840
gactcaggtt	tctgaatgct	ggcaatctgc	tatctaaaga	catatgtttt	gagggaatat	3900
tcaactgttt	ttttttatca	tgttgatgct	ctgcataata	atgcccataa	atattttccga	3960
cctgctttta	tatctttgct	agccaaacta	actgaacata	gctacacatt	attttcagct	4020
tggtctatttt	gtgaacactg	tatagccagt	ccttcggatc	acggtcaaca	gttgtccgag	4080
cgcttttttg	accctttccc	ttattttttg	gttaaggaaa	atgacagaaa	atatatctaa	4140
tgagccttcg	ctcaacagtg	ctccgaagta	tagctttcca	aaaggagagg	caaagcaatt	4200
taagaatgta	tgaacaaaat	aaaggggaaa	aattaccccc	tctactttac	caaacgaata	4260
ctaccaataa	tattttacaac	ttttccttat	gattttttca	ctgaagcgct	tgcgaatagt	4320
tgtgagcgat	atcaaaaagta	acgaaatgaa	cttcgcggct	cgtgctatat	tcttggtgct	4380
accgtccata	tctttccata	gattttcaat	ctttgatgtc	tccatgggtg	tacagagaac	4440
ttgtaaacaa	ttcggtcctt	acatgtgagg	aaattcgctg	tgacacgcgg	ccgccaccgc	4500
ggtggagctc	cagcttttgt	tccctttagt	gagggttaat	tgcgcgcttg	gcgtaatcat	4560
ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaattgtt	atccgctcac	aattccacac	aacataggag	4620
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaagtagt	gaggtaactc	acattaattg	4680
cgttgcgctc	actgcccgct	ttccagtcgg	gaaacctgtc	gtgccagctg	cattaatgaa	4740
tcgccaacg	cgcggggaga	ggcggtttgc	gtattgggcg	ctcttcgct	tcctcgctca	4800
ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcgg	atcagctcac	tcaaaggcgg	4860
taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	4920
agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	4980
cccctgacga	gcatacaaaa	aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	5040
tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	5100
tgccgcttac	cggatacctg	tccgcctttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	5160
gctcacgctg	taggtatctc	agttcggtgt	aggtcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	5220
acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	5280
acccggtaa	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	5340
cgaggtatgt	aggcgggtgt	acagagttct	tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	5400
gaaggacagt	atgttggtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	5460
gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	5520

agcagattac	gcgagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	tctacggggt	5580
ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacgtt	aagggatttt	ggatcatgaga	ttatcaaaaa	5640
ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagttt	taaatcaatc	ttaaagtatat	5700
atgagtaaac	ttggtctgac	agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	atctcagcga	5760
tctgtctatt	tcggtcatcc	atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	5820
gggaggggctt	accatctggc	cccagtgtctg	caatgatacc	gcgagacca	cgctcaccgg	5880
ctccagattt	atcagcaata	aaccagccag	cgggaagggc	cgagcgcaga	agtggtcctg	5940
caactttatc	cgctccatc	cagtctatta	attggtgccg	ggaagctaga	gtaagtagtt	6000
cgccagttaa	tagtttgccg	aacgttggtt	ccattgctac	aggcatcgtg	gtgtcacgct	6060
cgtcgttttg	tatggcttca	ttcagctccg	gttcccaacg	atcaaggcga	gttacatgat	6120
cccccatgtt	gtgcaaaaa	gcggttagct	ccttcgggtc	tccgatcgtt	gtcagaagta	6180
agttggccgc	agtgttatca	ctcatgggta	tggcagcact	gcataattct	cttactgtca	6240
tgccatccgt	aagatgcttt	tctgtgactg	gtgagtactc	aaccaagtca	ttctgagaat	6300
agtgtatgcg	gcgaccgagt	tgctcttgcc	cggcgctcaat	acgggataat	accgcgccac	6360
atagcagaac	tttaaaagtg	ctcatcattg	gaaaacgttc	ttcggggcga	aaactctcaa	6420
ggatcttacc	gctgttgaga	tccagttcga	tgtaaccac	togtgcaccc	aactgatctt	6480
cagcatcttt	tactttcacc	agcgtttctg	ggtgagcaaa	aacaggaagg	caaaatgccg	6540
caaaaaagg	aataagggcg	acacggaaat	gttgaatact	catactcttc	ctttttcaat	6600
attattgaag	catttatcag	ggttattgtc	tcatgagcgg	atacatattt	gaatgtattt	6660
agaaaaataa	acaaatagg	gttccgcgca	catttccccg	aaaagtgcc	cctgaacgaa	6720
gcatctgtgc	ttcattttgt	agaacaaaa	tgcaacgcga	gagcgcta	ttttcaaaca	6780
aagaatctga	gctgcatttt	tacagaacag	aatgcaacg	cgaaagcgct	attttaccaa	6840
cgaagaatct	gtgcttcatt	tttgtaaaac	aaaaatgcaa	cgcgagagcg	ctaatttttc	6900
aaacaaagaa	tctgagctgc	atttttacag	aacagaaatg	caacgcgaga	gcgctatttt	6960
accaacaaag	aatctatact	tcttttttgt	tctacaaaa	tgcatccga	gagcgctatt	7020
tttctaacia	agcatcttag	attacttttt	ttctcctttg	tgcgctctat	aatgcagtct	7080
cttgataact	ttttgcactg	taggtccggt	aagggttagaa	gaaggctact	ttggtgtcta	7140
ttttctcttc	cataaaaaaa	gcctgactcc	acttcccgcg	tttactgatt	actagcgaag	7200
ctgcgggtgc	attttttcaa	gataaaggca	tccccgatta	tattctatac	cgatgtggat	7260
tgcgcatact	ttgtgaacag	aaagtgatag	cgttgatgat	tcttcattgg	tcagaaaatt	7320
atgaacggtt	tcttctattt	tgtctctata	tactacgtat	aggaaatgtt	tacattttcg	7380
tattgttttc	gattcactct	atgaatagtt	cttactacaa	tttttttgtc	taaagagtaa	7440

tactagagat	aaacataaaa	aatgtagagg	tcgagtttag	atgcaagttc	aaggagcgaa	7500
aggtggatgg	gtaggttata	tagggatata	gcacagagat	atatagcaaa	gagatacttt	7560
tgagcaatgt	ttgtggaagc	ggtattcgca	atatttttagt	agctcgttac	agtccggtgc	7620
gtttttgggt	ttttgaaagt	gcgtcttcag	agcgcttttg	gttttcaaaa	gcgctctgaa	7680
gttcctatac	tttctagaga	ataggaactt	cggaatagga	acttcaaagc	gtttccgaaa	7740
acgagcgctt	ccgaaaatgc	aacgcgagct	gcgcacatac	agctcactgt	tcacgtcgca	7800
cctatatctg	cgtgttgcc	gtatatatat	atacatgaga	agaacggcat	agtgcgtgtt	7860
tatgcttaaa	tgcgtactta	tatgcgtcta	tttatgtagg	atgaaaggta	gtctagtacc	7920
tcctgtgata	ttatcccatt	ccatgcgggg	tatcgtagtc	ttccttcagc	actacccttt	7980
agctgttcta	tatgctgcca	ctcctcaatt	ggattagtct	catccttcaa	tgctatcatt	8040
tcctttgata	ttggatcata	ctaagaaacc	attattatca	tgacattaac	ctataaaaat	8100
aggcgtagca	cgaggccctt	tcgtc				8125

<210> 25
 <211> 10881
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética: construcción de integración ERG10-ERG13
 <400> 25

agcgcccaat	acgcaaaccg	cctctccccg	cgcggtggcc	gattcattaa	tgacagctggc	60
acgacaggtt	tcccgactgg	aaagcgggca	gtgagcgcaa	cgcaattaat	gtgagttagc	120
tcactcatta	ggcaccocag	gctttacact	ttatgcttcc	ggctcgtagt	ttgtgtggaa	180
ttgtgagcgg	ataacaattt	cacacaggaa	acagctatga	ccatgattac	gccaaagctat	240
ttaggtgaca	ctatagaata	ctcaagctat	gcatcaagct	tggtaccgag	ctcgatcca	300
ctagtaacgg	ccgccagtgt	gctggaattc	gcccttaa	atgaccccca	atatgagaaa	360
ttaaggctag	attattctca	ggaaaaagct	tttcatcttg	aaatgctgca	attatgtcgg	420
gtcccatttc	tccacactta	gcctctctct	tataatgccc	acagactaag	ttccaatctc	480
ttagaaaagt	ttcacccctga	aaccttgtaa	gctttctatg	atgcacttca	tgaacctgtt	540
gggaagcctt	ggccttaccg	cttaaataat	cctggaagga	tagctttggg	gcttgaatag	600
ctccttcctc	taaaaaagat	gcaaattcct	cgatgtccgt	ttccttaatt	acataaagct	660
tcatgtcagg	aataacaaaa	aaataaagcc	attcatcggt	ttgttttggc	cttggaataa	720
attcattttg	caaatgcacc	gcattttatta	gtattcctgg	agaaccacct	aaatgggagc	780
gcaatttact	aatggcatta	tatggccgat	ttgtattagt	atccaaatta	tgattccatg	840

ctaccttcca	tgggtgagca	aacctatcac	ccggtgataa	cagcaaaaaca	tgcttattgt	900
aattgggcgt	tctatgagga	agcttgatat	gaggatctaa	tggatcagtt	tttgaaggca	960
gccttgcggt	tatttcttgg	caataacagt	ttgtttgatc	atcttgagca	cgggtatgaa	1020
gatcaggaac	gctaatatgt	ttgaagctat	gatggaagga	tgcccgctgc	tgcaaagttt	1080
tgacagttat	acgtagcatt	ttattttttg	tgtcagtgca	ccttctctca	cttttctact	1140
aaggaaattt	gatatttcaa	atgtagtatg	ctaataaata	agaacacccg	catgcacgaa	1200
aaagggaaat	ttaaaactag	ttaggtaaac	aaagttcaga	acaagaaatg	atatggttgt	1260
tttacataga	tatatactca	gtattcggtt	ttataacggt	cgctgcactg	gggggtctaa	1320
ggcgctgat	tcaagaaata	tcttgaccgc	agttaactgt	gggaatactc	aggtatcgta	1380
agatgcaaga	gttcgaatct	cttagcaacc	attatttttt	tcctcaacat	aacgagaaca	1440
cacaggggcg	ctatcgca	gaatcaaatt	cgatgactgg	aaattttttg	ttaatttcag	1500
aggtcgctg	acgcataatc	ctttttcaac	tgaaaaattg	ggagaaaaag	gaaaggtgag	1560
agcgccggaa	ccggcttttc	atatagaata	gagaagcggt	catgactaaa	tgcttgcatc	1620
acaatacttg	aagttgacaa	tattatttaa	ggacctattg	ttttttccaa	taggtgggta	1680
gcaatcgtct	tactttctaa	cttttcttac	cttttacatt	tcagcaatat	atatatatat	1740
atttcaagga	tataccattc	taatgtctgc	ccctaagaag	atcgctggtt	tgccaggtga	1800
ccacgttggt	caagaaatca	cagccgaagc	cattaagggt	cttaaagcta	tttctgatgt	1860
tcgttccaat	gtcaagttcg	atttcgaaaa	tcatttaatt	ggtggtgctg	ctatcgatgc	1920
tacaggtggt	ccacttccag	atgaggcgct	ggaagcctcc	aagaaggctg	atgcggtttt	1980
gttaggtgct	gtgggtggtc	ctaaatgggg	tacggtagt	gttagacctg	aacaagggtt	2040
actaaaaatc	cgtaaagaac	ttcaattgta	cgccaaacta	agaccatgta	actttgcatc	2100
cgactctctt	ttagacttat	ctccaatcaa	gccacaattt	gctaaaggta	ctgacttcgt	2160
tggtgtcaga	gaattagtg	gaggtattta	ctttggtaag	agaaagggaag	acgatggtga	2220
tggtgtcgct	tgggatagtg	aacaatacac	cgttccagaa	gtgcaaagaa	tcacaagaat	2280
ggccgctttc	atggccctac	aacatgagcc	accattgcct	atttggctct	tggtataaagc	2340
taatgttttg	gcctcttcaa	gattatggag	aaaaactgtg	gaggaaacca	tcaagaacga	2400
attccctaca	ttgaagggtc	aacatcaatt	gattgattct	gccgccatga	tcctagttaa	2460
gaacccaacc	cacctaaatg	gtattataat	caccagcaac	atgtttggtg	atatcatctc	2520
cgatgaagcc	tccgttatcc	caggttcctt	gggtttggtg	ccatctgcgt	ccttggcctc	2580
tttgccagac	aagaacaccg	catttggttt	gtacgaacca	tgccacggtt	ctgctccaga	2640
tttgccaaag	aataaggtca	accctatcgc	cactatcttg	tctgctgcaa	tgatgttgaa	2700
attgtcattg	aacttgctg	aagaaggtaa	ggccattgaa	gatgcagtta	aaaagggttt	2760

ggatgcaggt atcagaactg gtgatttagg tggttccaac agtaccaccg aagtcggtga	2820
tgctgtcgcc gaagaagtta agaaaatcct tgcttaaaaa gatttctcttt ttttatgata	2880
tttgtagata aacttttataa atgaaattca taatagaaac gacacgaaat tacaaaaatgg	2940
aatatgttca tagggtagac gaaactatat acgcaatcta catacattta tcaagaagga	3000
gaaaaaggag gatgtaaagg aatacaggta agcaaattga tactaatggc tcaacgtaaa	3060
agtaagtcaa aaggcacacc tcagcgtttg agtacctgaa aaacgatgaa tcgcaataaa	3120
aacttttaaat tatgcctgtt atacataaag ccattttatat atttatgtat tttatgaaaa	3180
agatcatgag aaaatcgcag aacgtaatca tatcttttca atgacaatag aggaagcacc	3240
accaccacca ttacaaatgg cggcaacacc gatcttacct ccttcttgct gtaagatgga	3300
tagcagtgtg acaaccactc tagcaccaga acaacccaat gggtagacct gagcaacagc	3360
accaccatat acattaacct tagatgggtc tagcttcaaa atcttagtgt tcaccaaac	3420
gacaaccgaa aaggcttcat tgaattcaaa gtaatcaaca gaattgatgt cttcgatgcc	3480
agcatgtttc aaagcctttg gaactgcaag agatggagcc catgtaaaat cagctggttg	3540
atgagcggcc tcaccccaac ctttgataat agccaaaggc ttcaaattct tttccttcaa	3600
aactttttcg gaaaccaaga tgacggctgc agcaccatcg ttgattggag aagcgttagc	3660
ggcagtaaca gtaccgtttt ctttttgga aacagtcctt gcagatctca atttttcaac	3720
gtgtaatcta gcaggttcct cgtccttcgt gacttgagta tcaggcttac ctctaaatcc	3780
cttaattgga acaggtacaa tttcattgtc gaatttacct tccttttgag atttttgaga	3840
tttttggtag gattcgatgg caaaattgtc ttgttgttct ctagtaatat cccaatcacg	3900
ggcacacttt tctgcgtgta caccatggc tagaccatcg tacgcatcgt tcaaccatc	3960
tctttcgaca ccatcaacaa gaacagtttg gccaaatttg gcacccgcac gggctgctgg	4020
catgtagtat ggtgcgttag tcatagattc acaaccacca gctacgacaa catcagcatt	4080
accacatttg atggattgag caccctaaat gattgccttc atagcggatg cacagacctt	4140
gttaactgtg cttgcaacga tatgattact caaacggca gccaaagcaa cttgtctggc	4200
cggagcttgg cccaaatttg cagaaagaac gttacaaaaa ataatttcgt caaaatcctt	4260
ggatgcatcc aattctggaa ccttagccaa ggcgcctttt aaagcaacag caccctaatc	4320
cactgctgtc ttggaggata gagaaccctg gaatgaacca attgggggtc tggcagtcga	4380
tacaatgtaa acgttctgag acattatagt tttttctcct tgacgttaaa gtatagaggt	4440
atattaacaa ttttttggtg atacttttat gacatttgaa taagaagtaa tacaaaccga	4500
aaatgttgaa agtattagtt aaagtgggta tgcagctttt gcattttatat atctgttaat	4560
agatcaaaaa tcatcgcttc gctgattaat taccacagaa ataaggctaa aaaactaatc	4620

gcattattat cctatgggtt ttaatttgat tcgttgattt gaaggtttgt ggggccaggt 4680
tactgccaat ttttcctctt cataaccata aaagctagta ttgtagaatc tttattgttc 4740
ggagcagtg cgcgcgaggc acatctgcgt ttcaggaacg cgaccggtga agaccaggac 4800
gcacggagga gagtcttccg tcggagggct gtgcgccgct cggcggcttc taatccgtac 4860
ttcaatatag caatgagcag ttaagcgtat tactgaaagt tccaaagaga aggttttttt 4920
aggctaagat aatggggctc tttacatttc cacaacatat aagtaagatt agatatggat 4980
atgtatatgg tggatttgcc atgtaatatg attattaaac ttctttgcgt ccatccaaaa 5040
aaaaagtaag aatttttgaa aattcaatat aaatgaaact ctcaactaaa ctttggttgg 5100
gtggtattaa aggaagactt aggccgcaaa agcaacaaca attacacaat acaaaactgc 5160
aatgactga actaaaaaaaa caaaagaccg ctgaacaaaa aaccagacct caaaatgtcg 5220
gtattaaagg tatccaaatt tacatcccaa ctcaatgtgt caaccaatct gagctagaga 5280
aatttgatgg cgttttctca ggtaaatata caattgggtc gggccaaacc aacatgtctt 5340
ttgtcaatga cagagaagat atctactcga tgtccctaac tgttttgtct aagttgatca 5400
agagttacaa catcgacacc aacaaaattg gtagattaga agtcggtact gaaactctga 5460
ttgacaagtc caagtctgtc aagtctgtct tgatgcaatt gtttggtgaa aacactgacg 5520
tcgaaggat tgacacgctt aatgcctgtt acggtggtac caacgcgttg ttcaactctt 5580
tgaactggat tgaatctaac gcatgggatg gtagagacgc cattgtagtt tgccgtgata 5640
ttgccatcta cgataagggt gccgcaagac caaccggttg tgccggtact gttgctatgt 5700
ggatcggtcc tgatgctcca attgtatttg actctgtaag agcttcttac atggaacacg 5760
cctacgattt ttacaagcca gatttcacca gcgaatatcc ttacgtcgat ggtoattttt 5820
cattaacttg ttacgtcaag gctcttgatc aagtttacia gagttattcc aagaaggcta 5880
tttctaaagg gttggttagc gatcccgctg gttcggtacg tttgaacgtt ttgaaatatt 5940
tcgactacaa cgttttccat gttccaacct gtaaatgggt caaaaaatca tacggtagat 6000
tactatataa cgatttcaga gccaatctc aattgttccc agaagttgac gccgaattag 6060
ctactcgcga ttatgacgaa tctttaaccg ataagaacat tgaaaaaact tttgttaatg 6120
ttgctaagcc attccacaaa gagagagttg cccaatcttt gattgttcca acaaacacag 6180
gtaacatgta caccgcatct gtttatgccc cttttgcac tctattaaac tatgttggat 6240
ctgacgactt acaaggcaag cgtgttggtt tattttctta cggttccggt ttagctgcat 6300
ctctatattc ttgcaaaatt gttggtgacg tccaacatat tatcaaggaa ttagatatta 6360
ctaacaatt agccaagaga atcaccgaaa ctccaaagga ttacgaagct gccatcgaat 6420
tgagagaaaa tgcccatttg aagaagaact tcaaacctca aggttccatt gagcatttgc 6480
aaagtgggtg ttactacttg accaacatcg atgacaaatt tagaagatct tacgatgtta 6540

aaaaataatc	ttcccccatc	gattgcatct	tgtcgaaccc	ccttcataaa	tgttttattt	6600
ttttggcagc	ctgctttttt	tagctctcat	ttaatagagt	agttttttta	tctatatact	6660
aggaaaactc	tttattttaat	aacaatgata	tatatataga	cgggagtgga	aagaacggga	6720
aaccaactat	cgagattgta	tacgctggtc	ggcaaggacc	agcagtgaca	tgtgatgtat	6780
atatattcag	gttcaaaaaa	aaaagttatg	agcttttggt	tattatgaat	gtagcagaca	6840
ttttgaggtc	gttcggggcga	gagtgcgccg	gtaaatgaag	aaaatatagg	atattattaa	6900
tattagaatt	aaactattat	attgcagggg	agagaagaaa	gggtataaaa	tatatattac	6960
aaagcggaaa	acttgcgcca	tttaaacaga	gacatcgctc	gggcgctcgt	gtgattttct	7020
tatagtgaag	aagttaatac	ctttaggttg	gttttccgta	gcagcagtgg	cagtgaccgg	7080
attagcattg	gaagaaggcc	ccactatgct	tgcactttgt	tgcattgtct	caggtccagt	7140
ggcagtcaat	attgggtcag	ttgcttgctc	cttctctcta	tggaagggat	tccatctgga	7200
ggaggttctg	tatcttgaat	tgtcgatgga	gtaagtagag	gccaaccttg	ccctaacaga	7260
ccagaagacc	agcaggataa	attccacgat	acataaaaag	acacttgccc	aagccatacc	7320
catcatagag	gcacccaatt	gggcactacg	atgatcgtca	tggaaagcat	tctttgccat	7380
ggcagaggcg	gccgtttgca	agacaacggc	tgccgtattg	aagacaaacc	caaaagacat	7440
gaggataagc	accatctctg	aaagcatctt	cgagcaccaa	gtcaaaacgt	aaaggataaa	7500
cgacacacct	acaaaggcaa	gcgcaatcca	aaagaaacaa	aatgaaaatc	tagtcaggta	7560
gtaaaaagcg	tctcttttgg	aaataaactg	gtgagggaca	ttgatgtgtg	tgttgaagtt	7620
atctactggg	gaaatggggt	atgcagggtc	caaattgctt	gtgcagggtat	ccgaccgctc	7680
tttatcctgt	agacaggcaa	gggcgaattc	tgcagatata	catcacactg	gcggccgctc	7740
gagcatgcat	ctagagggcc	caattcgccc	tatagtgaat	cgtattacaa	ttcactggcc	7800
gtcgttttac	aacgtcgtga	ctgggaaaac	cctggcggtta	cccaacttaa	tgccttgca	7860
gcacatcccc	ctttcgccag	ctggcgtaat	agcgaagagg	cccgaccga	tgcaccttcc	7920
caacagttgc	gcagcctata	cgtacggcag	tttaagggtt	acacctataa	aagagagagc	7980
cgttatcgtc	tgtttgtgga	tgtacagagt	gatattattg	acacgccggg	gcgacggatg	8040
gtgatcccc	tggccagtgc	acgtctgctg	tcagataaag	tctcccgta	actttacctg	8100
gtggtgcata	tgggggatga	aagctggcgc	atgatgacca	ccgatatggc	cagtgtgccg	8160
gtctccgtta	tgggggaaga	agtggctgat	ctcagccacc	gcgaaaatga	catcaaaaac	8220
gccattaacc	tgatgttctg	gggaatataa	atgtcaggca	tgagattatc	aaaaaggatc	8280
ttcacctaga	tcctttttcac	gtagaaagcc	agtccgcaga	aacggtgctg	accccgatg	8340
aatgtcagct	actgggctat	ctggacaagg	gaaaacgcaa	gcgcaaagag	aaagcaggta	8400

gcttgcaagtg ggcttacatg gogatagcta gactggggcgg ttttatggac agcaagcgaa	8460
ccggaattgc cagctggggc gccctctggt aagggttggga agccctgcaa agtaaaactgg	8520
atggctttct cgcgcgaag gatctgatgg cgcaggggat caagctctga tcaagagaca	8580
ggatgaggat cgtttcgcat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct	8640
tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc	8700
gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc	8760
ggtgccctga atgaactgca agacgaggca gcggggctat cgtggctggc cagcagggc	8820
gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg gctgctattg	8880
ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc	8940
atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac	9000
caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaaagcgg tcttgctgat	9060
caggatgata tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag ccgaactgtt cggcaggtc	9120
aaggcgagca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg	9180
aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg	9240
gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc	9300
gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcac	9360
gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgaattatta acgcttaca tttcctgatg	9420
cgtatcttct tccctacgca tctgtgcggg atttcacacc gcatacaggt ggcacttttc	9480
ggggaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc	9540
cgtcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata gcacgtgagg agggccacca	9600
tggccaagtt gaccagtgc gttccgggtgc tcacgcgcg cgacgtcgcc ggagcggctg	9660
agttctggac cgaccggctc gggttctccc gggacttcgt ggaggacgac ttcgccggtg	9720
tggtcgggga cgacgtgacc ctgttcatca gcgcgggtcca ggaccaggtg gtgccggaca	9780
acaccctggc ctgggtgtgg gtgcgcggcc tggacgagct gtacgccgag tggtcggagg	9840
tcgtgtccac gaacttccgg gacgcctccg ggccggccat gaccgagatc ggcgagcagc	9900
cgtggggggc ggagttcgcc ctgcgcgacc cggccggcaa ctgcgtgcac ttcgtggccg	9960
aggagcagga ctgacacgtg ctaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga	10020
tcccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt	10080
cagaccccg agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct	10140
gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgcc gatcaagagc	10200
taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc	10260
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc ttagtcaccg cctacatacc	10320

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 10380
 ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 10440
 cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 10500
 agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc 10560
 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttcacag gggaaacgcc tggatatctt 10620
 atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 10680
 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc ctgggctttt 10740
 gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 10800
 ttaccgcctt tgagtgaagt gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 10860
 cagtgaagca ggaagcggaa g 10881

5 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético YT_164_36_001

<400> 26
 gcctgtctac aggataaaga cggg 24

15 <210> 27
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético YT_164_36_002

<400> 27
 tcccgttctt tccactcccg tctatatata tatcattgtt attt 44

25 <210> 28
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético YT_164_36_003

<400> 28
 taataacaat gatatatata tagacgggag tggaaagaac ggga 44

35 <210> 29
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético YT_164_36_004

45 <400> 29
 ccaacaaagt ttagtgaga gtttcattta tattgaattt tcaaaaattc ttac 54

<210> 30
 <211> 54

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador sintético YT_164_36_005

 <400> 30
 gtaagaattt ttgaaaattc aatataaatg aaactctcaa ctaaacttg ttgg 54

 10 <210> 31
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador sintético YT_164_36_006

 <400> 31
 20 gtaaggaga aaaaactata atgtctcaga acgtttacat tgatcgcact gccagaaccc 60

 <210> 32
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador sintético YT_164_36_007

 <400> 32
 30 ggggtctggc agtcgataca atgtaaacgt tctgagacat tatagtttt tctccttgac 60

 <210> 33
 <211> 42
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético YT_164_36_008

 40 <400> 33
 gtgtgccttt tgactactt ttacgttgag ccattagtat ca 42

 <210> 34
 <211> 42
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético YT_164_36_009
 50
 <400> 34
 tgatactaatt ggctcaacgt aaaagtaagt caaaaggcac ac 42

 <210> 35
 55 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Cebador sintético YT_164_36_010

 <400> 35
 gatattctt gaatcaggcg ccttagaccc cccagtgcag cgaacgttat aaaaac 56

 65 <210> 36
 <211> 56

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador sintético YT_164_36_011

 <400> 36
 gttttataa cggtcgctgc actggggggt ctaaggcgcc tgattcaaga aatatc 56

 10 <210> 37
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Construcción sintética: Enlazador YT_164_36_012

 <400> 37
 aaatatgacc cccaatatga gaaattaagg c 31
 20
 <210> 38
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador sintético YT_164_30_Gal3F

 <400> 38
 30 gagctcgcgg ccgctgacat acctctctcc gtatcctcgt aatcatttcc ttgt 54

 <210> 39
 <211> 46
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético YT_164_30 Gal3R

 <400> 39
 40 catatgacta tgtgtgccc taccttttta cttttatctt ctcttt 46

 <210> 40
 <211> 54
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético YT_164_30_Gal7F
 50
 <400> 40
 gagctcgcgg ccgctgtgca cagcgaattt cctcacatgt agggaccgaa ttgt 54

 <210> 41
 55 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Cebador sintético YT_164_30 Gal7R

 <400> 41
 catatgtttt gaggaatat tcaactgttt tttttatca tgttga 46

 65 <210> 42
 <211> 28

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Construcción sintética: Enlazador RYSE 0

 <400> 42
 gacggcacgg ccacgcgttt aaaccgcc 28

 10 <210> 43
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Construcción sintética: Enlazador RYSE 19

 <400> 43
 20 cccgccaggc gctgggggtt aaacacc 27

 <210> 44
 <211> 2738
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Construcción sintética: construcción de alteración Kan A-ADH1

 <400> 44
 30

 gacggcacgg ccacgcgttt aaaccgccaa tgggctaaac aagactaac caattacact 60

 gcctcattga tgggtgtaca taacgaacta atactgtagc cctagacttg atagccatca 120

 tcatatcgaa gtttcactac cctttttcca tttgccatct attgaagtaa taataggcgc 180

atgcaaacttc ttttcttttt ttttcttttc tctctcccc gttgttgtct caccatatcc	240
gcaatgacaa aaaaatgatg gaagacacta aaggaaaaaa ttaacgacaa agacagcacc	300
aacagatgtc gttgttccag agctgatgag gggatatctcg aagcacacga aactttttcc	360
ttccttcatt cacgcacact actctctaata gagcaacggg atacggcctt ccttccagtt	420
acttgaattt gaaataaaaa aaagtttgct gtcttgctat caagtataaa tagacctgca	480
attattaatc ttttgtttcc tcgtcattgt tctcgctcac acgcggccag ggggagcctc	540
gacactagta atacacatca tcgtcctaca agttcatcaa agtgttggaac agacaactat	600
accagcatgg atctcttgta tcggttcttt tctcccgctc tctcgcaata acaatgaaca	660
ctgggtcaat catagcctac acaggtgaac agagtagcgt ttatacaggg ttatacaggt	720
gattcctacg gcaaaaattt ttcatctcta aaaaaaaaaa gaaaaatttt tctttccaac	780
gctagaagga aaagaaaaat ctaattaaat tgatttggtg attttctgag agttcccttt	840
ttcatatata gaattttgaa tataaaagga gatcgaaaaa atttttctat tcaatctggt	900
ttctggtttt atttgatagt ttttttgtgt attattatta tggattagta ctggtttata	960
tgggtttttc tgtataactt ctttttattt tagtttggtt aatcttattt tgagttacat	1020
tatagttccc taactgcaag agaagtaaca ttaaaaatgg gtaaggaaaa gactcacgtt	1080
tcgaggccgc gattaaattc caacatggat gctgatttat atgggtataa atgggctcgc	1140
gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc tatcgattgt atgggaagcc cgatgcgcca	1200
gagttgtttc tgaaacatgg caaaggtagc gttgccaatg atgttacaga tgagatggtc	1260
agactaaact ggctgacgga atttatgcct cttccgacca tcaagcattt tatccgtact	1320
cctgatgatg catggttact caccactgcg atccccggca aaacagcatt ccaggatta	1380
gaagaatata ctgattcagg tgaaaatatt gttgatgcgc tggcagtggt cctgcgccgg	1440
ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct tttaacagcg atcgcgattt tcgtctcgct	1500
caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt	1560
aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa gaaatgcata agcttttgcc attctcaccg	1620
gattcagtcg tcaactcatgg tgattttctca cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa	1680
ttaataggtt gtattgatgt tggacgagtc ggaatcgag accgatacca ggatcttgcc	1740
atcctatgga actgcctcgg tgagttttct ccttcattac agaaacggct ttttcaaaaa	1800
tatggatttg ataactctga tatgaataaa ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt	1860
ttctaagttt aacttgatac tactagattt tttctcttca ttataaaaat ttttggttat	1920
aattgaagct ttagaagtat gaaaaaatcc ttttttttca ttctttgcaa ccaaaataag	1980
aagcttcttt tattcattga aatgatgaat ataaacctaa caaaagaaaa agactcgaat	2040

atcaaacatt	aaaaaaaaat	aaaagaggtt	atctgttttc	ccatttagtt	ggagtttgca	2100
ttttctaata	gatagaactc	tcaattaatg	tggatttagt	ttctctgttc	gttttttttt	2160
gttttgttct	cactgtattt	acattttctat	ttagtattta	gttattcata	taatcttaac	2220
ttctcgagga	gctccgctcg	tccaacgccg	gcggaccttt	taaaacgaaa	attcttattc	2280
ttgagtaact	ctttcctgta	ggtcaggttg	ctttctcagg	tatagcatga	ggcgcgtctt	2340
attgaccaca	cctctaccgg	catgccgagc	aaatgcctgc	aaatcgctcc	ccatttcacc	2400
caattgtaga	tatgctaact	ccagcaatga	gttgatgaat	ctcgggtgtg	attttatgtc	2460
ctcagaggac	aacacctggt	gtaatcggtt	ttccacacgg	atccacagcc	tagccttcag	2520
ttgggctcta	tcttcacgtg	cattcattgc	atctactagc	cccttacctg	agcttcaaga	2580
cgttatatcg	cttttatgta	tcatgatctt	atcttgagat	atgaatacat	aaatatattt	2640
actcaagtgt	atacgtgcat	gcttttttta	cggcagcatt	tttttttcaa	ctctgatcgc	2700
ccctttactg	cgggtgttta	accccagcgc	ctggcggg			2738

<210> 45
 <211> 3059
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética: construcción de integración i2235

<400> 45

gacggcacgg	ccacgcgttt	aaacgcctc	gatatttcct	gtgagaagtt	taaateccact	60
aagggttttc	attgttgctg	cagatgtggt	tttccattca	tcctgaaata	tgcaactgcta	120
ttcgcatttc	cattccccta	gtctttttta	gttctttccg	ttcgaccttc	atcgaaaaat	180
gacaaaacgc	gttaggaaca	acaaccaatt	gcaaacaagc	agtgaacaa	aaccatcaag	240
gcccgaaaat	acaagtgtgt	actaatacag	taagtaggtc	aaatacgcaa	tgaccaaaga	300
tgccgtgaat	ctagatgctt	acaccgtgag	cttcatgcct	ttctataaccg	agtatcaagg	360
accaaccgaa	gagtttaagg	attacaaatt	cgaagatact	atttactttc	gtggcaagga	420
actgaagagg	gaaaagtctg	cgacgccttc	cagtagcgat	aacacaacta	gtaatacctt	480
cagtaatggc	gccatcctct	cgggaaacac	aataactggc	aagatagttt	cagtgaataa	540
ttacgaaaga	gagggcactg	atcgcaacga	attggcgcg	ttgcaagaat	tgatctccct	600
catcgatgtc	ataaatcagt	aaatataagc	tcacacgcgg	ccagggggag	cccgttgagc	660
cattagtatc	aatttgctta	cctgtattcc	tttactatcc	tcctttttct	ccttcttgat	720
aaatgtatgt	agattgcgta	tatagtttccg	tctaccctat	gaacatattc	cattttgtaa	780
tttcgtgtcg	tttctattat	gaatttcatt	tataaagttt	atgtacaaat	atcataaaaa	840
aagagaatct	ttttaagcaa	ggattttctt	aacttcttcg	gcgacagcat	caccgacttc	900

ggtggtactg ttggaaccac ctaaatacacc agttctgata cctgcatcca aaaccttttt	960
aactgcatct tcaatggcct taccttcttc aggcaagttc aatgacaatt tcaacatcat	1020
tgcagcagac aagatagtg ccatagggtc aaccttattc tttggcaaag ctggagcaga	1080
accgtggcat ggttcgtaca aaccaaagtc ggtgttcttg tctggcaaag aggccaaagga	1140
cgcagatggc aacaaaccca aggaacctgg gataacggag gcttcatcgg agatgatatc	1200
accaaacatg ttgctggtga ttataatacc atttaggtgg gttgggttct taactagat	1260
catggcggca gaataaatca attgatgttg aaccttcaat gtagggaatt cgttcttgat	1320
ggtttcctcc acagtttttc tccataatct tgaagaggcc aaaacattag ctttatccaa	1380
ggaccaaata ggcaatggtg gctcatgttg tagggccatg aaagcggcca ttcttgatg	1440
tctttgcaact tctggaacgg tgtattgttc actatcccaa gcgacacat caccatcgtc	1500
ttcctttctc ttaccaaagt aaatacctcc cactaattct ctgacaacaa cgaagtcagt	1560
acctttagca aattgtggct tgattggaga taagtctaaa agagagtcgg atgcaaagtt	1620
acatggtctt aagttggcgt acaattgaag ttctttacgg atttttagta aacctgttc	1680
aggcttaaca ctaccggtac cccatttagg accacccaca gcacctaaac aaacggcatc	1740
aaccttcttg gaggcctcca gcgcctcatc tgggaagtggg acacctgtag catcgatagc	1800
agcaccacca attaaatgat ttctgaaatc gaacttgaca ttggaacgaa catcagaaat	1860
agctttaaga accttaatgg ctccggctgt gatttcttga ccaacgtggc cacctggcaa	1920
aacgacgac ttcttagggg cagacatagg ggcagacatt agaattggtat atccttgaaa	1980
tatatatata tattgctgaa atgtaaaagg taagaaaagt tagaaagtaa gacgattgct	2040
aaccacctat tggaaaaaac aataggtcct taaataatat tgtcaacttc aagtattgtg	2100
atgcaagcat ttagtcatga acgcttctct attctatatg aaaagccggc tccggcctct	2160
cacctttcct ttttctccca atttttcagt tgaaaaaggt atatgcgtca ggcgacctct	2220
gaaattaaca aaaaatttcc agtcatcgaa ttgattctg tgcgatagcg cccctgtgtg	2280
ttctcggtat gttgaggaaa aaaataatgg ttgctaagag attcgaaact ttgcatctta	2340
cgatacctga gtattccac agttaactgc ggtcaagata tttcttgaat caggcgccctc	2400
gctcgtccaa cgccggcgga cctcttaaat gagaaaaatt tcgtaatgag ataaaatttc	2460
gctccttttc tgttttctat tttctatttt cccaactttt gctctattca gttataaatt	2520
actatttatc catcagttaa aaaacaagat cttttactgg tcagctagga aagcgaaaat	2580
acaaagactt tatgcactta gtgatataata tgtatagata tatccatttt taacgactta	2640
tcatatatct tagttatcta aatacaatct agttattcgt acacaatcgc cctgttatc	2700
cctatagtgg gaataaagta atgcactgtg acgggggttct tcgcccggga tagggtaaaa	2760

ggatattgcc gtttcaagaa acttcgggga taatcgaata agataccgag aaagctattg 2820
 ttogttgtgc acgtaggatg tatattgaac aagcatgacc agaactctgat gcattacgag 2880
 aaggttacgg gatgatatca gacctccgaa gtccatgttg caaaatgtgc cgactttccg 2940
 cggcgctatt tggcacaaat ttcaggagaa acatcactgt cgggtgtata gaattccatc 3000
 tatattgttt tccccgtagg catacgtcga gcggtgttta aaccccagcg cctggcgagg 3059

<210> 46
 <211> 8106
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética: construcción de integración i74804
 <400> 46

gacggcacgg ccacgcgttt aaaccgcccg ctgcctcat cccacggga ataaggcagc 60
 cgacaaaaga aaaacgaccg aaaaggaacc agaaagaaaa aagaggggtgg gcgcgccgcg 120
 gacgtgtaaa aagatatgca tccagcttct atatcgcttt aactttaccg ttttgggcat 180
 cgggaacgta tgtaacattg atctcctctt gggaacgggtg agtgcaacga atgcgatata 240
 gcaccgacca tgtgggcaaa ttcgtaataa attcgggggtg aggggggattc aagacaagca 300
 accttggttag tcagctcaaa cagcgattta acggttgagt aacacatcaa aacaccgttc 360
 gaggtcaagc ctggcgtggt taacaagttc ttgatatcat atataaatgt aataagaagt 420
 ttggaatat tcaattcgaa gtgttcagtc ttttacttct cttgttttat agaagaaaaa 480
 acatcaagaa acatctttta catacacaaa cacatactat cagaatacac gctcgtccaa 540
 cgccggcgga cctttcagac gcgactgcct catcagtaag acccgttgaa aagaacttac 600
 ctgaaaaaaa cgaatatata ctacggttga atggttagcgt caacaacaag aagtttaagt 660
 acgcggaggc caaggcaaaa agattccttg attacgtaag ggagttagaa tcattttgaa 720
 taaaaaacac gctttttcag ttcgagttta tcattatcaa tactgccatt tcaaagaata 780
 cgtaaataat taatagtagt gattttccta actttattta gtcaaaaaat tagcctttta 840
 attctgctgt aacccgtaaa tgcccaaaat agggggcggg ttacacagaa tatataacat 900
 cgtaggtgtc tgggtgaaca gtttattcct ggcatccact aaatataatg gagcccgctt 960
 tttaagctgg catccagaaa aaaaaagaat ccagcacca aaatattggt ttcttcacca 1020
 accatcagtt cataggtcca ttctcttagc gcaactacag agaacagggg cacaacagg 1080
 caaaaaacgg gcacaacctc aatggagtga tgcaacctgc ctggagttaa tgatgacaca 1140
 aggcaattga cccacgcagc tatctatctc attttcttac accttctatt accttctgct 1200
 ctctctgatt tggaaaaagc tgaaaaaaa gggtgaaacc agttccctga aattattccc 1260
 ctacttgact aataagtata taaagacggg aggtattgat tgtaattctg taaatctatt 1320

tcttaaactt	cttaaattct	acttttatag	ttagtctttt	ttttagtttt	aaaacaccaa	1380
gaacttagtt	tgcacctccc	gcgacctcca	aaatcgaact	accttcacaa	tggaacattc	1440
tgtaatcgaa	ccaactgtgc	ccatgcogct	accagccatg	tttgacgctc	catctggtat	1500
ttttagctct	ttggacgacg	ctgtgcaagc	agccacctta	gccaacaac	aactaagttc	1560
agttgagttg	cgtcagcaag	taatcaaagc	cataagagtg	gccggagaaa	ggtatgcaca	1620
agttttggct	gaaatggcag	ttgctgaaac	tggtatgggt	aggggtggtg	ataagtacat	1680
taagaatgtc	tctcaagctc	gtcatacgcc	tggtatagaa	tgtttatcgg	ccgaggttct	1740
tacgggtgat	aatggcctaa	cattgattga	aaatgccctt	tggggagtcg	tagcttcagt	1800
cacgccaaag	acaaatccag	cagctacggg	aattaataat	gcaatctcaa	tgattgcagc	1860
ggggaattca	gtcgtgttcg	caccacatcc	ttctgcaaaa	aacgtctcac	taaggactat	1920
ttctttactc	aacaaggcca	ttgtcgctac	cggcggccca	gaaaatttac	tagttagtgt	1980
ggcaaacctt	aacatcgaaa	ctgcacagag	attattcaga	tatccgggta	ttggattgtt	2040
agttgtgaca	ggtggtgaag	ccgtcggtga	agccgctagg	aagcatacag	ataaaaggtt	2100
aattgcagcc	ggcgtggta	atcctcctgt	tgttgtggac	gaaactgctg	acatacctaa	2160
agccgcaaga	gcaattgtca	aggggtgctt	tttcgacaac	aacataattt	gtgctgatga	2220
aaaagttttg	attgtggtag	acagagttgc	agatgcacta	ttggcagaaa	tgcaaagaaa	2280
taacgccgtc	ttacttacac	ccgaacagac	cgaaagacta	ctacccgctc	ttttgtccga	2340
tattgacgaa	cagggcacaa	gacgtgtgaa	tagagattat	gttggaagag	atgcggctaa	2400
attagcagcg	gctattgggt	tggaagttag	cgaacatact	cgtctactcc	tggcagagac	2460
agacgctgat	catccattcg	ccgtgacgga	gctgatgatg	ccagtgttac	cagtaataag	2520
agtcaagaat	gtagatgatg	caatcgcat	ggcagtttaag	ctagagtcag	gctgcagaca	2580
cacagctgcg	atgcactcta	ctaataaag	aaacttaa	agaatggcta	atgccatcaa	2640
tacctctatc	tttgtaaaaa	atgggtccatg	tattgcaggt	ttgggttttag	gcgggtgaagg	2700
ttggacttca	atgactatta	gcactccgac	cggtgaagggt	gttacaagcg	ctcgtacctt	2760
tgtcagatta	agaagggtgtg	tcttagtcga	catgtttcgg	attgcttaag	cgcccgcgag	2820
taataattat	tgcttccata	taatattttt	atatacctct	tatttttatg	tattagttaa	2880
ttaagtattt	ttatctatct	gcttatcatt	ttcttttcat	ataggggggg	ttggtgtttt	2940
cttgcccatc	agattgatgt	cctccaactc	ggcactat	tacaaagggt	ttttttgtaa	3000
gagaaggaga	agacagatac	taaaccatac	gttactcgaa	acaaaaaaaa	aaaaaatgga	3060
aaaagctgct	atcaacaaaa	gacggcctca	tcaaacctaa	agaaaccatg	tcagcgtatg	3120
tatatacctt	gtaattttacg	tttccttaaa	tcttctttct	actaacgttt	tcattattct	3180

atactctatg accaataaaa acagactgta ctttcaaaat ttacccagta ggccagcaaa	3240
taaagaaaat tataccagat tacttctgaa acacattaat cccaacaaca agtatgccat	3300
taatccgtcg ctaccccatc cccgcgtgct tggccggcgg tacactgagt aatggtagtt	3360
ataagaaaga gaccgagtta gggacagtta gaggcgggtg agatattcct tatggcatgt	3420
ctggcgatga taaaactttt caaacggcag ccccgatcta aaagagctga cagggaatg	3480
gtcagaaaaa gaaacgtgca cccgcccgtc tggacgcgcc gtcacccgc acggcagaga	3540
ccaatcagta aaaatcaacg gttaacgaca ttactatata tataatatag gaagcattta	3600
atagaacagc atcgtaatat atgtgtactt tgcagttatg acgccagatg gcagtagtgg	3660
aagatattct ttattgaaaa atagcttgtc acctacgta caatcttgat ccggagcttt	3720
tctttttttg ccgattaaga attcggtcga aaaaagaaaa ggagagggcc aagagggagg	3780
gcattggtga ctattgagca cgtgagtata cgtgattaag cacacaaagg cagcttgagg	3840
tatgtctgtt attaatctca caggtagttc tgggccattg gtgaaagttt gcggcttgca	3900
gagcacagag gccgcagaat gtgctctaga ttccgatgct gacttgctgg gtattatatg	3960
tgtgccaat agaaagagaa caattgacct gggtattgca aggaaaattt caagtcttgt	4020
aaaagcatat aaaaatagtt caggcactcc gaaatacttg gttggcgtgt ttcgtaatca	4080
acctaggag gatgttttg ctctggtcaa tgattacggc attgatatcg tccaactgca	4140
tggagatgag tcgtggcaag aataccaaga gttcctcggg ttgccagtta ttaaaagact	4200
cgtatttcca aaagactgca acatactact cagtgcagct tcacagaaac ctcatctggt	4260
tattcccttg tttgattcag aagcaggtgg gacaggtgaa cttttggatt ggaactcgat	4320
ttctgactgg gttggaaggc aagagagccc cgaaagctta cattttatgt tagctggtgg	4380
actgacgcca gaaaatggtg gtgatgcgct tagattaaat ggcgttattg gtgttgatgt	4440
aagcggaggt gtggagacaa atggtgtaaa agactctaac aaaatagcaa atttcgtcaa	4500
aaatgctaag aaataggtta ttactgagta gtatttatat aagtattggt tgtgcacttg	4560
cctgcaggcc ttttgaaaag caagcataaa agatctaaac ataaaaatctg taaaataaca	4620
agatgtaaag ataatagctaa atcatttggc tttttgattg attgtacagg aaaatataca	4680
tcgcaggggg ttgactttta ccatttcacc gcaatggaat caaacttggt gaagagaatg	4740
ttcacaggcg catacgctac aatgacacgg ccggccaagc acgcggggat ggggtagcga	4800
cggattaatg gcatacttgt tgttgggatt aatgtgtttc agaagtaatc tggataatt	4860
ttctttatct gctggcctac tgggtaaatt ttgaaagtac agtctgtttt tattggatcat	4920
agagtataga ataataaaaa cgtagtaga aagaagattt aaggaaacgt aaattacaag	4980
gtatatacat acgctgacat ggtttcttta ggtttgatga ggccgtcttt tgttgatagc	5040
agctttttcc attttttttt tttttgtttc gagtaacgta tggtttagta tctgtcttct	5100

ccttctctta	caaaaaaacc	ctttgtaaaa	tagtgccgag	ttggaggaca	tcaatctgat	5160
gggcaagaaa	acaccaaccc	cccctatatg	aaaagaaaat	gataagcaga	tagataaaaa	5220
tacttaatta	actaatacat	aaaaataaga	ggtatataaa	aatattatat	ggaagcaata	5280
attattactc	gcggccgctt	aagcaatccg	aaacatgtcg	actaagacac	accttcttaa	5340
tctgacaaag	gtacgagcgc	ttgtaacacc	ttcaccggtc	ggagtgctaa	tagtcattga	5400
agtccaacct	tcaccgccta	aacccaaacc	tgcaatacat	ggaccatttt	ttacaaagat	5460
agaggtattg	atggcattag	ccattctatt	taagtttctt	atattagtag	agtgcacgc	5520
agctgtgtgt	ctgcagcctg	actctagctt	aactgccaat	gcgattgcat	catctacatt	5580
cttgactctt	attactggta	acactggcat	catcagctcc	gtcacggcga	atggatgatc	5640
agcgtctgtc	tctgccagga	gtagacgagt	atgttcgcta	acttccagac	caatagccgc	5700
tgctaattta	gccgcatctc	ttccaacata	atctctattc	acacgtcctt	tgccctgttc	5760
gtcaatatcg	gacaaaagag	cgggtagtag	tctttcggtc	tggtcgggtg	taagtaagac	5820
ggcgttattt	ctttgcattt	ctgccaatag	tgcatctgca	actctgtcta	ccacaatcaa	5880
aaactttttca	tcagcacaaa	ttatgttggt	gtcgaaagaa	gcacccttga	caattgctct	5940
tgoggcttta	ggtatgtcag	cagtttcgtc	cacaacaaca	ggaggattac	cagcgcgggc	6000
tgcaattaac	cttttatctg	tatgcttcct	agcggcttca	acgacggctt	caccacctgt	6060
cacaactaac	aatccaatac	ccggatatct	gaataatctc	tgtgcagttt	cgatgttagg	6120
gtttgccaca	ctaactagta	aattttctgg	gccgccggta	gcgacaatgg	ccttgttgag	6180
taaagaaata	gtccttagtg	agacgttttt	ggcagaagga	tgtggtgcga	acacgactga	6240
attccccgct	gcaatcattg	agattgcatt	attaattacc	gtagctgctg	gatttgtgct	6300
tggcgtgact	gaagctacga	ctccccaagg	ggcattttca	atcaatgtta	ggccattatc	6360
accogtaaga	acctcggcog	ataaacattc	tataccaggc	gtatgacgag	cttgagagac	6420
attcttaatg	tacttatcca	ccaccctacc	cataccagtt	tcagcaactg	ccatttcagc	6480
caaaacttgt	gcataccttt	ctccggccac	tcttatggct	ttgattactt	gctgacgcaa	6540
ctcaactgaa	cttagttggt	gttgggctaa	ggtggctgct	tgcacagcgt	cgtccaaaga	6600
gctaaaaata	ccagatggag	cgtcaaacat	ggctggtagc	ggcatgggca	cagttgggtc	6660
gattacagaa	tgttccattg	tgaaggtagt	togattttgg	aggtcgoggg	aggtcgaaac	6720
taagttcttg	gtgtttttaa	actaaaaaaa	agactaacta	taaaagtaga	atttaagaag	6780
tttaagaaat	agatttacag	aattacaatc	aatacctacc	gtctttatat	acttattagt	6840
caagtagggg	aataatttca	gggaactggt	ttcaaccttt	tttttcagct	ttttccaaat	6900
cagagagagc	agaaggtaat	agaagggtga	agaaaatgag	atagatacat	gcgtgggtca	6960

attgccttgt gtcattcat tctccaggca gggtgcatca ctccattgag gttgtgcccg 7020
 ttttttgcc tttgtgccc ctgttctctg tagttgcgct aagagaatgg acctatgaac 7080
 tgatgggttg tgaagaaaac aatatttttg tgctgggatt cttttttttt ctggatgcca 7140
 gcttaaaaag cgggctccat tatatttagt ggatgccagg aataaactgt tcacccagac 7200
 acctacgatg ttatatattc tgtgtaaccc gccccctatt ttgggcattg acgggttaca 7260
 gcagaattaa aaggctaatt ttttgactaa ataaagttag gaaaatcact actattaatt 7320
 atttacgat tctttgaaat ggcagtattg ataagtataa actcgaactg aaaaagcgtg 7380
 ttttttattc aaaatgattc taactccctt acgtaataca ggaatctttt tgccttgccc 7440
 tccgcgtcat taaacttctt gttgtgacg ctaacattca acgctagtat atattcgttt 7500
 ttttcaggta agttcttttc aacgggtctt actgatgagg cagtcgcgtc tgaaagggtc 7560
 gccggcgttg gacgagcgtg taccaacctg catttctttc cgtcatatac acaaaatact 7620
 ttcatataaa cttacttggg cttacgtcat aaataaatat gtatacatat aaattaaaaa 7680
 atttggtttt atattttttac aaaaagaatc gtttacttca tttctccctt ttaagcgata 7740
 caatccatga aaaaagagaa aaagagagaa caggcttgtg ccttctttta aacatccac 7800
 acaaaatcat attgaattga attttacatc ttaagctagt gtacaacaac tgctatatcc 7860
 aaagaaaact aacgtggacc gcttttagag ttgagaaaaa ggtttgaaaa aaatagcaat 7920
 acaaagactt gtttcatata taaaatacag ggagcacatt gagctaatat aacataaaca 7980
 ctgcgaacca attccaatca aaaggtagac atgagagcat tcccccgagt actgccattt 8040
 cgccatcaga gatcatataa taacatcctt cttcgaacgg cggtttaaac gcgtggccgt 8100
 gccgtc 8106

<210> 47
 <211> 2404
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética: construcción de integración i76220

<400> 47

gacggcaagg ccacgcgttt aaaccgcgc acgtgtatgt acggctgtgt aaatatgata 60
 atcatctcgg acgaacggcg tagtactctc catcccctaa aaatgttcac gtgtgactgc 120
 tccatttgcg cggatgtcga gatgaccccc cccoctcaa aggcaactcac ctgctgacat 180
 gcogtggcaa atgattgggg tcatcctttt tttctgttat ctctaagatc caaagaaaag 240
 taaaaaaaaa aggttggggt acgaattgcc gccgagcctc cgatgccatt attcaatggg 300
 tattgcagtt ggggtatagt tcctcgggtg caaatagttc tcccttcatt ttgtatataa 360
 actgggcggc tattctaagc atatttctcc cttagggttat ctggtagtac gttatatctt 420

gttcttatat tttctatcta taagcaaaac caaacatatc aaaactacta gaaagacatt	480
gccccactgt gttcgctcgt ccaacgccgg cggacotttc tcgacgtggg cctttttctt	540
gccatatgga tccgctgcac ggtcctgttc cctagcatgt acgtgagcgt atttcctttt	600
aaaccacgac gctttgtctt cattcaacgt ttcccattgt tttttctac tattgctttg	660
ctgtgggaaa aacttatcga aagatgacga ctttttctta attctcgttt taagagcttg	720
gtgagcgcta ggagtcactg ccaggtatcg tttgaacacg gcattagtca gggaagtcac	780
aacacagtcc tttcccgcaa ttttcttttt ctattactct tggcctctc tagtacactc	840
tatatTTTTT tatgcctcgg taatgatttt catttttttt tttccaccta gcggatgact	900
cttttttttt cttagcgatt ggcattatca cataatgaat tatacattat ataaagtaat	960
gtgatttctt cgaagaatat actaaaaaat gagcaggcaa gataaacgaa ggcaaagatg	1020
acagagcaga aagccctagt aaagcgtatt acaaatgaaa ccaagattca gattgcgac	1080
tctttaaaagg gtggtccctt agcgatagag cactcgatct tcccagaaaa agaggcagaa	1140
gcagtagcag aacaggccac acaatcgcaa gtgattaacg tccacacagg tatagggttt	1200
ctggaccata tgatacatgc tctggccaag cattccggct ggtcgctaata cgttgagtgc	1260
attggtgact tacacataga cgaccatcac accactgaag actgcgggat tgctctcgg	1320
caagctttta aagaggccct aggggccgtg cgtggagtaa aaaggtttg atcaggattt	1380
gcgccttttg atgaggcact ttccagagcg gtggtagatc tttcgaacag gccgtacgca	1440
gttgctgaac ttggtttgca aaggagaaa gtaggagatc tctcttgca gatgatcccg	1500
cattttcttg aaagctttgc agaggctagc agaattacc tccaogttga ttgtctgca	1560
ggcaagaatg atcatcaccg tagtgagagt gcgttcaagg ctcttgcggt tgccataaga	1620
gaagccacct cgcccaatgg taccaacgat gtccctcca ccaaagggtg tcttatgtag	1680
tgacacgat tatTTTaaagc tgcagcatc gatatatata catgtgtata tatgtatacc	1740
tatgaatgtc agtaagtatg tatacgaaca gtatgatact gaagatgaca aggtaatgca	1800
tcattctata cgtgtcattc tgaacgaggc gcgctttcct tttttcttt tgctttttct	1860
ttttttttct cttgaactcg aggtccgccg gcgttggaag agcgtgatga tttctttcct	1920
ttttatattg acgacttttt ttttttcgtg tgtttttggt ctcttataac cgagctgctt	1980
acttattatt atttcacctt ctctttttat ttatacttat aattatttat tctttacata	2040
ctgttacaag aaactctttt ctacattaat tgcataaagt gtcaatcagc acatcctcta	2100
tatcgctatc aacaacaaat ttgacaaacc tgcctatatc ttcaggaaca actgccgcat	2160
cgctaccacc actacttggtg aagtccttg agtttaatat gcactgaaat ttacctagcc	2220
gttttacaca agaccataat ccatccatgc tatcgcagta tatgattttg tggtcgtttt	2280

ES 2 628 847 T3

tcgtcttgcg aaagggcatcc tcaatggcctt gtttcattga tccatcagtg tggctcgtag	2340
gtaccagcaa aaccacttca tcagcggcgt actcctggcg gtttaaaccgc gtggccgtgc	2400
cgtc	2404

<210> 48
 <211> 8536
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética: construcción de integración i73830

<400> 48

gacggcacgg ccacgcgttt aaaccggcac ccagccaagg tagtctaaaa gctaatttct	60
ctaaaaggga gaaagttggt gattttttat ctgcgattat tatatatgca agaatagtta	120
aggtatagtt ataaagtttt atcttaattg ccacatacgt acattgacac gtagaaggac	180
tccattattt ttttcattct agcatactat tattccttgt aacgtcccag agtattccat	240
ttaattgtcc tccatttctt aacgggtgacg aaggatcacc atacaacaac tactaaagat	300
tatagtacac tctcaccttg caactattta tctgacattt gccttacttt tatctccagc	360
ttcccctcga ttttattttt caatttgatt tctaaagctt tttgcttagg cataccaaac	420
catccactca tttaacacct tatttttttt ttcgaagaca gcatccaact ttatacgttc	480
actacctttt tttttacaac aatttcattc ttcacacctat gaacgctcgt ccaacgcggg	540
cggacctttc agacgcgact gcctcatcag taagaccggt tgaaaagaac ttacctgaaa	600
aaaacgaata tatactagcg ttgaatgtta gcgtcaacaa caagaagttt aatgacgcgg	660
aggccaaggc aaaaagattc cttgattacg taagggagtt agaatacattt tgaataaaaa	720
acacgcctttt tcagttcgag tttatcatta tcaatactgc catttcaaag aatacgtaaa	780
taattaatag tagtgatttt cctaacttta tttagtcaaa aaattagcct ttttaattctg	840
ctgtaaccgg tacatgccca aaataggggg cgggttacac agaataatata acatcgtagg	900
tgtctgggtg aacagtttat tcctggcatc cactaaatat aatggagccc gctttttaag	960
ctggcatcca gaaaaaaaaa gaatcccagc accaaaatat tgttttcttc accaaccatc	1020
agttcatagg tccattctct tagcgcaact acagagaaca ggggcacaaa caggcaaaaa	1080
acgggcacaa cctcaatgga gtgatgcaac ctgcctggag taaatgatga cacaaggcaa	1140
ttgaccacag catgtatcta tctcattttc ttacaccttc tattaccttc tgctctctct	1200
gatttggaag aagctgaaaa aaaagggtga aaccagttcc ctgaaattat tcccctactt	1260
gactaataag tatataaaga cggtaggtat tgattgtaat tctgtaaatc tatttcttaa	1320
acttcttaaa ttctactttt atagttagtc ttttttttag ttttaaaaca ccaagaactt	1380
agtttcgacc tcccgcgacc tccaaaatcg aactaccttc acaatggctg atttcgattc	1440

taaagaatac	ttggagttag	ttgacaagtg	gtggcgtgcc	accaactact	tgtccgctgg	1500
tatgattttc	ttgaagtcca	accattatt	ctctgttact	aataccccaa	tcaaggccga	1560
agatgtcaaa	gttaaaccaa	ttggtcactg	gggtactatt	tccggtcaaa	ctttcttata	1620
cgcccaogct	aacogtttga	ttaacaagta	cggctctaac	atgttttacg	ttggtgggtcc	1680
aggtaacoggt	ggtaagtc	tggttactaa	cgcctactta	gacgggtgcct	acaccgaaga	1740
ttaccagaa	attactcaag	acatcgaagg	tatgtctcat	ttgttcaagc	gtttctcttt	1800
ccctgggtgg	attggttccc	atatgaccgc	tcaaactcca	ggttccttgc	acgaaggtgg	1860
tgaattgggt	tactctttgt	cccatgcttt	cgggtgctgtt	ttggacaacc	cagaccaagt	1920
tgcttttgct	gtcgttgggtg	atggtgaagc	tgaaactgggt	ccatctatgg	cctcttggtca	1980
ttccattaag	ttcttaaagt	ccaagaacga	tggtgccgtt	ttgccagttt	tggttttaa	2040
cggtttcaag	atttccaatc	caaccatttt	ttctagaatg	tctgatgaag	aaattactaa	2100
gttcttcgaa	ggtttgggtt	attcccctag	attcattgaa	aatgatgaca	ttcacgacta	2160
cgccacctac	caccaattgg	cgcctaacat	cttagatcaa	gccatcgaag	acattcaagc	2220
tattcaaaat	gacgccagag	agaatggtaa	atatcaagat	ggtgaaattc	cagcttggtcc	2280
tgttattatc	gctagattgc	caaaggggtg	gggtgggtcca	accacgatg	cttctaataa	2340
tccaattgaa	aactctttca	gagctcacca	agttccatta	ccattggaac	aacacgattt	2400
ggccaccttg	ccagaattcg	aagattggat	gaactcttac	aagccagaag	aattattcaa	2460
ogctgatgg	tccttgaagg	atgagttgaa	agctattgcc	ccaaaggggtg	ataagagaat	2520
gtctgctaac	ccaatcacca	acggtgggtgc	tgacagatcc	gacttgaaat	tgccaaattg	2580
gagagaattc	gctaacgaca	tcaacgacga	taccagaggt	aaggaattcg	ctgactctaa	2640
gagaaacatg	gatattggcta	ctttatccaa	ctatttaggt	gccgtttctc	aattgaaccc	2700
aaccagattc	agattcttcg	gtccagatga	aaccatgtcc	aacagattgt	gggggttgtt	2760
taatgttacc	ccacgtcaat	ggatggaaga	aatcaaggaa	ccacaagatc	aattgttgctc	2820
tccaactgg	cgtatcatcg	attcccaatt	gtctgaacac	caagctgaag	gttggttgga	2880
aggttacact	ttgactggta	gagttgggtat	ctttgcctct	tacgaatctt	tcttgagagt	2940
tggtgatacc	atggtaactc	aacatttcaa	gtgggtgcgt	cacgcttccg	aacaagcttg	3000
gagaaatgac	tatccatcct	taaatttgat	cgctacctct	accgctttcc	aacaagatca	3060
taacggttat	actcaccaag	accctgggtat	gttaactcat	ttggccgaga	agaagtctaa	3120
cttcattaga	gaatatattgc	cagccgacgg	taactctttg	ttagccgttc	aagagagagc	3180
tttctctgaa	agacataagg	ttaacttatt	gatcgcttct	aaacaaccaa	gacaacaatg	3240
gttcaactgt	gaagaagctg	aagtcttagc	taacgaaggt	ttgaagatta	tcgattgggc	3300

ttctactgct ccatcttcog atgttgatat tacttttgct tctgccggta ctgaaccaac	3360
cattgagact ttggccgcct tatggttgat taatcaagct ttccctgacg ttaagtttag	3420
atacgttaac gttgttgaat tgtaagatt gcaaaagaaa tctgaaccaa acatgaacga	3480
cgaaagagaa ttatctgccg aagaatttaa taagtacttc caagccgaca ctccagttat	3540
cttcggtttc cacgcttacg aaaacttgat tgaatcttcc tttttcgaga gaaagttcac	3600
cggtgatgtc tatgttcacg gttatagaga agatggtgat atcactacca cctacgatat	3660
gagagtctat tcccacttgg atcgtttcca tcaagccaag gaagccgccg aaatcttgtc	3720
tgctaacggt aaaatcgacc aagccgctgc cgacaccttt attgctaaga tggacgacac	3780
tttgccaaa cacttccaag ttactagaaa tgaaggtaga gatattgaag aattcactga	3840
ctggacttgg tctccattga agtaagtga tttacttta atcttgcat taaataaatt	3900
ttctttttat agctttatga cttagtttca atttatatac tattttaatg acattttcga	3960
ttcattgatt gaaagctttg tgtttttct tgatgogcta ttgcattgtt cttgtctttt	4020
tgcgccacatg taatatctgt agtagatacc tgatacattg tggatgctga gtgaaatttt	4080
agttaataat ggagcgctc ttaataattt tggggatatt ggcttatccc cgcgtgcttg	4140
gccggccgta cgaaaatcgt tattgtcttg aaggtgaaat ttctactctt attaatggtg	4200
aacgttaagc tgatgctatg atggaagctg attggtctta acttgcttgt catcttgcta	4260
atggtcattg gctcgtgtta ttacttaagt tatttgact cgttttgaac gtaatgctaa	4320
tgatcatctt atggaataat agtgagtgg ttcagggtcc ataaagcttt tcaattcatc	4380
ttttttttt ttgttctttt ttttgattcc ggtttctttg aaattttttt gattcggtaa	4440
tctccgagca gaaggaagaa cgaaggaagg agcacagact tagattggtat tatatacgca	4500
tatgtgggtg tgaagaaaca tgaattgcc cagtattctt aacccaactg cacagaacaa	4560
aaacctgcag gaaacgaaga taaatcatgt cgaaagctac atataaggaa cgtgctgcta	4620
ctcatcctag tcctgttgct gccaaagctat ttaatatcat gcacgaaaag caaacaact	4680
tgtgtgcttc attggatgtt cgtaccacca aggaattact ggagttagtt gaagcattag	4740
gtcccaaaat ttgtttacta aaaacacatg tggatatctt gactgatttt tccatggagg	4800
gcacagttaa gccgctaaag gcattatccg ccaagtacaa ttttttactc ttcgaagaca	4860
gaaaatttgc tgacattgggt aatacagtca aattgcagta ctctgcgggt gtatacagaa	4920
tagcagaatg ggcagacatt acgaatgcac acggtgtggg gggcccagggt attgttagcg	4980
gtttgaagca ggcggcggaa gaagtaacaa aggaacctag aggccttttg atgttagcag	5040
aattgtcatg caagggctcc ctagctactg gagaatatac taagggtact gttgacattg	5100
cgaagagtga caaagatttt gttatcggct ttattgctca aagagacatg ggtggaagag	5160
atgaagggtta cgattgggtg attatgacac ccggtgtggg tttagatgac aaggagagcg	5220

cattgggtca acagtataga accgtggatg atgtgggtctc tacaggatct gacattatta	5280
ttgttggaag aggactatctt gcaaagggaa gggatgctaa ggtagagggg gaacgttaca	5340
gaaaagcagg ctgggaagca tatttgagaa gatgcggcca gcaaaactaa aaaactgtat	5400
tataagtaaa tgcatgtata ctaaactcac aaattagagc ttcaatttaa ttatatcagt	5460
tattaccacg aaaatcgtta ttgtcttgaa ggtgaaatct ctactcttat taatggtgaa	5520
cgttaagctg atgctatgat ggaagctgat tggctctaac ttgcttgctc tcttgctaata	5580
ggcatatgg ctctgttat tacttaagtt atttgctactc gttttgaacg taatgctaata	5640
gatcatctta tgggaataata gtgaacggcc ggccaagcac gcgggggatgg gatgagcttg	5700
gagcaggaag aatacactat actggatcta aagagtacaa tagatggata agaataattgg	5760
cagcgcaaaa aggcttcaag cttacacaac acggtttatt tcgaaataat atccttctcg	5820
aaagctttta cgaacgcaga attttcgagt tattaactct aaaatacgtc gaacccgaac	5880
atagaaatat cgaatgggaa aaaaaaactg cataaaggca ttaaaagagg agcgaatctt	5940
tttttaataa aaatcttaata aatcattaaa agataaataa tagtctatat atacgtatat	6000
aaataaaaaa tattcaaaaa ataaaaataa ctattatctt agcgtaaagg atggggaaag	6060
agaaaagaaa aaaattgatc tatcgatttc aattcaattc aatagatctt tatccttggtg	6120
cttgtgcctg aactgcggta acggcaacaa ctttgacgat gtcgtcgact gaacatcccc	6180
ttgacaaatc gttgataggt ttggcaaatc cctgacatat aggacgatg gcttcggcct	6240
ttgcgaatct ttggaccaac ttgtatccga tgtttcctgc ctggatgtct gggaagatca	6300
agacatttgc cttaccagcg acttttagatc caggggcttt caaatctgcg accttcttaa	6360
ccaatgaggc gtctaactgc aattcacctg cgatgtctaa gtcaggccta gcctccttag	6420
ccaattttgt tgcccttgta accttgctga ctaattcatg tgaggctgat cccatgggtg	6480
agaatgacaa catggctacc cttggctcga tcttgacaaa attctttgca gtctcagcag	6540
tggttaattgc gattgaagat aactcttcag cggtaggaca aacatttaca gcgcagtcag	6600
cgaataacaa aaaaccgtcc tctccatact cgcagtcagg tactgacatc aagaagactg	6660
atgagacgac agatgcacct ggtactgttt tgacaatctg caaaccaggc cttacaagt	6720
ctcctgtagt atgtatagca ccagatacca aaccgtcagc gtcacctaac ttgaccatca	6780
ttgttgcgaa gtagattggg tccctgacga ttttgctcagc cttctccaag gtgactccct	6840
tgttttttct gatctcgtag aaagcggttg cgtaaccggc ggtcttagaa gaagtttctg	6900
ggctgactat ctctactccg gccaaattta ctccgaatct tgccggcgttt tccttaatga	6960
cagactctga accgaccaag attatgtcgg caataaccgtc cctaataatc tcctctgaag	7020
ccctgatgtt cctctcttcc tcaccctctg ccaaaacgat tttcttcttg tcggccttgg	7080

ccaatccgaa gatattctcc atcaatttca ttgtgaaggt agttcgattt tggaggtcgc 7140
 gggaggtcga aactaagttc ttggtgtttt aaaactaaaa aaaagactaa ctataaaaagt 7200
 agaatttaag aagtttaaga aatagattta cagaattaca atcaatacct accgtcttta 7260
 tatacttatt agtcaagtag gggaataatt tcagggaact ggtttcaacc ttttttttca 7320
 gctttttcca aatcagagag agcagaaggt aatagaaggt gtaagaaaat gagatagata 7380
 catgcgtggg tcaattgcct tgtgtcatca tttactccag gcaggttgca tcaactcatt 7440
 gaggttggtc ccggtttttt cctgtttgtg cccctgttct ctgtagttgc gctaagagaa 7500
 tggacctatg aactgatggt tgggtgaagaa aacaatattt tgggtgctggg attctttttt 7560
 tttctggatg ccagcttaaa aagcgggctc cattatatatt agtggatgcc aggaataaac 7620
 tgttcaccca gacacctacg atgttatata ttctgtgtaa cccgccccct attttgggca 7680
 tgtacgggtt acagcagaat taaaaggcta attttttgac taaataaagt taggaaaatc 7740
 actactatta attatttacg tattctttga aatggcagta ttgataatga taaactcgaa 7800
 ctgaaaaagc gtgtttttta ttcaaaatga ttctaactcc cttacgtaat caaggaatct 7860
 ttttgccttg gcctccgctt cattaaactt cttgttggtg acgctaacat tcaacgctag 7920
 tataatattc tttttttcag gtaagttctt ttcaacgggt cttactgatg aggcatcgc 7980
 gtctgaaagg tccgcggcg ttggacgagc gctccatgct ggacttactc gtcgaagatt 8040
 tcctgctact ctctatataa ttagacaccc atgttataga tttcagaaaa caatgtaata 8100
 atatatggta gcctcctgaa actaccaagg gaaaaatctc aacaccaaga gctcatattc 8160
 gttggaatag cgataatatc tctttacctc aatcttatat gcatgttatt tgctcttata 8220
 attggtctct atttagggaa aaaagtcggt ttgagagctt ctgcgatgt gaaatctcaa 8280
 tttgaactgc acgcaaagc tagccattt cacgaacacc agaaagaaga aatccccaag 8340
 gatcgcatga cagagtatgc tctctcatat cgttgagtat gaatgccaat aactgatca 8400
 gctttacaag aaacgtaaaa tctggcacga tggtagactg aaatactttc agttaaacia 8460
 cagattcatg ctttatacgg aaaaggataa cgttttggtt gctagtgagg cggtttaaac 8520
 gcgtggccgt gccgtc 8536

<210> 49
 <211> 9734
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética: construcción de integración i74810
 <400> 49

gacggcacgg ccacgcgttt aaaccgcccg ctgcctcat cccacggga ataaggcagc 60
 cgacaaaaga aaaacgaccg aaaaggaacc agaaagaaaa aagaggggtg gcgcgccgcg 120

gacgtgtaaa aagatatgca tccagcttct atategcttt aactttaccg ttttgggcat 180
 cgggaacgta tgtaacattg atctcctctt gggaacggtg agtgcaacga atgcgatata 240
 gcaccgacca tgtgggcaaa ttcgtaataa attcgggggtg agggggattc aagacaagca 300
 accttgtttag tcagctcaaa cagcgattta acggttgagt aacacatcaa aacaccgttc 360
 gaggtcaagc ctggcgtggt taacaagttc ttgatatcat atataaatgt aataagaagt 420
 ttggtaatat tcaattcgaa gtgttcagtc ttttacttct cttgttttat agaagaaaaa 480
 acatcaagaa acatctttta catacacaaa cacatactat cagaatacac gctcgtccaa 540
 cggcggcgga cctttcagac gcgactgcct catcagtaag acccgttgaa aagaacttac 600
 ctgaaaaaaa cgaatatata ctacggttga atgttagcgt caacaacaag aagtttaagt 660
 acgcgaggag caaggcaaaa agattccttg attacgtaag ggagttagaa tcattttgaa 720
 taaaaaacac gctttttcag ttcgagttta tcattatcaa tactgccatt tcaaagaata 780
 cgtaaataat taatagtagt gattttccta actttattta gtcaaaaaat tagcctttta 840
 attctgctgt aacccgtaaa tgcccaaaat agggggcggg ttacacagaa tatataacat 900
 cgtaggtgtc tgggtgaaca gtttattcct ggcatccact aaatataatg gagcccgctt 960
 ttttagctgg catccagaaa aaaaaagaat cccagcacca aaatattggt ttcttcacca 1020
 accatcagtt cataggtcca ttctcttagc gcaactacag agaacagggg cacaacaggg 1080
 caaaaaacgg gcacaacctc aatggagtga tgcaacctgc ctggagtaaa tgatgacaca 1140
 aggcaattga cccacgcatg tatctatctc attttcttac accttctatt accttctgct 1200
 ctctctgatt tggaaaaagc tgaaaaaaa gggtgaaacc agttccctga aattattccc 1260
 ctacttgact aataagtata taaagacggg aggtattgat tgtaattctg taaatctatt 1320
 tcttaaaactt cttaaattct acttttatag ttagtctttt ttttagtttt aaaacaccaa 1380
 gaacttagtt tcgacctccc gcgacctcca aaatcgaact accttcacaa tggctgattt 1440
 cgattctaaa gaatacttgg agttagttga caagtgggtg cgtgccacca actacttgct 1500
 cgctgggtatg attttcttga agtccaacct attattctct gttactaata cccaatcaa 1560
 ggccgaagat gtcaaagtta aaccaattgg tcaactgggt actatttccg gtcaaacttt 1620
 cttatacgcc cagcctaacc gtttgattaa caagtacggg ctcaacatgt ttacggttg 1680
 tgggtccaggt caggtgggtc aagtcaggtt tactaacgcc tacttagacg gtgcctacac 1740
 cgaagattac ccagaaatta ctcaagacat cgaaggtatg tctcatttgt tcaagcgttt 1800
 ctctttccct ggtggtattg gttcccatat gaccgctcaa actccaggtt ccttgcacga 1860
 aggtgggtgaa ttgggttaact ctttgtccca tgctttcggt gctgttttgg acaaccaga 1920
 ccaagttgct tttgctgtcg ttggtgatgg tgaagctgaa actggtccat ctatggcctc 1980

ttggcattcc	attaagttct	taaatgccaa	gaacgatggt	gccgttttgc	cagtttttga	2040
tttaaacggt	ttcaagattt	ccaatccaac	cattttttct	agaatgtctg	atgaagaaat	2100
tactaagttc	ttcgaagggt	tgggttattc	ccttagattc	attgaaaatg	atgacattca	2160
cgactacgcc	acctaccacc	aattggccgc	taacatctta	gatcaagcca	tcgaagacat	2220
tcaagctatt	caaaatgacg	ccagagagaa	tggtaaatat	caagatggtg	aaattccagc	2280
ttggcctgtt	attatcgcta	gattgccaaa	gggttggggt	ggccaaccc	acgatgcttc	2340
taataatcca	attgaaaact	ctttcagagc	tcaccaagtt	ccattaccat	tggaacaaca	2400
cgatttggcc	accttgccag	aattcgaaga	ttggatgaac	tcttacaagc	cagaagaatt	2460
attcaacgct	gatggttcct	tgaaggatga	gttgaaagct	attgccccaa	agggtgataa	2520
gagaatgtct	gctaacccaa	tcaccaacgg	tgggtgtgac	agatccgact	tgaaattgcc	2580
aaattggaga	gaattcgcta	acgacatcaa	cgacgatacc	agaggttaag	aattcgctga	2640
ctctaagaga	aacatggata	tggctacttt	atccaactat	ttaggtgccg	tttctcaatt	2700
gaaccaacc	agattcagat	tcttcggtcc	agatgaaacc	atgtccaaca	gattgtgggg	2760
tttgtttaat	gttaccacc	gtcaatggat	ggaagaaatc	aaggaaccac	aagatcaatt	2820
gttgtctcca	actggctgta	tcacgattc	ccaattgtct	gaacaccaag	ctgaagggtg	2880
gttgaagggt	tacactttga	ctggtagagt	tggatatctt	gctcttacg	aatctttctt	2940
gagagtgtgt	gataccatgg	tcactcaaca	tttcaagtgg	ttgcgtcacg	cttcgaaca	3000
agcttgagga	aatgactatc	catccttaaa	tttgatcgct	acctctaccg	ctttccaaca	3060
agatcataac	ggttatactc	accaagaccc	tggatatgta	actcatttgg	cogagaagaa	3120
gtctaacttc	attagagaat	atgtgccagc	cgacggtaac	tctttgttag	cgtttcaaga	3180
gagagctttc	tctgaaagac	ataaggttaa	cttattgatc	gcttctaaac	aaccaagaca	3240
acaatgggtc	actgttgaag	aagctgaagt	cttagctaac	gaaggtttga	agattatcga	3300
ttgggcttct	actgctccat	cttcgatgt	tgatattact	tttgcttctg	cgggtactga	3360
accaaccatt	gagactttgg	cgccttatg	gttgattaat	caagctttcc	ctgacgttaa	3420
gtttagatac	gttaacgttg	ttgaattgtt	aagattgcaa	aagaaatctg	aaccaaaccat	3480
gaacgacgaa	agagaattat	ctgccgaaga	atttaataag	tacttccaag	cgcacactcc	3540
agttatcttc	ggtttccacg	cttacgaaaa	cttgattgaa	tctttctttt	tcgagagaaa	3600
gttcaccggt	gatgtctatg	ttcacggtta	tagagaagat	ggatgatatca	ctaccacctta	3660
cgatatgaga	gtctattccc	acttgatcg	tttccatcaa	gccaaggaag	cgcgcgaaat	3720
cttgtctgct	aacggtaaaa	tcgaccaagc	cgctgccgac	acctttattg	ctaagatgga	3780
cgacactttg	gccaacact	tccaagttac	tagaaatgaa	ggtagagata	ttgaagaatt	3840
cactgactgg	acttggcttc	cattgaagta	agtgaattta	ctttaaatct	tgcatttaaa	3900

taaatthttct	ttttatagct	ttatgactta	gtttcaatth	atatactatt	ttaatgacat	3960
tttcgattca	ttgattgaaa	gctttgtgtt	ttttcttgat	gcgctattgc	attgttcttg	4020
tctttttcgc	cacatgtaat	atctgtagta	gatacctgat	acattgtgga	tgctgagtga	4080
aatthttagtt	aataatggag	gcgctcttaa	taatthttggg	gatattggct	tatccccgcg	4140
tgcttgggccg	gccgtacact	gagtaatggg	agttataaga	aagagaccga	gttagggaca	4200
gttagaggcg	gtggagatat	tccttatggc	atgtctggcg	atgataaaac	ttttcaaacg	4260
gcagccccga	tctaaaagag	ctgacaggga	aatggctcaga	aaaagaaaacg	tgacccccgc	4320
cgtctggacg	cgcgcctcac	ccgcacggca	gagaccaatc	agtaaaaatc	aacgggttaac	4380
gacattacta	tatatataat	ataggaagca	tttaatagaa	cagcatcgta	atatatgtgt	4440
actttgcagt	tatgacgcca	gatggcagta	gtggaagata	ttctttattg	aaaaatagct	4500
gtgcacctta	cgtacaatct	tgatccggag	cttttctttt	tttgccgatt	aagaattcgg	4560
tcgaaaaaag	aaaaggagag	ggccaagagg	gagggcattg	gtgactattg	agcacgtgag	4620
tatacgtgat	taagcacaca	aaggcagctt	ggagtatgtc	tgttattaat	ttcacaggta	4680
gttctgggtcc	attgggtgaa	gtttgctggc	tgacagacac	agaggccgca	gaatgtgctc	4740
tagattccga	tgctgacttg	ctgggtatta	tatgtgtgcc	caatagaaaag	agaacaattg	4800
acccgggttat	tgcaaggaaa	atttcaagtc	ttgtaaaagc	atataaaaat	agttcaggca	4860
ctccgaaata	cttggttggc	gtgtttcgtg	atcaacctaa	ggaggatgtt	ttggctctgg	4920
tcaatgatta	cggcattgat	atcgtccaac	tgcatggaga	tgagtcgtgg	caagaatacc	4980
aagagttcct	cggtttgcca	gttattaaaa	gactcgtatt	tccaaaagac	tgcaacatac	5040
tactcagtgc	agcttcacag	aaacctcatt	cgtttattcc	cttggttgat	tcagaagcag	5100
gtgggacagg	tgaacttttg	gattggaact	cgatttctga	ctgggttgga	aggcaagaga	5160
gccccgaaag	cttacatttt	atgttagctg	gtggactgac	gccagaaaat	gttggtgatg	5220
cgttagatt	aatggcggtt	attgggtgtg	atgtaagcgg	aggtgtggag	acaaatgggtg	5280
taaaagactc	taacaaaata	gcaaatttcg	tcaaaaatgc	taagaaatag	gttattactg	5340
agtagtattt	atttaagtat	tgtttggtga	cttgccctgca	ggccttttga	aaagcaagca	5400
taaaagatct	aaacataaaa	tctgtaaaat	aacaagatgt	aaagataatg	ctaaatcatt	5460
tggtcttttg	attgattgta	caggaaaata	tacatcgacg	gggggttgact	tttaccattt	5520
caccgcaatg	gaatcaaact	tggtgaagag	aatgttcaca	ggcgcatacg	ctacaatgac	5580
acggccggcc	aagcacgcgg	ggataagcca	atatcccaa	aattattaag	agcgctcca	5640
ttatttaacta	aaatttcact	cagcatccac	aatgtatcag	gtatctacta	cagatattac	5700
atgtggcgaa	aaagacaaga	acaatgcaat	agcgcatcaa	gaaaaaacac	aaagctttca	5760

atcaatgaat cgaaaatgtc attaaaatag tatataaatt gaaactaagt cataaagcta	5820
taaaaagaaa atttatttaa atgcaagatt taaagtaaatt tcacttactt caatggagac	5880
caagtccagt cagtgaattc ttcaatatct ctaccttcat ttctagtaac ttggaagtgt	5940
ttggccaaag tgtcgtccat cttagcaata aaggtgtcgg cagcggcttg gtcgatttta	6000
ccgttagcag acaagatttc ggcggcttcc ttggcttgat ggaaacgac caagtgggaa	6060
tagactctca tatcgttagt ggtagtata tcaccatctt ctctataacc gtgaacatag	6120
acatcacccg tgaactttct ctcgaaaaag aaagattcaa tcaagttttc gtaagcgtgg	6180
aaaccgaaga taactggagt gtcggcttgg aagtacttat taaattcttc ggcagataat	6240
tctctttcgt cgttcatgtt tgggtcagat ttcttttgca atcttaacaa ttcaacaacg	6300
ttaacgtatc taaacttaac gtcagggaaa gcttgattaa tcaaccataa ggccggccaaa	6360
gtctcaatgg ttggttcagt accggcagaa gcaaaagtaa tatcaacatc ggaagatgga	6420
gcagtagaag cccaatcgat aatcttcaaa ccttcgttag ctaagacttc agcttcttca	6480
acagtgaacc attgttgtct tggttgttta gaagcgatca ataagttaac cttatgtctt	6540
tcagagaaaag ctctctcttg aacggctaac aaagagttac cgtcggcttg caaatattct	6600
ctaatgaagt tagacttctt ctcgcccaaa tgagttaaca taccagggtc ttggtgagta	6660
taaccgttat gatcttggtt gaaagcggta gaggtagcga tcaaatttaa ggatggatag	6720
tcatttctcc aagcttggtc ggaagcgtga cgcaaccact tgaaatgttg agtgaccatg	6780
gtatcaacaa ctctcaagaa agattcgtaa gaggcaaaga taccaactct accagtcaaa	6840
gtgtaacctt ccaaccaacc ttcagcttgg tgttcagaca attgggaatc gatgatacga	6900
ccagttggag acaacaattg atcttggtt tccttgattt cttccatcca ttgacgtggg	6960
gtaacattaa acaaacccca caatctgttg gacatgggtt catctggacc gaagaatctg	7020
aatctgggtt ggttcaattg agaaacggca cctaaatagt tggataaagt agccatatcc	7080
atgtttctct tagagtcagc gaattcctta cctctggtat cgtcgttgat gtcgttagcg	7140
aattctctcc aatttgcaa tttcaagtcg gatctgtcag caccaccgtt ggtgattggg	7200
ttagcagaca ttctcttatc accctttggg gcaatagctt tcaactcatc cttcaaggaa	7260
ccatcagcgt tgaataattc ttctggcttg taagagttca tccaatcttc gaattctggc	7320
aaggtggcca aatcgtgttg ttccaatggt aatggaactt ggtgagctct gaaagagttt	7380
tcaattggat tattagaagc atcgtgggtt ggaccacccc aaccctttgg caatctagcg	7440
ataataacag gccaaagctg aatttcacca tcttgatatt taccattctc tctggcgtca	7500
ttttgaatag cttgaatgtc ttcgatggct tgatctaaga tgttagcggc caattgggtg	7560
taggtggcgt agtcgtgaat gtcacatctt tcaatgaatc taggggaata acccaaacct	7620
tcgaagaact tagtaatttc ttcacagac attctagaaa aaatgggttg attggaaatc	7680

ttgaaaccgt ttaaattccaa aactggcaaa acggcaccat cgttcttggc atttaagaac	7740
ttaatggaat gccaaagaggc catagatgga ccagtttcag cttcaccatc accaacgaca	7800
gcaaaagcaa cttggtctgg gttgtccaaa acagcaccga aagcatggga caaagagtaa	7860
cccaattcac caccttcgtg caaggaacct ggagtttgag cggtcatatg ggaaccaata	7920
ccaccaggga aagagaaacg cttgaacaaa tgagacatac cttcgatgtc ttgagtaatt	7980
tctgggtaat cttcgggtga ggcaccgtct aagtaggcgt tagtaaccat gacttgacca	8040
ccgtgacctg gaccaccaac gtaaaacatg ttgagaccgt acttgtaaat caaacggta	8100
gcgtgggcgt ataagaaagt ttgaccggaa atagtacccc agtgaccaat tggtttaact	8160
ttgacatctt cggccttgat tgggggtatta gtaacagaga ataatgggtt ggacttcaag	8220
aaaatcatac cagcggacaa gtagttgggtg gcacgccacc acttgtcaac taactccaag	8280
tattcttttag aatcgaaatc agccattgtg aaggtagttc gattttggag gtcgcgggag	8340
gtcgaaacta agttcttgggt gttttaaaac taaaaaaaag actaactata aaagtagaat	8400
ttaagaagtt taagaaatag atttacagaa ttacaatcaa tacctaccgt ctttatatac	8460
ttattagtca agtaggggaa taatttcagg gaactgggtt caaccttttt tttcagcttt	8520
ttccaaatca gagagagcag aaggtaatag aaggtgtaag aaaatgagat agatacatgc	8580
gtgggtcaat tgcccttgtgt catcatttac tccaggcagg ttgcatcact ccattgaggt	8640
tgtgcccggt ttttgccctgt ttgtgccctt gttctctgta gttgcgctaa gagaatggac	8700
ctatgaactg atggttggtg aagaaaacaa tattttggtg ctgggattct tttttttct	8760
ggatgccagc ttaaaaagcg ggctccatta tatttagtgg atgccaggaa taaactgttc	8820
accagacac ctacgatgtt atatattctg tgtaaccgcg cccctatfff gggcatgtac	8880
gggttacagc agaattaaaa ggctaatttt ttgactaaat aaagttagga aaatcactac	8940
tattaattat ttacgtattc tttgaaatgg cagtattgat aatgataaac tcgaactgaa	9000
aaagcgtgtt ttttattcaa aatgattcta actcccttac gtaatcaagg aatctttttg	9060
ccttggcctc cgcgtcatta aacttcttgt tgttgacgct aacattcaac gctagtatat	9120
attcgttttt ttcaggtaag ttcttttcaa cgggtcttac tgatgaggca gtcgcgtctg	9180
aaaggtccgc cggcgttgga cgagcgtgta ccaacctgca tttctttcog tcatatacac	9240
aaaatacttt catataaact tacttgggtct tacgtcataa ataaatatgt atacatataa	9300
attaaaaaat ttgggttttat attttttcaa aaagaatcgt ttacttcatt tctccctttt	9360
aagcgataca atccatgaaa aaagagaaaa agagagaaca ggcttgtgcc ttctttaaaa	9420
catcccacac aaaatcatat tgaattgaat ttacatctt aagctagtgt acaacaactg	9480
ctatatccaa agaaaactaa cgtggaccgc ttttagagtt gagaaaaagg tttgaaaaaa	9540

ES 2 628 847 T3

atagcaatac aaagacttgt ttcatatata aaatacaggg agcacattga gctaataataa 9600
cataaacact gcgaaccaat tccaatcaaa aggtacacat gagagcattc ccccgagtac 9660
tgccatttcg ccatcagaga tcatataata acatccttct tcgaacggcg gtttaaacgc 9720
gtggccgtgc cgtc 9734

<210> 50
<211> 7980
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcción sintética: construcción de integración i76221
<400> 50

gacggcacgg ccacgcgttt aaaccgccgc acgtgtatgt acggctgtgt aaatatgata 60
atcatctcgg acgaacggcg tagtactctc catcccctaa aaatgttcac gtgtgactgc 120
tccatttcgc cggatgtcga gatgaccccc cccctcaaa aggcactcac ctgctgacat 180
gccgtggcaa atgattgggg tcatcctttt tttctgttat ctctaagatc caaagaaaag 240
taaaaaaaaa aggttggggg acgaattgcc gccgagcctc cgatgccatt attcaatggg 300
tattgcagtt ggggtatagt tcctcgggtg caaatagttc tcccttcatt ttgtatataa 360
actgggcggc tattctaagc atatttctcc cttagggttat ctggtagtac gttatatctt 420
gttcttatat tttctatcta taagcaaac caaacatata aaaactacta gaaagacatt 480
gccccactgt gttcgctcgt ccaacgccgg cggaccttcc agacgcgact gcctcatcag 540
taagacccgt tgaaaagaac ttacctgaaa aaaacgaata tatactagcg ttgaatgtta 600
gcgtcaacaa caagaagttt aatgacgcgg aggccaaaggc aaaaagattc cttgattacg 660
taaggaggtt agaatcattt tgaataaaaa acacgctttt tcagttcgag tttatcatta 720
tcaatactgc catttcaaag aatacgtaaa taattaatag tagtgatttt cctaacttta 780
tttagtcaaa aaattagcct ttttaattctg ctgtaacccg tacatgccc aaataggggg 840
cgggttacac agaatatata acatcgtagg tgtctgggtg aacagtttat tcctggcatc 900
cactaaatat aatggagccc gctttttaag ctggcatcca gaaaaaaaa gaatcccagc 960
acaaaaatat tgttttcttc accaaccatc agttcatagg tccattctct tagcgcaact 1020
acagagaaca ggggcacaaa caggcaaaaa acgggcacaa cctcaatgga gtgatgcaac 1080
ctgcctggag taaatgatga cacaaggcaa ttgaccacg catgtatcta tctcattttc 1140
ttacaccttc tattaccttc tgctctctct gatttggaag aagctgaaaa aaaaggttga 1200
aaccagttcc ctgaaattat tcccctactt gactaataag tatataaaga cggtaggtat 1260
tgattgtaat tctgtaaatc tatttcttaa acttcttaaa ttctactttt atagtttagtc 1320
tttttttttag ttttaaaaca ccaagaactt agtttcgacc tcccgcgacc tccaaaatcg 1380

aactaccttc	acaatggaac	attctgtaat	cgaaccaact	gtgcccacgc	cgctaccagc	1440
catgtttgac	gtcccatctg	gtatttttag	ctctttggac	gacgctgtgc	aagcagccac	1500
cttagcccaa	caacaactaa	gttcagttga	gttgcgtcag	caagtaatca	aagccataag	1560
agtggccgga	gaaaggtatg	cacaagtttt	ggctgaaatg	gcagttgctg	aaactggtat	1620
gggtagggtg	gtggataagt	acattaagaa	tgtctctcaa	gctcgtcata	cgcttggtat	1680
agaatgttta	tcgcccgagg	ttcttacggg	tgataatggc	ctaacattga	ttgaaaatgc	1740
cccttgggga	gtcgtagctt	cagtcacgcc	aagcacaaat	ccagcagcta	cggttaattaa	1800
taatgcaatc	tcaatgattg	cagcggggaa	ttcagtcgtg	ttcgcaccac	atccttctgc	1860
caaaaacgtc	tactaagga	ctatttcttt	actcaacaag	gccattgtcg	ctaccggcgg	1920
cccagaaaat	ttactagtta	gtgtggcaaa	ccctaacatc	gaaactgcac	agagattatt	1980
cagatatccg	ggtattggat	tgtagttgt	gacaggtggt	gaagccgtcg	ttgaagccgc	2040
taggaagcat	acagataaaa	ggttaattgc	agccggcgct	ggtaatcctc	ctgttgttgt	2100
ggacgaaact	gctgacatac	ctaaagccgc	aagagcaatt	gtcaagggtg	cttctttcga	2160
caacaacata	atgtgtgctg	atgaaaaagt	tttgattgtg	gtagacagag	ttgcagatgc	2220
actattggca	gaaatgcaaa	gaaataacgc	cgtcttactt	acaccggaac	agaccgaaag	2280
actactacco	gtctttttgt	cogatatgga	cgaacagggc	aaaggacgtg	tgaatagaga	2340
ttatgttgga	agagatgcgg	ctaaattagc	agcggctatt	ggtctggaag	ttagcgaaca	2400
tactcgtcta	ctcctggcag	agacagacgc	tgatcatcca	ttcgccgtga	cggagctgat	2460
gatgccagtg	ttaccagtaa	taagagtcaa	gaatgtagat	gatgcaatcg	cattggcagt	2520
taagctagag	tcaggctgca	gacacacagc	tgcatgacac	tctactaata	taagaaactt	2580
aaatagaatg	gctaatacca	tcaatacctc	tatctttgta	aaaaatggtc	catgtattgc	2640
aggtttgggt	ttaggcgggtg	aaggttggac	ttcaatgact	attagcactc	cgaccgggtga	2700
agggtgttaca	agcgtcgtga	cctttgtcag	attaagaagg	tgtgtcttag	tcgacatggt	2760
tcggattgct	taagcggccg	cgagtaataa	ttattgcttc	catataatat	ttttatatac	2820
ctcttatttt	tatgtattag	tttaattaagt	atcttttatct	atctgcttat	cattttcttt	2880
tcatataggg	ggggttggtg	ttttcttgcc	catcagattg	atgtcctcca	actcggcact	2940
atttttacaaa	gggttttttt	gtaagagaag	gagaagacag	atactaaacc	atacgttact	3000
cgaacaaaaa	aaaaaaaaaa	tggaaaaagc	tgctatcaac	aaaagacggc	ctcatcaaac	3060
ctaaagaaac	catgtcagcg	tatgtatata	ccttgtaatt	tacgtttcct	taaattctct	3120
ttctactaac	gttttcatta	ttctatactc	tatgaccaat	aaaaacagac	tgtactttca	3180
aaattttacc	agtaggccag	caaataaaga	aaattatacc	agattacttc	tgaacacacat	3240

taatcccaac aacaagtatg ccattaatcc gtcgctaccc catccccgcg tgcttggccg	3300
gccgtttctc gacgtgggccc tttttcttgc catatggatc cgctgcacgg tectgttccc	3360
tagcatgtac gtgagcgtat ttctttttaa accacgacgc tttgtcttca ttcaacgttt	3420
cccattgttt ttttctacta ttgctttgct gtgggaaaaa cttatcgaaa gatgacgact	3480
ttttcttaat tctcgtttta agagcttggt gagcgctagg agtcactgcc aggtatcggt	3540
tgaacacggc attagtcagg gaagtcataa cacagtcctt tcccgcattt ttctttttct	3600
attactcttg gcctcctcta gtacactcta ttttttttta tgccctggta atgattttca	3660
tttttttttt tccacctagc ggatgactct tttttttct tagcgattgg cattatcaca	3720
taatgaatta tacattatat aaagtaatgt gatttcttcg aagaatatac taaaaaatga	3780
gcaggcaaga taaacgaagg caaagatgac agagcagaaa gccctagtaa agcgtattac	3840
aatgaaacc aagattcaga ttgcgatctc tttaaagggt ggtcccctag cgatagagca	3900
ctcgatcttc ccagaaaaag aggcagaagc agtagcagaa caggccacac aatcgcaagt	3960
gattaacgtc cacacaggta tagggtttct ggaccatatg atacatgctc tggccaagca	4020
ttccggctgg tcgctaatac ttgagtgcac ttgtgactta cacatagacg accatcacac	4080
cactgaagac tgccggattg ctctcggtca agctttttaa gaggccctag gggccgtgcg	4140
tggagtaaaa aggtttggat caggatttgc gcctttggat gaggcacttt ccagagcggg	4200
ggtagatctt tcgaacaggc cgtacgcagt tgcgaactt ggtttgcaa gggagaaagt	4260
aggagatctc tcttgcgaga tgatcccgca tttctttgaa agctttgcag aggetagcag	4320
aattaccctc cacgttgatt gtctgcgagg caagaatgat catcacgta gtgagagtgc	4380
gttcaaggct cttgcggttg ccataagaga agccacctcg cccaatggta ccaacgatgt	4440
tccctccacc aaaggtgttc ttatgtagtg acaccgatta tttaaagctg cagcatacga	4500
tatatataca tgtgtatata tgtataccta tgaatgtcag taagtatgta tacgaacagt	4560
atgatactga agatgacaag gtaatgcac attctatacg tgtcattctg aacgaggcgc	4620
gctttccttt tttctttttg ctttttcttt tttttctct tgaactcgac ggccggccaa	4680
gcacgcgggg atggggtagc gacggattaa tggcatactt gttgttgga ttaatgtgtt	4740
tcagaagtaa tctggtataa ttttctttat ttgctggcct actgggtaaa ttttgaaagt	4800
acagtctgtt tttattggtc atagagtata gaataatgaa aacgttagta gaaagaagat	4860
ttaaggaaac gtaaattaca aggtatatac atacgtgac atggtttctt taggtttgat	4920
gaggccgtct tttgttgata gcagcttttt ccattttttt ttttttgtt tcgagtaacg	4980
tatggttttag tatctgtctt ctcttctct taaaaaaaa ccctttgtaa aatagtgccg	5040
agttggagga catcaatctg atgggcaaga aaacaccaac cccccctata tgaaaagaaa	5100
atgataagca gatagataaa aatacttaat taactaatac ataaaaataa gaggtatata	5160

aaaatattat atggaagcaa taattattac tcgcggccgc ttaagcaatc cgaaacatgt	5220
cgactaagac acaccttctt aatctgacaa aggtacgagc gcttgtaaca ccttcaccgg	5280
tcggagtgtt aatagtcatt gaagtccaac cttcaccgcc taaacccaaa cctgcaatac	5340
atggaccatt ttttaciaag atagaggtat tgatggcatt agccattcta ttttaagtttc	5400
ttatattagt agagtgcac gcagctgtgt gtctgcagcc tgactctagc ttaactgcca	5460
atgcgattgc atcatctaca ttcttgactc ttattactgg taacactggc atcatcagct	5520
ccgtcacggc gaatggatga tcagcgtctg tctctgccag gagtagacga gtatgttcgc	5580
taacttccag accaatagcc gctgctaatt tagccgcac tcctccaaca taatctctat	5640
tcacacgtcc tttgccctgt tcgtcaatat cggacaaaag agcgggtagt agtctttcgg	5700
tctgttcggg tgtaagtaag acggcggttat ttctttgcat ttctgccaat agtgcacctg	5760
caactctgtc taccacaatc aaaacttttt catcagcaca aattatgttg ttgtcgaaag	5820
aagcaccctt gacaattgct cttgcggctt taggtatgtc agcagtttcg tccacaacaa	5880
caggaggatt accagcgccg gctgcaatta accttttacc tgtatgcttc ctacgggctt	5940
caacgacggc ttcaccacct gtcacaacta acaatccaat acccgatat ctgaataatc	6000
tctgtgcagt ttcatgtta gggtttgcca cactaactag taaattttct gggccgcggg	6060
tagcgacaat ggccttggtg agtaaagaaa tagtccttag tgagacgttt ttggcagaag	6120
gatgtggtgc gaacacgact gaattccccg ctgcaatcat tgagattgca ttattaatta	6180
ccgtagctgc tggatttggt cttggcggtga ctgaagctac gactcccaa ggggcatttt	6240
caatcaatgt taggccatta tcacccgtaa gaacctcggc cgataaacat tctataccag	6300
gcgtatgacg agcttgagag acattcttaa tgtacttacc caccacccta cccataccag	6360
tttcagcaac tgccatttca gccaaaactt gtgcatacct ttctccggcc actcttatgg	6420
ctttgattac ttgctgacgc aactcaactg aacttagttg ttgttgggct aaggtggctg	6480
cttgcacagc gtcgtccaaa gagctaaaaa taccagatgg agcgtcaaac atggctggta	6540
gcggcatggg cacagttggt tcgattacag aatgttccat tgtgaaggta gttcgatttt	6600
ggaggtcggg ggaggtcgaa actaagttct tgggtgttta aaactaaaaa aaagactaac	6660
tataaaaagta gaatttaaga agtttaagaa atagatttac agaattacaa tcaataacct	6720
ccgtctttat atacttatta gtcaagtagg ggaataattt cagggaactg gtttcaacct	6780
tttttttcag ctttttccaa atcagagaga gcagaaggta atagaaggta taagaaaatg	6840
agatagatac atgcgtgggt caattgcctt gtgtcatcat ttactccagg caggttgcat	6900
cactccattg aggttggtgc cgttttttgc ctgtttgtgc cctgtttctc tgtagttggg	6960
ctaagagaat ggacctatga actgatggtt ggtgaagaaa acaatatttt ggtgctggga	7020

ttcttttttt	ttctggatgc	cagcttaaaa	agcgggctcc	attatattta	gtggatgcca	7080
ggaataaact	gttcacccag	acacctacga	tggtatatat	tctgtgtaac	ccgcccccta	7140
ttttgggcat	gtacgggtta	cagcagaatt	aaaaggctaa	ttttttgact	aaataaagtt	7200
aggaaaatca	ctactattaa	ttattttacgt	attctttgaa	atggcagtat	tgataatgat	7260
aaactcgaac	tgaaaaagcg	tgttttttat	tcaaaatgat	tctaactccc	ttacgtaatc	7320
aaggaatctt	tttgcccttg	cctccgcgtc	attaaaacttc	ttgttggtga	cgctaacatt	7380
caacgctagt	atatattcgt	ttttttcagg	taagttcttt	tcaacgggtc	ttactgatga	7440
ggcagtcgcg	tctgaaaggt	ccgcggcggt	tgacgagcgc	tgatgatttc	tttccttttt	7500
atattgacga	cttttttttt	ttcgtgtgtt	ttgttctct	tataaccgag	ctgcttactt	7560
attattattt	caccttctct	ttttatttat	acttataatt	atttattctt	tacatactgt	7620
tacaagaaac	tcttttctac	attaattgca	taaagtgtca	atcagcacat	cctctatatc	7680
gctatcaaca	acaaatttga	caaaccctgcc	tatatcttca	ggaacaactg	ccgcatcgct	7740
accaccacta	cttgtgaagt	ccctggagtt	taatatgcac	tgaaatttac	ctagccgttt	7800
tacacaagac	cataatccat	ccatgctatc	gcagtatatg	attttgtgtt	cgtttttcgt	7860
cttgcgaaag	gcacccctca	tggtctgttt	cattgatcca	tcagtgtggc	tcgtaggtac	7920
cagcaaaacc	acttcatcag	cggcgtactc	ctggcgggtt	aaacgcgtgg	ccgtgccgtc	7980

<210> 51

<211> 13266

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética: construcción de integración i84022

<400> 51

gacggcacgg	ccacgcgttt	aaaccgcca	gtgatgtaac	taaatacacg	attaccatgg	60
aaattaacgt	accttttttg	tgcggtgatt	gaaatattat	gacatattac	agaaagggtt	120
cgcaagtcct	gtttctatgc	ctttctctta	gtaattcacg	aaataaacct	atgggtttacg	180
aatgatcca	cgaaaatcat	gttattattt	acatcaacat	atcgcgaaaa	ttcatgtcat	240
gtccacatta	acatcattgc	agagcaacaa	ttcattttca	tagagaaatt	tgctactatc	300
accactagt	actaccattg	gtacctacta	ctttgaattg	tactaccgct	gggcgttatt	360
aggtgtgaaa	ccacgaaaag	ttcaccataa	cttcgaataa	agtcgcggaa	aaaagtaaac	420
agctattgct	actcaaatga	ggtttgcaga	agcttggtga	agcatgatga	agcgttctaa	480
acgcactatt	catcattaaa	tatttaaagc	tcataaaatt	gtattcaatt	cctattctaa	540
atggctttta	tttctattac	aactattagc	tctaaatcca	tatcctcata	agcagcaatc	600
aattctatct	atactttaaa	cgctcgtcca	acgcggcgcg	acctgatgtg	tattactagt	660

gtcgacgaca gcattcgccc agtatTTTTT ttattctaca aaccttctat aatttcaaag	720
tatttacata attctgtatc agtttaatca ccataatatc gttttctttg tttagtgcga	780
ttaatttttc ctattgttac ttcgggcctt tttctgtttt atgagctatt ttttccgtca	840
tccttccgga tccagatttt cagcttcac tccagattgt gtctacgtaa tgcacgccat	900
cattttaaga gaggacctcc cgcgacctcc aaaatcgaac taccttcaca atgaaacttc	960
ttagtagtat tgagcaggcg tgtgacatct gtagattgaa gaaattgaaa tgtagtaagg	1020
agaagcccaa atgtgcgaaa tgccttaaaa ataattggga atgcagatat agtccgaaga	1080
cgaagcgag tccccctacc cgcgcgcacc ttacggagggt cgagagtcgc cttgagcgcc	1140
ttgagcaact tttccttctt atcttcccca gagaggattt ggatatgatc cttaatgatg	1200
acagtcttca agacattaag gcgcttctta cggggctttt cgtgcaggac aacgtcaaca	1260
aggacgcggt gacggaccgc cttgccagtg tcgaaacoga catgcccctt acgcttcgcc	1320
aacaccgcat ttcgccacg agtagtagtg aggaatctc caataagggg cagcgccaac	1380
ttaccgtgag tatcgatagt gcggcccacc acgacaatag tacgatcccc cttgacttca	1440
tgccgcgca cgccttgac gggttcgact ggagtgagga agacgatatg agtgacggtc	1500
ttcgtttct taagaccgat ccgaataaca acggtttttt cgggtgatggg agtttgcttt	1560
gcactttgag aagtatcggg ttcaagcccg agaactatac caatagtaat gtcaatcgct	1620
tgcccacgat gatcaccgac cgctataccc ttgccagtgc cagtacgacg agtagacttt	1680
tgcagtccta cttgaacaac ttccatccgt attgtcccat tgtccatagt cccaccctta	1740
tgatgcttta caacaatcaa atcgagattg ccagtaaaga ccagtggcag attttgttca	1800
attgtattct tgcgatcggg gcgtggtgca ttgaagggtga gagtaccgac attgacgtct	1860
tctattacca gaacgccaag agtcacctta cctccaaagt gtttgaaagt gggagtatta	1920
tccttgtcac ggcgcttcac ttgcttagta gatacacgca atggcgcaa aagacgaaca	1980
cctcctacaa cttccattcc ttcagtattc gcatggcgat tagtcttggg cttaacgcgc	2040
atttgccgag tagtttttcc gactcctcca tccttgagca gcgcagaaga atctgggtga	2100
gtgtgtatag ttgggaaatt cagcttagtc ttttgtacgg gagaagtatt caattgagtc	2160
aaaacacgat tagtttttcc agtagtgtgg atgacgtcca aagaacgacg acggggccga	2220
cgatttacca cgggtattatc gagacggcgc gcttgcttca ggtctttacg aagatttacg	2280
agcttgataa gacggtgacc gcggagaagt cccccatttg cgcaagaag tgtcttatga	2340
tctgcaacga aatcgaagaa gtcagtcgcc aagcgccgaa attccttcag atggacatca	2400
gtacgacggc ccttacgaac cttcttaaag agcatccctg gcttagtttc acgcgctttg	2460
agcttaaatg gaagcaactt agtttgatta tctacgtgct tcgcgacttc tttaccaact	2520

tcacgcaaaa gaaaagtcag cttgagcaag accagaacga ccaccagtcc tacgaggtca	2580
agagatgtag tattatgctt tccgacgcgg cgcagcgcac cgtcatgagt gtgtcctcct	2640
acatggataa ccacaacgtg acgccgtact tcgcgtggaa ctgcagttac tatcttttta	2700
acgcggtgct tgtgccgatt aaaacccttt tgagtaatag taagagtaac gccgaaaaca	2760
atgaaaacggc gcagcttctt cagcagatca ataccgtcct tatgcttctt aagaagcttg	2820
cgaccttcaa gattcaaacc tgcgagaagt atatccaggt gcttgaggaa gtgtgcgccc	2880
ccttccttct tagtcaatgc gcgattccgc ttccccacat ttcctacaat aactccaacg	2940
ggtcgcgcat caagaacatc gtggggagtg cgaccattgc gcagtatccc accttgcccg	3000
aagagaacgt gaataacatt tccgtcaagt acgtcagtc cggtagtggt ggtcccagtc	3060
ccgtcccgtc taagagtggg gcgtcctttt ccgacctgtg gaaacttctt agtaatagac	3120
cgcgagtag aaatagtccg gtcacgattc cgcgctccac gccagtcac agaagtgtga	3180
cccccttctt tggtcagcaa cagcaacttc agagtcttgt cccgcttacg cccagtgccc	3240
ttttcggggg tgcgaacttc aaccagtcgg gtaacatcgc cgactccagt cttagtttta	3300
cctttaccaaa ttctccaat gggcccaatt tgattacgac ccagacgaac agtcaggcct	3360
tgagtcagcc gatcgcgagt agtaatgtcc acgacaattt tatgaacaac gagattaccg	3420
cctccaagat cgacgcggg aacaacagta agccgcttag tcccgggtgg accgatcaga	3480
ccgcctacaa tgccttcggg attaccacgg gtatgttcaa caccgaccag atggacgacg	3540
tgtacaatta cctttttgac gacgaggaca cgcgcggaa tccgaagaag gaatgagcca	3600
attggtgagg caattgataa taacgaaaat gtcttttaat gatctgggta taatgaggaa	3660
ttttccgaac gtttttactt tatatatata tatacatgta acatatattc tatacgctat	3720
atcgagaaaa cgcgatggtg gggtagcttt caactcggcg tatccccgcg tgcttgcccg	3780
gccgtagtta tgacaattac aacaacagaa ttctttctat atatgcacga acttgtaata	3840
tggaagaaat tatgacgtac aaactataaa gtaaataattt tacgtaacac atgggtgctgt	3900
tgtgcttctt tttaagaga ataccaatga cgtatgacta agtttatgta ttttccaaaa	3960
cctgttttagc cctggcgaca gatacgtctc cggcttcaac gatgaccctg gtgaccctgt	4020
caatgtcggc tccggtggca ccggccatga ttgcgatgtt ccttgcggtg aaggtcatgt	4080
gtcccccttg gattccctcg gttgccaaag ccctaattgc ggccatattc tgagccaaac	4140
caacggcggc agtaacctgg gccaaactcag tagcggtttc gacctgcatt aaggccaaag	4200
cggccctagc tgtaggggtga gtcttggtgg ctctcctac caaacccaag gccaaaggca	4260
attcaatggt accgaccaac ctaccgtcgt tggccaactc ccacctgtc aaagaggtgt	4320
aatgtccggt cctggcggcg taggcgtggg ctccagcttc gatggccctc cagtcgttac	4380
ctgttgcgac gacgactggg tcaattccgt tcataattcc cttgttatgg gttgcggccc	4440

tgtaaggggc	gactattgct	aaggcgcagg	cttcaaccat	tccccttgca	acgtcggcac	4500
catcgatatcc	ctgggtgggc	aaagtctcag	gggctaactc	aacctgggct	cttaccaacc	4560
tcaagtcggc	caagttagac	aaaatcctca	acctgacggt	tccaccagcg	atcctctcta	4620
cctctggagc	taacctttca	gccatgggtg	taactgtgtt	ggcaccatg	gcgtctctga	4680
catcaacaat	caagtgcatt	acgaccattg	caccaacagg	gggtgtcccta	aaaacatgga	4740
cctcaatgic	tctgcaacca	ccacctaaac	caaccaaacc	tggatctacg	gcattctgctg	4800
cttccatgaa	agcagcctta	tgggccaaca	acctttgcct	agctccttct	gggtctccta	4860
atccgacaac	ttggatttgg	gccctcatta	aagggtcagt	tccgtgtgcg	gtgaatccac	4920
cgttctctct	agctatcctt	gccatatatg	aggctgcggc	aacaacagat	ggttcctcga	4980
ctgccatagg	tattaagtag	tcccttccgt	tgacggtgaa	gttgggtggcg	acaccaatg	5040
gcaactcaaa	ttttccgata	acattctcga	tcataaccgt	ggccaatgac	aaaggcaaag	5100
caccgttacc	ggccaatgca	gaaatggctt	cagggttcaa	tccgtcggct	tccgcaaccc	5160
taactaacct	ctgagcagga	tccaagtccc	tcattctctc	gattccttgag	ttcaatccgt	5220
cgatgtgacc	tgtctttcca	gtcattgtaa	agttagtgtg	ttgcgcgact	tccgggtggg	5280
taagtataga	ggtatattaa	caattttttg	ttgatacttt	tatgacattt	gaataagaag	5340
taatacaaac	cgaatgtgtt	gaaagtatta	gttaaagtgg	ttatgcagct	tttgcattta	5400
tatatctgtt	aatagatcaa	aatcatcgc	ttcgttgatt	aattacccca	gaaataaggc	5460
taaaaaacta	atcgcattat	tatcctatgg	ttgttaattt	gattcgttga	tttgaaggtt	5520
tgtggggcca	ggttactgcc	aatttttcc	cttcataacc	ataaaagcta	gtattgtaga	5580
atctttattg	ttcggagcag	tgccggcgga	ggcacatctg	cgtttcagga	acgcgaccgg	5640
tgaagaccag	gacgcacgga	ggagagtctt	ccgtcggagg	gctgtcgccc	gctcggcggc	5700
ttctaaccgg	tacttcaata	tagcaatgag	cagttaaagg	tattactgaa	agttccaaag	5760
agaagggttt	tttaggctaa	gataatgggg	ctctttacat	ttccacaaca	tataagtaag	5820
attagatatg	gatattgata	tgggtgtatt	gccatgtaat	atgattatta	aacttctttg	5880
cgtccatcca	aaaaaaaaag	aacgcacgca	cactcccgc	agacaactag	cttgataatg	5940
tctcagaacg	tttacattgt	atcgactgcc	agaaccccaa	ttgggttcatt	ccagggttct	6000
ctatcctcca	agacagcagt	ggaattgggt	gctgttgctt	taaaaggcgc	cttggctaag	6060
gttccagaat	tggatgcata	caaggatttt	gacgaaatta	tttttggtaa	cgttctttct	6120
gccaatttgg	gccaaagctc	ggccagacaa	gttgctttgg	ctgcgggttt	gagtaatcat	6180
atcgttgcaa	gcacagttaa	caaggctctg	gcattccgta	tgaaggcaat	cattttgggt	6240
gctcaatcca	tcaaatgtgg	taatgctgat	gttgctcgtg	ctgggtggtg	tgaatctatg	6300

actaacgcac catactacat gccagcagcc cgtgcgggtg ccaaatttgg ccaaactgtt	6360
cttgttgatg gtgtcgaaag agatgggttg aacgatgcgt acgatggtct agccatgggt	6420
gtacacgcag aaaagtgtgc ccgtgattgg gatattacta gagaacaaca agacaatttt	6480
gccatcgaat cctaccaaaa atctcaaaaa tctcaaaagg aaggtaaatt cgacaatgaa	6540
attgtacctg ttaccattaa gggattttaga ggtaagcctg ataactcaagt cacgaaggac	6600
gaggaacctg ctagattaca cgttgaaaaa ttgagatctg caaggactgt tttccaaaaa	6660
gaaaacggta ctgttactgc cgctaacgct tctccaatca acgatgggtg tgacagccgtc	6720
atcttggttt ccgaaaaagt tttgaaggaa aagaatttga agcctttggc tattatcaaa	6780
ggttggggtg aggccgctca tcaaccagct gattttacct gggtccatc tcttgacgtt	6840
ccaaaggcct tgaacatgc tggcatcgaa gacatcaatt ctgttgatta ctttgaattc	6900
aatgaagcct tttcggttgt cggtttggtg aacactaaga ttttgaagct agacccatct	6960
aaggttaatg tatatgggtg tgctgttgct ctaggtcacc cattgggttg ttctggtgct	7020
agagtgggtg ttacactgct atccatctta cagcaagaag gaggtgaagat cgggtgttgcc	7080
gccatttgta atggtgggtg tgggtgcttc tctattgtca ttgaaaagat atgattacgt	7140
tctgcgattt tctcatgac tttttcataa aatacataaa tatataaatg gctttatgta	7200
taacaggcat aatttaaagt tttatttgcg attcatcggt tttcaggtag tcaaacgctg	7260
aggtgtgct tttgacttac ttttcgcctc tggcaagctg gccgaacctg caggccgcga	7320
gcgccgatac gaaaatcggt attgtcttga aggtgaaatt tctactctta ttaatggtga	7380
acgttaagct gatgctatga tggaaagctga ttggtcttaa ctgtctgtc atcttgctaa	7440
tggtcattgg ctogtggtat tacttaagtt atttgtagtc gttttgaacg taatgctaata	7500
gatcatctta tgggaataata gtgagtggtt tcagggtcca taaagctttt caattcatct	7560
tttttttttt tgttcttttt tttgattccg gtttctttga aatttttttg attcggtaata	7620
ctccgagcag aaggaagaac gaagggaagg gcacagactt agattgggtat atatacgcat	7680
atgtggtgtt gaagaaacat gaaattgccc agtattctta acccaactgc acagaacaaa	7740
aacctgcagg aaacgaagat aaatcatgtc gaaagctaca tataaggaac gtgctgctac	7800
tcatcctagt cctgttgctg ccaagctatt taatatcatg cacgaaaagc aaacaaactt	7860
gtgtgcttca ttggatgttc gtaccaccaa ggaattactg gagttagttg aagcattagg	7920
tcccaaaatt tgtttactaa aaacacatgt ggatatcttg actgattttt ccatggaggg	7980
cacagttaag ccgctaaagg cattatccgc caagtacaat tttttactct tcgaagacag	8040
aaaatttgct gacattggta atacagtcaa attgcagtag tctgcgggtg tatacagaat	8100
agcagaatgg gcagacatta cgaatgcaca cgggtgtggtg ggcccaggta ttgttagcgg	8160
tttgaagcag gcggcggaag aagtaacaaa ggaacctaga ggctttttga tgtagcaga	8220

attgtcatgc aagggctccc tagctactgg agaataact aagggactg ttgacattgc	8280
gaagagtgc aaagattttg ttatcggctt tattgctcaa agagacatgg gtggaagaga	8340
tgaaggttac gattggttga ttatgacacc cgggtgtgggt ttagatgaca agggagacgc	8400
attgggtcaa cagtatagaa ccgtggatga tgtggtctct acaggatctg acattattat	8460
tgttggaaga ggactatttg caaaggaag ggatgctaag gtagagggtg aacgttacag	8520
aaaagcaggc tgggaagcat atttgagaag atgcggccag caaaactaaa aaactgtatt	8580
ataagtaa at gcattgtat taaactcaca aattagagct tcaattta at tatatcagtt	8640
attaccacga aaatcggtt tgtcttgaag gtgaaatttc tactcttatt aatggtgaac	8700
gttaagctga tgctatgat gaagctgatt ggtcttaact tgcttgcat cttgcta atg	8760
gtcatatggc tcgtgttatt acttaagtta tttgtactcg ttttgaacgt aatgcta atg	8820
atcatcttat ggaataatag tgaacggccg gccaaagcac cggggattga atgagaaaaa	8880
aaatcggtt ggcttaactt taaagaaaaa agttgagatt agattttatt tgttataaat	8940
atagatatac aattctttat aaaaaaata tatatatata tcattgttat taaataaaga	9000
gttttcctag tatatagatt aaaaaactac tctattaaat gagagctaaa aaaagcaggc	9060
tgccaaaaaa ataaagcatt tatgaagggg gttcagcaag atgcaatcga tgggggaaga	9120
ttatttttta acatcgtaag atcttctaaa tttgtcatcg atgttggtca agtagtaaac	9180
accactttgc aaatgctcaa tggaaccttg aggtttgaag ttcttcttca aatgggcatt	9240
ttctctcaat tcgatggcag cttcgtaatc ctttgaggtt tcggtgattc tcttggttaa	9300
tttgttagta atatctaatt ccttgataat atgttgagcg tcaccaacaa ttttgcaaga	9360
atatagagat gcagctaaac cggaaccgta agaaaataaa ccaacacgct tgccttgtaa	9420
gtcgtcagat ccaacatagt ttaatagaga tgcaaaggcg gcataaacag atgcggtgta	9480
catgttacct gtgtttgttg gaacaatcaa agattgggca actctctctt tgtggaatgg	9540
cttagcaaca ttaacaaaag ttttttcaat gttcttatcg gttaaagatt cgtcataatc	9600
gcgagtagct aattcggcgt caacttctgg gaacaattga ggattggctc tgaaatcgtt	9660
atatagtaat ctaccgtatg attttgtgac caatttacag gttggaacat ggaaaacgtt	9720
gtagtcgaaa tatttcaaaa cgttcaaagc atccgaacca gcgggatcgc taaccaaccc	9780
tttagaaata gccttcttgg aataactctt gtaaacttga tcaagagcct tgacgtaaca	9840
agttaatgaa aaatgaccat cgacgtaagg atattcgctg gtgaaatctg gcttgtaaaa	9900
atcgtaggcg tgttccatgt aagaagctct tacagagtca aatacaattg gagcatcagg	9960
accgatccac atagcaacag taccggcacc accggttggt cttgcggcac ccttatcgta	10020
gatggcaata tcaccgcaa ctacaatggc gtctctacca tcccatgcgt tagattcaat	10080

ccagttcaaa gagttgaaca acgcgttggg accaccgtaa caggcattaa gcgtgtcaat	10140
accttcgacg tcagtggttt caccaaacaa ttgcatcaag acagacttga cagacttgga	10200
cttgtaaatc agagtttcag taccgacttc taatctacca attttggttg tgctgatgtt	10260
gtaactcttg atcaacttag acaaaacagt tagggacatc gagtagatat cttctctgtc	10320
attgacaaaa gacatgttgg ttggcccag accaattgtg tatttacctt gagaaaagcc	10380
atcaaatttc tctagctcag attggttgac acattgagtt gggatgtaa ttggatacc	10440
tttaataaccg acattttgag gtctggtttt ttgttcagcg gtcttttgtt ttttagttc	10500
agtcatttgc aagtttgat tgtgtaattg ttgttgcttt tgcggcctaa gtcttccttt	10560
aataccacac caacaaagt tagttgagag ttcatgtg aaggtagttc gattttggag	10620
gtcgcgggag gttacttttt tttggatgg acgcaaagaa gtttaataat catattacat	10680
ggcaatacca ccatatacat atccatatct aatcttactt atatgttggt gaaatgtaa	10740
gagccccatt atcttagcct aaaaaaacct tctctttgga actttcagta atacgcttaa	10800
ctgctcattg ctatattgaa gtacggatta gaagccgccc agcggcgac agccctccga	10860
cggaaagactc tctccgtgc gtccgtgtct tcaccggctg cgttcctgaa acgcagatgt	10920
gcctcgcgcc gactgctcc gaacaataaa gattctacaa tactagcttt tatggttatg	10980
aagaggaaaa attggcagta acctggcccc acaaaccttc aaatcaacga atcaaattaa	11040
caaccatagg ataataatgc gattagtttt ttagccttat ttctggggtg attaatcagc	11100
gaagcgatga tttttgatct attaacagat atataaatgc aaaagctgca taaccacttt	11160
aactaatact ttcaacattt tcggtttgta ttacttctta ttcaaatgtc ataaaagtat	11220
caacaaaaaa ttgttaatat acctctatac ttacccacc cgaagtgcgc caaccaacta	11280
actttacaat gactggaaag acaggtcaca tcgacggatt gaactcaagg atcgagaaga	11340
tgagggactt ggatcctgct cagaggttag ttagggttgc cgaagccgca ggattggaac	11400
ctgaagccat ttctgcattg gccggtaacg gtgctttgcc tttgtcattg gccaacggta	11460
tgatcgagaa tgttatcgga aaatttgagt tgccattggg tgcgccacc aacttcaccg	11520
tcaacggaag ggactactta atacctatgg cagtcgagga accatctgtt gttgccgag	11580
cctcatatat ggcaaggata gctagagaga acggtggatt caccgcacac ggaactgcac	11640
ctttaatgag ggcccaaata caagttgtcg gattaggaga ccagaagga gctaggcaaa	11700
ggttggtggc ccataaggct gctttcatgg aagcagcaga tgccgtagat ccagttttgg	11760
ttggtttagg tgggtggtgc agagacattg aggtccatgt ttttagggac acccctgttg	11820
gtgcaatggt cgtattgcac ttgattgttg atgtcagaga cgccatgggt gccaacacag	11880
ttaacaccat ggctgaaagg ttagctccag aggtagagag gatcgctggg ggaaccgtca	11940
ggttgaggat tttgtctaac ttggccgact tgaggttggt aagagccagg gttgagttag	12000

cccttgagac tttgaccacc cagggatagc atgggtgccga cgttgcaagg ggaatggttg 12060
aagcctgccc cttagcaata gtcgaccctt acagggccgc aaccataac aaggaatta 12120
tgaacggaat tgaccagtc gtcgtcgca caggtaacga ctggaggcc atcgaagctg 12180
gagccacgc ctacgccgc aggaccggac attacacctc tttgacaagg tgggagttgg 12240
ccaacgacgg taggttggtc ggtaccattg aattgccttt ggccttggt ttggtaggag 12300
gagccacca gactcaccct acagctaggg ccgctttggc cttaatgcag gtcgaaaccg 12360
ctactgagtt ggcccagggt actgccgcg ttggtttggc tcagaatatg gccgcaatta 12420
gggccttggt aaccgaggga atccaaagg gacacatgac cttacacgca aggaacatcg 12480
caatcatggc cgggtgccacc ggagccgaca ttgacagggt caccagggtc atcgttgaag 12540
ccggagacgt atctgtcgcc agggctaaac aggttttggg aaatacataa acttagtcat 12600
acgtcattgg tattctcttg aaaaagaagc acaacagcac catgtgttac gtaaaatatt 12660
tactttatag tttgtacgtc ataatttctt ccatattaca agttcgtgca tatatagaaa 12720
gaattctgtt gttgtaattg tcataactag gtccgccggc gttggacgag cgaatgtgta 12780
tattagttta aaaagttgta tgtaataaaa gtaaaattta atattttgga tgaaaaaac 12840
catttttaga ctttttctta actagaatgc tggagtagaa atacgccatc tcaagataca 12900
aaaagcgtta ccggcactga tttgtttcaa ccagtatata gattattatt gggcttgat 12960
caactttcct cagacatatc agtaacagtt atcaagctaa atatttacgc gaaagaaaaa 13020
caaatatattt aattgtgata cttgtgaatt ttattttatt aaggatacaa agttaagaga 13080
aaacaaaatt tatatacaat ataagtaata ttcatatata tgtgatgaat gcagtcttaa 13140
cgagaagaca tggccttggt gacaactctc ttcaaaccac cttcagcctt tctcaattca 13200
tcagcagatg ggtcttcgat ttgcaaagca gccaaagcgg cggtttaaac gcgtggccgt 13260
gccgtc 13266

<210> 52
<211> 13712
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Construcción sintética: construcción de integración i84024

<400> 52

gacggcacgg ccacgcgttt aaaccgcaa gtgatgtaac taaatacacg attaccatgg 60
aaattaacgt accttttttg tgcgtgtatt gaaatattat gacatattac agaaaggggt 120
cgcaagtcct gtttctatgc ctttctctta gtaattcacg aaataaacct atggtttacg 180
aatgatcca cgaaaatcat gttattattt acatcaacat atcgcgaaaa ttcatgtcat 240

gtccacatta acatcattgc agagcaacaa ttcattttca tagagaaatt tgctactatc	300
acccactagt actaccattg gtacctacta ctttgaattg tactaccgct gggcggttatt	360
aggtgtgaaa ccacgaaaag ttcaccataa cttcgaataa agtcgcggaa aaaagtaaac	420
agctattgct actcaaatga ggtttgcaga agcttggtga agcatgatga agcgttctaa	480
acgcactatt catcattaaa tatttaaagc tcataaaatt gtattcaatt cctattctaa	540
atggctttta tttctattac aactattagc tctaaatcca tatcctcata agcagcaatc	600
aattctatct atactttaaa cgctcgcca acgccggcg accgatgtg tattactagt	660
gtcgacgaca gcattcgccc agtatttttt ttattctaca aaccttctat aatttcaaag	720
tatttacata attctgtatc agtttaatca ccataatata gttttctttg tttagtgcga	780
tttaattttc ctattgttac ttccggcctt tttctgtttt atgagctatt ttttccgtca	840
tccttccgga tccagatttt cagcttcata tccagattgt gtctacgtaa tgcacgccat	900
cattttaaga gaggacctcc cgcgacctcc aaaatcgaac taccttcaca atgaaacttc	960
ttagtagtat tgagcaggcg tgtgacatct gtagattgaa gaaattgaaa tgtagtaagg	1020
agaagcccaa atgtgcgaaa tgccttaaaa ataattggga atgcagatat agtccgaaga	1080
cgaagcgcag tcccttacc cgcgcgcacc ttacggaggt cgagagtcgc cttgagcgcc	1140
ttgagcaact tttccttctt atcttcccca gagaggattt ggatatgatc ctttaagatgg	1200
acagtcttca agacattaag gcgcttctta cggggctttt cgtgcaggac aacgtcaaca	1260
aggacgcggt gacggaccgc cttgccagtg tcgaaaccga catgccctt acgcttcgcc	1320
aacaccgat ttcgccacg agtagtagtg aggaatctc caataagggg cagcgccaac	1380
ttaccgtgag tatcgatagt ggggccacc acgacaatag tacgatcccc cttgacttca	1440
tgccgcgcga cgccttgca gggttcgact ggagtgagga agacgatatg agtgacggtc	1500
ttccgtttct taagaccgat ccgaataaca acggtttttt cgggtgatggg agtttgcttt	1560
gcattctgag aagtatcgtt ttcaagccc agaactatac caatagtaat gtcaatcgt	1620
tgcccacgat gatcaccgac cgctataccc ttgccagtcg cagtacgacg agtagacttt	1680
tgcagtccta cttgaacaac ttccatccgt attgtcccat tgtccatagt cccaccctta	1740
tgatgcttta caacaatcaa atcgagattg ccagtaaaga ccagtggcag attttgttca	1800
attgtattct tgcgatcggg gcgtggtgca ttgaaggatga gactaccgac attgacgtct	1860
tctattacca gaacgccaa agtcacctta cctccaaagt gtttgaaagt gggagtatta	1920
tccttgctac ggcgcttcac ttgcttagta gatacacgca atggcgccaa aagacgaaca	1980
cctctacaa cttccattcc ttcagtatc gcattggcat tagtcttggg ctttaaccgg	2040
atgtgccgag tagtttttcc gactcctcca tccttgagca gcgcagaaga atctggtgga	2100
gtgtgtatag ttgggaaatt cagcttagtc tttgtacgg gagaagtatt caattgagtc	2160

```

aaaacacgat tagttttccc agtagtgtgg atgacgtcca aagaacgacg acggggccga      2220
cgatttacca cgggtattatc gagacggcgc gcttgcttca ggtctttacg aagatttacg      2280
agcttgataa gacggtgacc gcggagaagt ccccatattg cgcgaagaag tgtcttatga      2340
tctgcaacga aatcgaagaa gtcagtcgcc aagcgccgaa attccttcag atggacatca      2400
gtacgacggc ccttacgaac cttcttaaag agcatccctg gcttagtttc acgcgctttg      2460
agcttaaatg gaagcaactt agtttgatta tctacgtgct tcgcgacttc tttaccaact      2520
tcacgcaaaa gaaaagtcag cttgagcaag accagaacga ccaccagtcc tacgaggtca      2580
agagatgtag tattatgctt tccgacgcgg cgcagcgcac cgtcatgagt gtgtcctcct      2640
acatggataa ccacaacgtg acgccgtact tcgcgtggaa ctgcagttac tatcttttta      2700
acgcggtgct tgtgccgatt aaaacccttt tgagtaatag taagagtaac gccgaaaaca      2760
atgaaacggc gcagcttctt cagcagatca ataccgctct tatgcttctt aagaagcttg      2820
cgaccttcaa gattcaaacc tgcgagaagt atatccaggt gcttgaggaa gtgtgcgccc      2880
ccttccttct tagtcaatgc gcgattccgc ttccccacat ttctacaat aactccaacg      2940
ggtccgcgat caagaacatc gtggggagtg cgaccattgc gcagtatccc accttgcccg      3000
aagagaacgt gaataacatt tccgtcaagt acgtcagtcc cggtagtgtg ggtccagtc      3060
ccgtcccgtc taagagtggg gcgtcctttt ccgacctgtg gaaacttctt agtaatagac      3120
cgccgagtag aaatagtccg gtcacgattc cgcgctccac gcccagtcac agaagtgtga      3180
cccccttctt tggtcagcaa cagcaacttc agagtcttgt cccgcttacg cccagtgccc      3240
ttttcggggg tgcgaacttc aaccagtccg gtaacatcgc cgactccagt cttagtttta      3300
cctttaccaa ttctccaat gggcccaatt tgattacgac ccagacgaac agtcaggcct      3360
tgagtcagcc gatcgcgagt agtaatgtcc acgacaattt tatgaacaac gagattaccg      3420
cctccaagat cgacgacggg aacaacagta agccgcttag tcccgggtgg accgatcaga      3480
ccgcctacaa tgccttcggg attaccacgg gtatgttcaa cagcaccacg atggacgacg      3540
tgtacaatta cctttttgac gacgaggaca cgccgccgaa tccgaagaag gaatgagcca      3600
attggtgcgg caattgataa taacgaaaat gtcttttaat gatctgggta taatgaggaa      3660
ttttcogaac gtttttactt tatatatata tatacatgta acatatattc tatacgtat      3720
atcgagaaaa cgcgatggtg gggtgacttt caactcggcg tatccccgcg tgcttggccg      3780
gccgtccgca tgactcaaga gaagcatgtg gtttttgagt ttttttcgtt gaattttcag      3840
gtaaagctca atagttatga caattacaac aacagaattc tttctatata tgcacgaact      3900
tgtaatatgg aagaaattat gacgtacaaa ctataaagta aatattttac gtaacacatg      3960
gtgctgttgt gcttcttttt caagagaata ccaatgacgt atgactaagt ttaggattta      4020

```

atgcaggtga cggaccocatc tttcaaacga tttatatcag tggcgtccaa attgttaggt	4080
tttgttggtt cagcaggttt cctgttgtgg gtcatatgac tttgaaccaa atggccggct	4140
gctagggcag cacataagga taattcacct gccaaagacgg cacaggcaac tattcttgct	4200
aattgacgtg cgttggtacc aggagcggta gcatgtgggc ctottacacc taataagtcc	4260
aacatggcac cttgtggttc tagaacagta ccaccaccga tggtagctac ttcgatggat	4320
ggcatggata cggaaattct caaatcacctg tccacttctt tcatcaatgt tatacagttg	4380
gaactttcga cattttgtgc aggatcttgt cctaattgcca agaaaacagc tgtcactaaa	4440
ttagctgcat gtgcgttaaa tccaccaaca gaccagcca ttgcagatcc aaccaaattc	4500
ttagcaatgt tcaactcaac caatgcggaa acatcacttt ttaacacttt tctgacaaca	4560
tcaccaggaa tagtagcttc tgcgacgaca ctottaccac gaccttcgat ccagttgatg	4620
gcagctggtt ttttgtcggc acagtagtta ccagaaacgg agacaacctc catatcttcc	4680
cagccatact ctctaccat ttgctttaat gagtattcga cacccttaga aatcatattc	4740
ataccatttg cgtcaccagt agttgttcta aatctcatga agagtaaata toctgctaga	4800
caagtttgaa tatgttgacg acgtgcaaata cttgatgtag agttaaagc ttttttaatt	4860
gcgttttgc cctcttctga gtctaaccat atottacagg caccagatct tttcaaagtt	4920
gggaaacgga ctactgggac tcttgcata ccattccttag ttaaaacagt tgttgaccca	4980
ccgccagcat tgattgcctt acagccacgc atggcagaag ctaccaaaca accctctgta	5040
gttgccattg gtatatgata agatgtacca tcgataacca aggggcctat aacaccaacg	5100
ggcaaaggca tgtaacctat aacattttca caacaagcgc caaatacgcg gtcgtagtca	5160
taatttttat atggtaaagc atcagatgct aatacaggag cttctgccaa aattgaaaga	5220
gccttctac gtaccgcaac cgtctctgta gtatcaccta attttttctc caaagcgtac	5280
aaaggtaact taccgtgaat aaccaaggca gcgacctctt tgttcttcaa ttgttttgta	5340
tttccactac ttaataatgc ttctaattct tctaaaggac gtattttctt atccaagctt	5400
tcaatatcgc gggaatcatc ttctcacta gatgatgaag gtctgatga gctcgattgc	5460
gcagatgata aacttttgac tttcgatcca gaaatgactg ttttattggt taaaactggt	5520
gtagaagcct tttgtacagg agcagtaaaa gacttcttgg tgacttcagt cttcaccaat	5580
tggctctgag ccattgtaaa gttagttggt tgcgcgactt cgggtggggt aagtatagag	5640
gtatatatac aattttttgt tgatactttt atgacatttg aataagaagt aatacaaacc	5700
gaaaatgttg aaagtattag ttaaagtggg tatgcagctt ttgcatttat atatctgtta	5760
atagatcaaa aatcatcgct tcgctgatta attaccccag aaataaggct aaaaaactaa	5820
tcgcattatt atcctatggt tgtaatttg attcgttgat ttgaaggttt gtggggccag	5880
gttactgcc aatttttctc ttcataacca taaaagctag tattgtagaa tctttattgt	5940

tccggagcagt	gcggcgcgag	gcacatctgc	gtttcaggaa	cgcgaccggt	gaagaccagg	6000
acgcacggag	gagagtcttc	cgtcggaggg	ctgtcgcccg	ctcggcggct	tctaataccgt	6060
acttcaatat	agcaatgagc	agttaagcgt	attactgaaa	gttccaaaga	gaagggttttt	6120
ttaggctaag	ataatggggc	tctttacatt	tccacaacat	ataagtaaga	ttagatatgg	6180
atatgtatat	ggtggtattg	ccatgtaata	tgattattaa	acttctttgc	gtccatccaa	6240
aaaaaaagta	acgcacgcac	actcccgaca	gacaactagc	ttgataatga	ctgatgttcg	6300
tttcagaatc	atcgggtaccg	gtgcctatgt	tccagaaaaga	attgtttcta	acgacgaagt	6360
tggtgctcca	gctggtgttg	atgacgactg	gatcaccaga	aagactggta	tcagacaaag	6420
aagatgggct	gctgatgacc	aagctacttc	tgacttagct	actgctgctg	gtagagccgc	6480
cttgaaggct	gctggtatta	ctccagaaca	attgactggt	atcgctgttg	ctacctccac	6540
tccagataga	ccacaaccac	ctaccgctgc	ctacgttcaa	caccacttgg	gtgctactgg	6600
tactgctgct	ttcgacgtta	acgctgtttg	ttccggtact	gttttcgcct	tatcttctgt	6660
cgccggtacc	ttggtctaca	gaggtgggta	tgctttgggt	atcgggtgctg	acttgtactc	6720
cagaatcttg	aatccagctg	acagaaagac	cggtgttttg	ttcgggtgatg	gtgctggtgc	6780
tatgggtttg	ggtccaactt	ctactggtac	tggtccaatc	gttagaagag	tcgctttaca	6840
cacctttggg	ggtttaaccg	atttgattag	agttccagct	ggtgggttcta	gacaaccatt	6900
ggacactgac	ggtttggacg	ccggtttgca	atactttgcc	atggacggta	gagaagttag	6960
acgtttcgtc	actgaacatt	tgccacaatt	gatcaaaggt	ttcttgcatg	aagctgggtg	7020
tgacgctgct	gatatttctc	atttcgtccc	acatcaagcc	aacgggtgta	tggtggacga	7080
agtttttggg	gaattgcatt	tgccaagagc	taccatgcac	agaactgttg	aaacttacgg	7140
taataccggg	gctgcttcca	ttccaattac	tatggacgct	gctgttagag	ccggttcctt	7200
tagaccaggt	gaattgggtc	tattggctgg	ttttgggtgg	ggtatggccg	cctctttcgc	7260
cttgattgaa	tggtagatgc	tatgtaatag	acaataaaac	catgtttata	taaaaaaaat	7320
tcaaaaataga	aaacgattct	gtacaaggag	tatttttttt	ttgttctagt	gtgtttatat	7380
tatccttggc	taagaggcac	taacctgcag	gccgcgagcg	ccgatacgaa	aatcgttatt	7440
gtcttgaagg	tgaaatttct	actcttatta	atgggtgaacg	ttaagctgat	gctatgatgg	7500
aagctgattg	gtcttaactt	gcttgcac	ttgctaattg	tcattggctc	gtgttattac	7560
ttaagttatt	tgtaactcgt	ttgaacgtaa	tgctaattgat	catcttatgg	aataatagtg	7620
agtggtttca	gggtccataa	agcttttcaa	ttcatctttt	ttttttttgt	tctttttttt	7680
gattccgggt	tctttgaaat	ttttttgatt	cggtaatctc	cgagcagaag	gaagaacgaa	7740
ggaaggagca	cagacttaga	ttggtatata	tacgcataatg	tggtgttgaa	gaaacatgaa	7800

attgcccagt attcttaacc caactgcaca gaacaaaaac ctgcaggaaa cgaagataaa	7860
tcattgtcgaa agctacatat aaggaacgtg ctgctactca tcctagtcct gttgctgcc	7920
agctatttta tatcatgcac gaaaagcaaa caaacttgtg tgcttcattg gatgttcgta	7980
ccaccaagga attactggag ttagttgaag cattaggtcc caaaatttgt ttactaaaaa	8040
cacatgtgga tatcttgact gatttttcca tggagggcac agttaagccg ctaaaggcat	8100
tatccgcaa gtacaatttt ttactcttcg aagacagaaa atttgctgac attgtaata	8160
cagtcaaatt gcagtactct gcgggtgtat acagaatagc agaatgggca gacattacga	8220
atgcacacgg tgtggtgggc ccagggtattg ttagcggttt gaagcaggcg gcggaagaag	8280
taacaaagga acctagaggc cttttgatgt tagcagaatt gtcattgcaag ggctccctag	8340
ctactggaga atatactaag ggtactgttg acattgcaa gagtgacaaa gattttgtta	8400
tcggctttat tgctcaaaga gacatgggtg gaagagatga aggttacgat tggttgatta	8460
tgacacccgg tgtgggttta gatgacaagg gagacgcatt gggccaacag tatagaaccg	8520
tggatgatgt ggtctctaca ggatctgaca ttattattgt tggaagagga ctatttgcaa	8580
agggaaagga tgctaagga gaggggtgaac gttacagaaa agcaggctgg gaagcatatt	8640
tgagaagatg cggccagcaa aactaaaaaa ctgtattata agtaaatgca tgtatactaa	8700
actcacaat tagagcttca atttaattat atcagttatt accacgaaaa tcgttattgt	8760
cttgaagggtg aaatttctac tcttattaat ggtgaacgtt aagctgatgc tatgatggaa	8820
gctgattggt cttaacttgc ttgtcatctt gctaattggtc atatggctcg tgttattact	8880
taagtatttt gtactcgttt tgaacgtaat gctaattgatc atcttatgga ataatagtga	8940
acggccgggc aagcacgcgg ggattgaatg agaaaaaaaa tcggttgggc ttaactttta	9000
agaaaaaagt tgagattaga tttatttgtt tataaatata gatatacaat tctttataaa	9060
aaaaatatat atatatatca ttgttattaa ataaagagtt ttcctagtat atagattaaa	9120
aaactactct attaaatgag agctaaaaaa agcaggctgc caaaaaata aagcatttat	9180
gaaggggggt cagcaagatg caatcgatgg gggaagatta ttttttaaca tcgtaagatc	9240
ttctaaattt gtcattgatg ttggtcaagt agtaaacacc actttgcaa tgctcaatgg	9300
aaccttgagg tttgaagttc ttcttcaaat gggcattttc tctcaattcg atggcagctt	9360
cgtaatcctt tggagtttcg gtgattctct tggctaattt gttagtaata tctaattcct	9420
tgataatatg ttggacgtca ccaacaattt tgcaagaata tagagatgca gctaaaccgg	9480
aaccgtaaga aaataaacca acacgcttgc cttgtaagtc gtcagatcca acatagttaa	9540
atagagatgc aaaggcggca taaacagatg cgggtgtacat gttacctgtg tttgttgaa	9600
caatcaaaga ttgggcaact ctctctttgt ggaatggctt agcaacatta acaaaagttt	9660
tttcaatggt cttatcggtt aaagattcgt cataatcgcg agtagctaata tcggcgtaaa	9720

cttctgggaa caattgagga ttggctctga aatcggtata tagtaatcta ccgtatgatt	9780
ttgtgaccaa ttacacggtt ggaacatgga aaacgttgta gtcgaaatat ttcaaacgt	9840
tcaaagcatc cgaaccagcg ggatcgctaa ccaacccttt agaaatagcc ttcttggaat	9900
aactcttgta aacttgatca agagccttga cgtaacaagt taatgaaaaa tgaccatcga	9960
cgtaaggata ttcgctggtg aaatctggct tgtaaaaatc gtaggcgtgt tccatgtaag	10020
aagctcttac agagtcaaat acaattggag catcaggacc gatccacata gcaacagtac	10080
cggcaccacc ggttggtctt gcggcaccct tatcgtagat ggcaatatca ccgcaacta	10140
caatggcgtc tctaccatcc catgcgtagg attcaatcca gttcaaagag ttgaacaacg	10200
cgttggtacc accgtaacag gcattaagcg tgtcaatacc ttcgacgtca gtgttttcac	10260
caaacaattg catcaagaca gacttgacag acttggactt gtcaatcaga gtttcagtac	10320
cgacttctaa tctaccaatt ttgttggtgt cgatgttgta actcttgatc aacttagaca	10380
aaacagttag ggacatcgag tagatatctt ctctgtcatt gacaaaagac atgttggttt	10440
ggcccagacc aattgtgtat ttaccttgag aaacgccatc aaatttctct agctcagatt	10500
ggttgacaca ttgagttggg atgtaaattt ggataccttt aataccgaca ttttgaggtc	10560
tggttttttg ttcagcggtc ttttgttttt ttagttcagt catttgcaag tttgtattgt	10620
gtaattgttg ttgcttttgc ggcctaagtc ttctttaat accacaccaa caaagtttag	10680
ttgagagttt cattgtgaag gtagttcgat tttggaggtc gcgggagggt actttttttt	10740
tggatggacg caaagaagtt taataatcat attacatggc aataccacca tatacatatc	10800
catactaat cttacttata tggttgaggaa atgtaaagag cccattatc ttagcctaaa	10860
aaaaccttct ctttggaact ttcaagtaata cgcttaactg ctcatgtcta tattgaagta	10920
cggattagaa gccgccgagc gggcgacagc cctccgacgg aagactctcc tccgtgcgtc	10980
ctggtcttca ccggtcgcgt tcctgaaacg cagatgtgcc tcgcgccgca ctgctccgaa	11040
caataaagat tctacaatac tagcttttat ggttatgaag aggaaaaatt ggcagtaacc	11100
tggtcccaaca aaccttcaaa tcaacgaatc aaattaacaa ccataggata ataatgcgat	11160
tagtttttta gccttatttc tggggttaatt aatcagcgaa gcgatgattt ttgatctatt	11220
aacagatata taaatgcaaa agctgcataa ccactttaac taatactttc aacattttcg	11280
gtttgtatta cttcttattc aaatgtcata aaagtatcaa caaaaaattg ttaatatacc	11340
tctatactta cccacccga agtcgcgcaa ccaactaact ttacaatggc tgcagaccaa	11400
ttggtgaaga ctgaagtcac caagaagtct ttactgctc ctgtacaaaa ggcttctaca	11460
ccagttttta ccaataaaac agtcatttct ggatcgaaag tcaaaagttt atcatctgcg	11520
caatcgagct catcaggacc ttcatcatct agtgaggaag atgattcccg cgatattgaa	11580

agcttggata	agaaaatacg	tccttttagaa	gaattagaag	cattattaag	tagtggaat	11640
acaaaaaat	tgaagaacaa	agaggtcgct	gccttggtta	ttcacggtaa	gttacctttg	11700
tacgctttgg	agaaaaaatt	aggtgatact	acgagagcgg	ttgcggtacg	taggaaggct	11760
ctttcaattt	tggcagaagc	tcctgtatta	gcctctgac	gtttaccata	taaaaattat	11820
gactacgacc	gcgtatattg	cgcttggtgt	gaaaatgtta	taggttacat	gcctttgcc	11880
gttggtgtta	tagggccctt	ggttatcgat	ggtacatctt	atcatatacc	aatggcaact	11940
acagagggtt	gtttggtagc	ttctgccatg	cgtggctgta	aggcaatcaa	tgctggcgg	12000
ggtgcaacaa	ctgttttaac	taaggatggt	atgacaagag	gccagtagt	ccgtttccca	12060
actttgaaaa	gatctggtgc	ctgtaagata	tggttagact	cagaagagg	acaaaacgca	12120
attaaaaaag	cttttaactc	tacatcaaga	tttgacgctc	tgcaacatat	tcaaacttgt	12180
ctagcaggag	atttactctt	catgagat	agaacaacta	ctggtgacgc	aatgggtatg	12240
aatatgattt	ctaaggggtg	cgaatactca	ttaaagcaaa	tggtagaaga	gtatggctgg	12300
gaagatatgg	aggttgtctc	cgcttctggt	aactactgta	ccgacaaaaa	accagctgcc	12360
atcaactgga	tcgaaggctg	tggttaagagt	gtcgtcgag	aagctactat	tcctggtgat	12420
gttgtcagaa	aagtgttaaa	aagtgatgtt	tcgcattgg	ttgagttgaa	cattgctaag	12480
aatttggttg	gatctgcaat	ggctgggtct	gttggtgat	ttaacgcaca	tgagctaata	12540
ttagtgcagc	ctgttttctt	ggcattagga	caagatcctg	cacaaaatgt	cgaaagtcc	12600
aactgtataa	cattgatgaa	agaagtggac	ggtgatttga	gaatttccgt	atccatgcca	12660
tccatcgaa	taggtaccat	cggtggtggt	actgttctag	aaccacaagg	tgccatggtg	12720
gacttattag	gtgtaagagg	cccacatgct	accgctcctg	gtaccaacgc	acgtcaatta	12780
gcaagaatat	ttgcctgtgc	cgtcttgcca	ggtgaattat	ccttatgtgc	tgccctagca	12840
gccggccatt	tggttcaaag	tcatatgacc	cacaacagga	aacctgctga	accaacaaaa	12900
cctaacaatt	tgagcgccac	tgatataaat	cgtttgaaag	atgggtccgt	cacctgcatt	12960
aaatcctaaa	cttagtcata	cgtcattggt	attctcttga	aaaagaagca	caacagcacc	13020
atgtgttacg	taaaatattt	actttatagt	ttgtacgtca	taatttcttc	catattacaa	13080
gttcgtgcat	atatagaaag	aattctgttg	ttgtaattgt	cataactatt	gagctttacc	13140
tgaaaattca	acgaaaaaaa	ctcaaaaacc	acatgcttct	cttgagtcac	gcggaggctc	13200
gccggcgttg	gacgagcgaa	tgtgtatatt	agtttaaaaa	gttgatgta	ataaaagtaa	13260
aatttaatat	tttggtatgaa	aaaaaccatt	tttagacttt	ttcttaacta	gaatgctgga	13320
gtagaaatac	gccatctcaa	gatacaaaaa	gcgttacgg	cactgatttg	tttcaaccag	13380
tatatagatt	attattgggt	cttgatcaac	ttctctcaga	catatcagta	acagttatca	13440
agctaaatat	ttacgcgaaa	gaaaaacaaa	tatttttaatt	gtgatacttg	tgaattttat	13500

tttattaagg atacaaagtt aagagaaaac aaaatttata tacaatataa gtaatattca	13560
tatatatgtg atgaatgcag tottaacgag aagacatggc cttggtgaca actctcttca	13620
aaccaacttc agcctttctc aattcatcag cagatgggtc ttcgatttgc aaagcagcca	13680
aagcggcggg ttaaacgcgt ggccgtgccg tc	13712

<210> 53
 <211> 13964
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética: construcción de integración i84026
 <400> 53

gacggcacgg ccacgcgttt aaaccgcca gtgatgtaac taaatacacg attaccatgg	60
aaattaacgt accttttttg tgcgtgtatt gaaatattat gacatattac agaaaggggtt	120
cgcaagtcct gtttctatgc ctttctctta gtaattcacg aaataaacct atgggtttacg	180
aaatgatcca cgaaaatcat gttattattt acatcaacat atcgcgaaaa ttcattgtcat	240
gtccacatta acatcattgc agagcaacaa ttcattttca tagagaaatt tgctactatc	300
accactagt actaccattg gtacctacta ctttgaattg tactaccgct gggcggttatt	360
aggtgtgaaa ccacgaaaag ttcaccataa cttcgaataa agtcgcggaa aaaagtaaac	420
agctattgct actcaaatga ggtttgcaga agcttgttga agcatgatga agcgttctaa	480
acgcactatt catcattaaa tatttaaaagc tcataaaatt gtattcaatt cctattctaa	540
atggcctttta tttctattac aactattagc tctaaatcca tatcctcata agcagcaatc	600
aattctatct atactttaaa cgctcgcca acgcccggcg acctgatgtg tattactagt	660
gtcgacgaca gcattcgccc agtatTTTTT ttattctaca aaccttctat aatttcaaag	720
tatttacata attctgtatc agtttaatca ccataatatc gttttctttg tttagtgc aa	780
ttaatttttc ctattgttac ttcgggcctt tttctgtttt atgagctatt ttttccgtca	840
tccttccgga tccagatttt cagcttcac tccagattgt gtctacgtaa tgcacgccat	900
cattttaaga gaggacctcc cgcgacctcc aaaatcgaaac taccttcaca atgaaacttc	960
ttagtagtat tgagcaggcg tgtgacatct gtagattgaa gaaattgaaa tgtagtaagg	1020
agaagcccaa atgtgcgaaa tgccttaaaa ataattggga atgcagatat agtccgaaga	1080
cgaagcgcag tccccttacc cgcgcgcacc ttacggagggt cgagagtcgc cttgagcgcc	1140
ttgagcaact tttccttctt atcttcccca gagaggattt ggatatgatc ctttaagatgg	1200
acagtcttca agacattaag gcgcttctta cggggctttt cgtgcaggac aacgtcaaca	1260
aggacgcggg gacggaccgc cttgccagtg tcgaaaccga catgccctt acgcttcgcc	1320

aacacccgat	ttccgccacg	agtagtagtg	aggaatcctc	caataagggg	cagcgccaac	1380
ttaccgtgag	tatcgatagt	gcggcccacc	acgacaatag	tacgatcccc	cttgacttca	1440
tgccgcgcga	cgccttgac	gggttcgact	ggagtgagga	agacgatatg	agtgacggtc	1500
ttccgtttct	taagaccgat	ccgaataaca	acggtttttt	cggatgatgg	agtttgcttt	1560
gcattctgag	aagtatcgg	ttcaagcccg	agaactatac	caatagtaat	gtcaatcgct	1620
tgcccacgat	gatcacccg	cgtatatacc	ttgccagtcg	cagtacgacg	agtagacttt	1680
tgcatgctta	cttgaacaac	ttccatccgt	attgtcccat	tgtccatagt	cccaccctta	1740
tgatgcttta	caacaatcaa	atcgagattg	ccagtaaaga	ccagtggcag	attttgctta	1800
attgtattct	tgcatcggtg	gcgtggtgca	ttgaagggtg	gagtaccgac	attgacgtct	1860
tctattacca	gaacgccaa	agtcacctta	cctccaaagt	gtttgaaagt	gggagtatta	1920
tccttgctac	ggcgcttcac	ttgcttagta	gatacacgca	atggcgccaa	aagacgaaca	1980
cctcctacaa	cttccattcc	ttcagtattc	gcattggcgt	tagtcttggt	cttaaccgcg	2040
atttgcgag	tagtttttcc	gactcctcca	tccttgagca	gcgcagaaga	atctggtgga	2100
gtgtgtatag	ttgggaaatt	cagcttagtc	ttttgtacgg	gagaagtatt	caattgagtc	2160
aaaacacgat	tagtttttcc	agtagtgtgg	atgacgtcca	aagaacgacg	acggggccga	2220
cgattttacca	cgggtattat	gagacggcgc	gcttgcttca	ggtctttacg	aagattttacg	2280
agcttgataa	gacgggtgac	gcggagaagt	ccccatttg	cgcaagaag	tgtcttatga	2340
tctgcaacga	aatogaagaa	gtcagtcgcc	aagcgccgaa	attccttcag	atggacatca	2400
gtacgacggc	ccttacgaac	cttcttaaag	agcatccctg	gcttagtttc	acgcgctttg	2460
agcttaaatg	gaagcaactt	agtttgatta	tctacgtgct	tcgcgacttc	tttaccact	2520
tcacgcaaaa	gaaaagtcag	cttgagcaag	accagaacga	ccaccagtcc	tacgaggtca	2580
agagatgtag	tattatgctt	tccgacgcgg	cgcagcgcac	cgtcatgagt	gtgtcctcct	2640
acatggataa	ccacaacgtg	acgcgctact	tcgcgtggaa	ctgcagttac	tatcttttta	2700
acgcggtgct	tgtgccgatt	aaaacccttt	tgagtaatag	taagagtaac	gccgaaaaca	2760
atgaaacggc	gcagcttctt	cagcagatca	ataccgtcct	tatgcttctt	aagaagcttg	2820
cgaccttcaa	gattcaaacc	tgcgagaagt	atatccaggt	gcttgaggaa	gtgtgcgcc	2880
ccttccttct	tagtcaatgc	gcgattccgc	ttccccacat	ttcctacaat	aactccaacg	2940
ggtccgcgat	caagaacatc	gtggggagtg	cgaccattgc	gcagtatccc	accttgcccg	3000
aagagaacgt	gaataacatt	tccgtcaagt	acgtcagtc	cggtagtgtg	ggtcccagtc	3060
ccgtcccgt	taagagtggg	gcgtcctttt	ccgaccttgt	gaaacttctt	agtaatagac	3120
cgccgagtag	aaatagtccg	gtcacgattc	cgcgctccac	gccagtcac	agaagtgtga	3180
cccccttct	tggtcagcaa	cagcaacttc	agagtcttgt	cccgtttacg	cccagtgccc	3240

ttttcggggg tgcgaacttc aaccagtcgc gtaacatcgc cgactccagt cttagtttta	3300
cctttaccaaa ttctccaat gggcccaatt tgattacgac ccagacgaac agtcaggcct	3360
tgagtcagcc gatcgcgagt agtaatgtcc acgacaattt tatgaacaac gagattaccg	3420
cctccaagat cgacgacggg aacaacagta agccgcttag tcccgggtgg accgatcaga	3480
ccgcctacaa tgccttcggg attaccacgg gtatgttcaa caccgaccag atggacgacg	3540
tgtacaatta cctttttgac gacgaggaca cgcgcgcgaa tccgaagaag gaatgagcca	3600
attggtgagg caattgataa taacgaaaat gtcttttaat gatctgggta taatgaggaa	3660
ttttccgaac gtttttactt tatatatata tatacatgta acatatattc tatacgctat	3720
atcgagaaaa cgcgatggtg gggtgacttt caactcggcg tatccccgcg tgcttgccg	3780
gccgtccgca tgactcaaga gaagcatgtg gtttttgagt ttttttcgtt gaattttcag	3840
gtaaagctca atagttatga caattacaac aacagaattc tttctatata tgcacgaact	3900
tgtaatatgg aagaaattat gacgtacaaa ctataaagta aatattttac gtaacacatg	3960
gtgctgttgt gcttcttttt caagagaata ccaatgacgt atgactaagt ttaggattta	4020
atgcagggtga cggaccatc tttcaaacga tttatatcag tggcgtccaa attgttaggt	4080
tttgttggtt cagcagggtt cctgttggtg gtcatatgac tttgaacaa atggccggct	4140
gctagggcag cacataagga taattcacct gccaaagcgg cacaggcaac tattcttgct	4200
aattgacgtg cgttggtacc aggagcggta gcatgtgggc ctcttacacc taataagtc	4260
aacatggcac cttgtggttc tagaacagta ccaccaccga tggtagctac ttcgatggat	4320
ggcatggata cggaaattct caaatcaccg tccacttctt tcatcaatgt tatacagttg	4380
gaactttoga cattttgtgc aggatcttgt cctaagcca agaaaacagc tgtagctaaa	4440
ttagctgcat gtgcgttaaa tccaccaaca gaccagcca ttgcagatcc aaccaaattc	4500
ttagcaatgt tcaactcaac caatgcggaa acatcacttt ttaacacttt tctgacaaca	4560
tcaccaggaa tagtagcttc tgcgacgaca ctcttaccac gaccttcgat ccagttgatg	4620
gcagctgggt ttttgcgggt acagtagtta ccagaaacgg agacaacctc catatcttcc	4680
cagccatact cttctaccat ttgctttaat gagtattcga cacccttaga aatcatattc	4740
ataccatttg cgtcaccagt agttgttcta aatctcatga agagtaaatt tcctgctaga	4800
caagtttgaa tatgttgacg acgtgcaaat cttgatgtag agttaaaagc ttttttaatt	4860
gcgttttgtc cctcttctga gtctaaccat atcttacagg caccagatct tttcaaagtt	4920
gggaaacgga ctactgggac tcttgctata ccatccttag ttaaaacagt tgttgacca	4980
ccgccagcat tgattgcctt acagccacgc atggcagaag ctaccaaaaca accctctgta	5040
gttgccattg gtatatgata agatgtacca tcgataacca aggggcctat aacaccaacg	5100

ggcaaaggca tgtaacctat aacattttca caacaagcgc caaatacgcg gtcgtagtca 5160
 taatttttat atggtaaacg atcagatgct aatacaggag cttctgccaa aattgaaaga 5220
 gccttcctac gtaccgcaac cgctctcgta gtatcaccta attttttctc caaagcgtag 5280
 aaaggttaact taccgtgaat aaccaaggca gcgacctctt tgttcttcaa ttgttttgta 5340
 tttccactac ttaataatgc ttctaattct tctaaaggac gtattttctt atccaagctt 5400
 tcaatatcgc gggaatcatc ttctcacta gatgatgaag gtctgatga gctcgattgc 5460
 gcagatgata aacttttgac tttcgatoca gaaatgactg ttttattggt taaaactggt 5520
 gtagaagcct tttgtacagg agcagtaaaa gacttcttgg tgacttcagt cttaccaat 5580
 tggctctgcag ccattgtaaa gttagtgggt tgcgcgactt cgggtgggggt aagtatagag 5640
 gtatattaac aattttttgt tgatactttt atgacatttg aataagaagt aatacaaac 5700
 gaaaatgttg aaagtattag ttaaagtgggt tatgcagctt ttgcatttat atatctgtta 5760
 atagatcaaa aatcatcgct tcgctgatta attaccccag aaataaggct aaaaaactaa 5820
 tcgcattatt atcctatggt tgtaatttg attcgttgat ttgaagggtt gtggggccag 5880
 gttactgcca atttttctc ttcataacca taaaagctag tattgtagaa tctttattgt 5940
 tcggagcagt gcggcgcgag gcacatctgc gtttcaggaa cgcgaccggt gaagaccagg 6000
 acgcacggag gagagtcttc cgtcggaggg ctgtcgcccg ctcgcggtt tctaaccgt 6060
 acttcaatat agcaatgagc agttaagcgt attactgaaa gttccaaaga gaaggttttt 6120
 ttaggctaag ataatggggc tctttacatt tccacaacat ataagtaaga ttagatatgg 6180
 atatgtatat ggtggtattg ccatgtaata tgattattaa acttctttgc gtccatccaa 6240
 aaaaaaagta acgcacgcac actcccgaca gacaactagc ttgataatgt ctcagaaagt 6300
 ttacattgta tcgactgcca gaacccaat tgggtcattc cagggttctc tatctccaa 6360
 gacagcagtg gaattgggtg ctgttgcttt aaaaggcgcc ttggctaagg ttccagaatt 6420
 ggatgcatcc aaggattttg acgaaattat ttttggtaac gttctttctg ccaatttggg 6480
 ccaagctccg gccagacaag ttgctttggc tgccggtttg agtaatcata tcgttgcaag 6540
 cacagttaac aaggctctgt catccgctat gaaggcaatc attttgggtg ctcaatccat 6600
 caaatgtggt aatgctgatg ttgtcgtagc tgggtggtgt gaatctatga ctaacgcacc 6660
 atactacatg ccagcagccc gtgcgggtgc caaatttggc caaactgttc ttgttgatgg 6720
 tgtcgaaaga gatgggttga acgatgcgta cgatggtcta gccatgggtg tacacgcaga 6780
 aaagtgtgcc cgtgattggg atattactag agaacaacaa gacaattttg ccatcgaatc 6840
 ctacccaaaa tctcaaaaat ctcaaaagga aggtaaatc gacaatgaaa ttgtacctgt 6900
 taccattaag ggatttagag gtaagcctga tactcaagtc acgaaggacg aggaacctgc 6960
 tagattacac gttgaaaaat tgagatctgc aaggactgtt ttccaaaaag aaaacggtac 7020

tggtactgcc gctaacgctt ctccaatcaa cgatggtgct gcagccgtca tcttggtttc	7080
cgaaaaagtt ttgaaggaaa agaatttgaa gcctttggct attatcaaag gttgggggtga	7140
ggccgctcat caaccagctg attttacatg ggctccatct cttgcagttc caaaggcttt	7200
gaaacatgct ggcatcgaag acatcaattc tggtgattac tttgaattca atgaagcctt	7260
ttcggttgct gggttggtga aactaagat tttgaagcta gaccatcta aggttaatgt	7320
atatggtggt gctgttgctc taggtcaccg attgggttgt tctggtgcta gagtgggtgt	7380
tacactgcta tccatcttac agcaagaagg aggtaagatc ggtgttgccg ccatttgtaa	7440
tggtgggtgt gggtgcttct ctattgtcat tgaaaagata tgattacggt ctgcgatttt	7500
ctcatgatct ttttcataaa atacataaat atataaatgg ctttatgtat aacaggcata	7560
atttaaagtt ttatttgca ttcatcggtt ttcagggtact caaacgctga ggtgtgcctt	7620
ttgacttact tttccgcctt ggcaagctgg ccgaacctgc aggcgcgag cgccgatacg	7680
aaaatcgta ttgtcttgaa ggtgaaattt ctactcttat taatggtgaa cgtaagctg	7740
atgctatgat ggaagctgat tgggtctaac ttgcttgta tcttgcta atggtcattggc	7800
tcgtgttatt acttaagtta tttgtactcg ttttgaacgt aatgctaata atcatcttat	7860
ggaataatag tgagtgggtt caggggtccat aaagcttttc aattcatctt tttttttttt	7920
gttctttttt ttgattccgg tttctttgaa atttttttga ttcggtaatc tccgagcaga	7980
aggaagaacg aaggaaggag cacagactta gattggtata tatacgcata tgtggtgttg	8040
aagaaacatg aaattgccc gtattcttaa cccaactgca cagaacaaaa acctgcagga	8100
aacgaagata aatcatgtcg aaagctacat ataaggaacg tgctgctact catcctagtc	8160
ctgttgctgc caagctattt aatatcatgc acgaaaagca aacaaacttg tgtgcttcat	8220
tggatgttcg taccaccaag gaattactgg agttagttga agcattaggt cccaaaattt	8280
gtttactaaa aacacatgtg gatattctga ctgatttttc catggagggc acagttaagc	8340
cgctaaaggc attatccgcc aagtacaatt ttttactctt cgaagacaga aaatttgctg	8400
acattggtaa tacagtcaaa ttgcagtact ctgcgggtgt atacagaata gcagaatggg	8460
cagacattac gaatgcacac ggtgtggtgg gccaggtat tgtagcggg ttgaagcagg	8520
cggcggaaga agtaacaaag gaacctagag gccttttgat gtagcagaa ttgtcatgca	8580
agggctccct agctactgga gaataacta agggtagtgt tgacattgag aagagtgaca	8640
aagattttgt tatcggtttt attgctcaaa gagacatggg tggaagagat gaaggttacg	8700
attggttgat tatgacaccc ggtgtgggtt tagatgacaa gggagacgca ttgggtcaac	8760
agtatagaac cgtggatgat gtggtctcta caggatctga cattattatt gttggaagag	8820
gactatttgc aaagggaagg gatgctaagg tagagggtga acgttacaga aaagcaggct	8880

gggaagcata tttgagaaga tgcggccagc aaaactaaaa aactgtatta taagtaaag 8940
 catgtataact aaactcacia attagagctt caatttaatt atatcagtta ttaccacgaa 9000
 aatcggtatt gtcttgaagg tgaaatttct actcttatta atgggtgaacg ttaagctgat 9060
 gctatgatgg aagctgattg gtcttaactt gcttgtcatc ttgctaattg tcatatggct 9120
 cgtgttatta cttaagttat ttgtactcgt tttgaacgta atgctaataga tcatcttatg 9180
 gaataatagt gaacggccgg ccaagcacgc ggggattgaa tgagaaaaaa aatcggttgg 9240
 gcttaacttt aaagaaaaaa gttgagatta gatttattgt gttataaata tagatataca 9300
 attctttata aaaaaaatat atatatatat cattgttatt aaataaagag ttttcctagt 9360
 atatagatta aaaaactact ctattaaatg agagctaaaa aaagcaggct gccaaaaaaa 9420
 taaagcattt atgaaggggg ttacgcaaga tgcaatcgat gggggaagat tattttttta 9480
 catcgtaaga tcttctaaat ttgtcatcga tgttggtcaa gtagtaaaaca ccactttgca 9540
 aatgctcaat ggaaccttga ggtttgaagt tcttctcaa atgggcattt tctctcaatt 9600
 cgatggcagc ttcgtaatcc tttggagttt cgggtgattct cttggctaatt ttgttagtaa 9660
 tatctaattc cttgataata tgttgagcgt caccaacaat tttgcaagaa tatagagatg 9720
 cagctaaaac ggaaccgtaa gaaaataaac caacacgctt gccttgtaag tcgtcagatc 9780
 caacatagtt taatagagat gcaaaggcgg cataaacaga tgcggtgtac atgttacctg 9840
 tgtttgttgg aacaatcaaa gattgggcaa ctctctctt gtggaatggc ttagcaacat 9900
 taacaaaagt tttttcaatg ttcttatcgg ttaaagattc gtcataatcg cgagtagcta 9960
 attcggcgtc aacttctggg aacaattgag gattggctct gaaatcgta tatagtaatc 10020
 taccgtatga ttttgtgacc aatttacagg ttggaacatg gaaaacgttg tagtcgaaat 10080
 atttcaaac gttcaaagca tccgaaccag cgggatcgct aaccaaccct ttagaaatag 10140
 ccttcttggg ataactcttg taaacttgat caagagcctt gacgtaacaa gttaatgaaa 10200
 aatgaccatc gacgtaagga tattcgtcgg tgaaatctgg cttgtaaaaa tcgtaggcgt 10260
 gttccatgta agaagctctt acagagtcaa atacaattgg agcatcagga ccgatccaca 10320
 tagcaacagt accggcacca ccggttggtc ttgcggcacc cttatcgtag atggcaatat 10380
 caccgcaaac tacaatggcg tctctaccat cccatgcgtt agattcaatc cagttcaaag 10440
 agttgaacaa cgcgttggtg ccaccgtaac aggcatatag cgtgtcaata ccttcgacgt 10500
 cagtgttttc accaaacaat tgcatacaga cagacttgac agacttggac ttgtcaatca 10560
 gagtttcagt accgacttct aatctaccaa ttttgttggg gtcgatgttg taactcttga 10620
 tcaacttaga caaacacagt agggacatcg agtagatata ttctctgtca ttgacaaaag 10680
 acatgttggg ttggcccaga ccaattgtgt atttaccttg agaaacgcca tcaaatttct 10740
 ctagctcaga ttggttgaca cattgagttg ggatgtaaat ttggatacct ttaataccga 10800

cattttgagg	tctggttttt	tgttcagcgg	tcttttggtt	ttttagttca	gtcatttgca	10860
agtttgatt	gtgtaattgt	tggtgctttt	gcggcctaag	tcttccttta	ataccacacc	10920
aacaaagttt	agttgagagt	ttcattgtga	aggtagtctg	atgttgagg	tcgcgggagg	10980
ttactttttt	tttgatgga	cgcaaagaag	tttaataatc	atattacatg	gcaataccac	11040
catatacata	tccatatcta	atcttactta	tatgttggtg	aatgttaaag	agccccatta	11100
tcttagccta	aaaaaacctt	ctctttggaa	ctttcagtaa	tacgcttaac	tgctcattgc	11160
tatattgaag	tacggattag	aagccgccga	gcgggcgaca	gccctccgac	ggaagactct	11220
cctcgtgcg	tcctggtctt	caccggctgc	gttcctgaaa	cgcagatgtg	cctcgcgcgc	11280
cactgctccg	aacaataaag	attctacaat	actagctttt	atggttatga	agaggaaaaa	11340
ttggcagtaa	cctggcccca	caaaccttca	aatcaacgaa	tcaaattaac	aaccatagga	11400
taataatgcg	attagttttt	tagccttatt	tctggggtaa	ttaatcagcg	aagcgatgat	11460
ttttgatcta	ttacagata	tataaatgca	aaagctgcat	aaccacttta	actaatactt	11520
tcaacatttt	cggtttgtat	tacttcttat	tcaaattgtc	taaaagtatc	aacaaaaaat	11580
tgtaatatata	cctctatact	tacccacccc	gaagtcgcgc	aaccaactaa	ctttacaatg	11640
gctgcagacc	aattggtgaa	gactgaagtc	accaagaagt	cttttactgc	tcctgtacaa	11700
aaggcttcta	caccagtttt	aaccaataaa	acagtcattt	ctggatcgaa	agtcaaaagt	11760
ttatcatctg	cgcaatcgag	ctcatcagga	ccttcatcat	ctagttagga	agatgattcc	11820
cgcgatattg	aaagcttgga	taagaaaata	cgtccttttag	agaattaga	agcattatta	11880
agtagtgga	atacaaaaca	attgaagaac	aaagaggtcg	ctgccttggt	tattcacggt	11940
aagttacott	tgtacgcttt	ggagaaaaaa	ttaggtgata	ctacgagagc	ggttgcggtta	12000
cgtaggaagg	ctctttcaat	tttggcagaa	gctcctgtat	tagcatctga	tcgtttacca	12060
tataaaaatt	atgactacga	cgcggtattt	ggcgcttggt	gtgaaaatgt	tataggttac	12120
atgcctttgc	ccgttggtgt	tataggcccc	ttggttatcg	atggtacatc	ttatcatata	12180
ccaatggcaa	ctacagaggg	ttggttggtta	gcttctgcc	tgcggtggctg	taaggcaatc	12240
aatgctggcg	gtggtgcaac	aactgtttta	actaaggatg	gtatgacaag	aggcccagta	12300
gtccgtttcc	caactttgaa	aagatctggt	gcctgtaaga	tatggttaga	ctcagaagag	12360
ggacaaaacg	caattaaaaa	agcttttaac	tctacatcaa	gatttgcacg	tctgcaacat	12420
attcaaaact	gtctagcagg	agatttactc	ttcatgagat	ttagaacaac	tactggtgac	12480
gcaatgggta	tgaatatgat	ttctaagggt	gtcgaatact	cattaaagca	aatggtagaa	12540
gagtatggct	gggaagatat	ggagggtgtc	tccgtttctg	gtaactactg	taccgacaaa	12600
aaaccagctg	ccatcaactg	gatcgaagg	cgtggtaaga	gtgtcgtcgc	agaagctact	12660

attcctggtg atgttgtcag aaaagtgtta aaaagtgatg tttccgcatt ggttgagttg 12720
aacattgcta agaatttggg tggatctgca atggctgggt ctgttggtgg atttaacgca 12780
catgcagcta atttagtgac agctgttttc ttggcattag gacaagatcc tgcacaaaat 12840
gtcgaaagtt ccaactgtat aacattgatg aaagaagtgg acggtgattt gagaatttcc 12900
gtatccatgc catccatcga agtaggtacc atcgggtggg gtactgttct agaaccacaa 12960
ggtgccatgt tggacttatt aggtgtaaga ggcccatatg ctaccgctcc tggtagcaac 13020
gcacgtcaat tagcaagaat agttgcctgt gccgtcttgg caggtgaatt atccttatgt 13080
gctgccctag cagccggcca tttggttcaa agtcatatga cccacaacag gaaacctgct 13140
gaaccaacaa aacctaacaa tttggacgcc actgatataa atcgtttgaa agatgggtcc 13200
gtcacctgca ttaaactcta aacttagtca tacgtcattg gtattctctt gaaaaagaag 13260
cacaacagca ccatgtgtta cgtaaaatat ttactttata gtttgtacgt cataatttct 13320
tccatattac aagttcgtgc atatatagaa agaattctgt tgttgtaatt gtcataacta 13380
ttgagcttta cctgaaaatt caacgaaaaa aactcaaaaa ccacatgctt ctcttgagtc 13440
atgcggaggt cgcgcggcgt tggacgagcg aatgtgtata ttagtttaaa aagttgtatg 13500
taataaaaagt aaaatttaat attttggatg aaaaaaacca tttttagact ttttcttaac 13560
tagaatgctg gagtagaaat acgccatctc aagatacaaa aagcgttacc ggcactgatt 13620
tgtttcaacc agtatataga ttattattgg gtcttgatca actttcctca gacatatcag 13680
taacagttat caagctaaat atttacgca aagaaaaaca aatattttaa ttgtgatact 13740
tgtgaatttt attttattaa ggatacaaag ttaagagaaa acaaaattta tatacaatat 13800
aagtaatatt catatatatg tgatgaatgc agtcttaacg agaagacatg gccttgggtga 13860
caactctctt caaaccaact tcagcctttc tcaattcctc agcagatggg tcttcgattt 13920
gcaaagcagc caaagcggcg gtttaaacgc gtggcctgct cgtc 13964

<210> 54
<211> 13963
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcción sintética: construcción de integración i85207

<400> 54

gacggcacgg ccacgcgttt aaaccgccag ggcaagggtg gcctctactt actccatcga 60
caattcaaga tacagaacct cctccagatg gaatcccttc catagagaga aggagcaagc 120
aactgacca atattgactg ccaactggacc tgaagacatg caacaaagtg caagcatagt 180
ggggccttct tccaatgcta atccggtcac tgccactgct gctacggaaa accaacctaa 240
aggtattaac ttcttcacta taagaaaatc acacgagcgc ccggacgatg tctctgttta 300

aatggcgcaa gttttccgct ttgtaatata tattttatacc cttttcttct ctccccgtca	360
atataatagt ttaattctaa tattaataat atcctatatt ttcttcattt accggcgcac	420
tctcgccga acgacctcaa aatgtctgct acattcataa taaccaaag ctcataactt	480
ttttttttga acctgaatat atatacatca catgtcactg ctggtccttg ccgaccagcg	540
tatacaatct cgatagttgg tttcccgttc tttccactcc cgtccgctcg tccaacgccg	600
gcggaccttc acatgtaggg accgaattgt ttacaagttc tctgtaccac catggagaca	660
tcaaagattg aaaatctatg gaaagatatg gacggtagca acaagaatat agcacgagcc	720
gcgaagtcca tttcgttact tttgatatcg ctcaacaacta ttgcgaagcg cttcagtcaa	780
aaaatcataa ggaaaagttg taaatattat tggtagtatt cgtttggtta agtagagggg	840
gtaatttttc ccttttattt tgttcataca ttcttaaatt gctttgcctc tccttttgga	900
aagctatact tcggagcact gttgagcgaa ggctcattag atatattttc tgtcattttc	960
cttaacccaa aaataaggga aagggtccaa aaagcgctcg gacaactgtt gaccgtgac	1020
cgaaggactg gctatacagt gttcacaaaa tagccaagct gaaaataatg tgtagctatg	1080
ttcagttagt ttggctagca aagatataaa agcaggtcgg aaatatttat gggcattatt	1140
atgcagagca tcaacatgat aaaaaaacct cccgcgacct ccaaaatcga actacctca	1200
caatgactgc cgacaacaat agtatgcccc atggtgcagt atctagttac gccaaattag	1260
tgcaaaacca aacacctgaa gacatttttg aagagtttcc tgaaattatt ccattacaac	1320
aaagacctaa taccgatct agtgagacgt caaatgacga aagcggagaa acatgttttt	1380
ctggctcatga tgaggagcaa attaatgtaa tgaatgaaaa ttgtattgtt ttggattggg	1440
acgataatgc tattggtgcc ggtaccaaga aagtttgtca tttaatggaa aatattgaaa	1500
agggtttact acatcgtgca ttctccgtct ttattttcaa tgaacaaggt gaattacttt	1560
tacaacaaag agccactgaa aaaataactt tccctgatct ttggactaac acatgctgct	1620
ctcatccact atgtattgat gacgaattag gtttgaaggg taagctagac gataagatta	1680
agggcgctat tactcgggcg gtgagaaaac tagatcatga attaggtatt ccagaagatg	1740
aaactaagac aagggtgaag tttcactttt taaacagaat ccattacatg gcaccaagca	1800
atgaaccatg ggggtgaacat gaaattgatt acatcctatt ttataagatc aacgctaaag	1860
aaaacttgac tgtcaaccca aacgtcaatg aagttagaga cttcaaatgg gtttcaccaa	1920
atgatttgaa aactatgttt gctgacccaa gttacaagtt tacgccttgg tttaagatta	1980
tttgcgagaa ttacttattc aactggtggg agcaattaga tgacctttct gaagtggaaa	2040
atgacaggca aattcataga atgctataac aacgcgtcaa taatataggc tacataaaaa	2100
tcataataac tttgttatca tagcaaatg tgatataaaa cgtttcattt cacctgaaaa	2160

atagtaaaaa taggcgacaa aaatccttag taatatgtaa actttatttt ctttatttat	2220
ttacagaact ctgaatatac attgattgtt cacatTTTTT ttttctcttc tcaatttccc	2280
ttgattatat tcaaaagggtt attggcctct tgaatgtttc ccactgaatc ccgcggtgct	2340
tggccggccg tggagcgacc tcatgctata cctgagaaag caacctgacc tacaggaaag	2400
agttactcaa gaataagaat tttcgtttta aaacctaaga gtcactttaa aatttgtata	2460
cacttatttt ttttataact tatttaataa taaaaatcat aaatcataag aaattcgctc	2520
aaacgaccat tggatggaca aagaaggact tcatgtaaga tttcatgtca ccttcggcgt	2580
gagtgaacc atcgtaaca gagtataaaa cttcacacat tctagccaag ttgatagctg	2640
gcattaacaa agggaatgga acggcggttg gtctcaaaga ttctctgtta ataaccttc	2700
aggcgtcttc gacttttcta gagatgtatt cacaggcttc ttcttcagaa gcaccggatt	2760
ccttagaata acattcgatg gaggaggcaa catgacctct ttcttggtct tctttatgag	2820
agacaatatc atccatcaat ctaatgataa cacaagaagc ttcaacaata ggtgggtagg	2880
aagaaaccca tttaaaagtg tcctcgtaa caatgtcacc tctaccaacg taagatctag	2940
cagtgatcaa accgtaggta ccggtaacca tggaaacaga catgtactct tocaaagtag	3000
gcatgtaacc ttctttcaac catctggctt caaccaagta gtttctgacc aattccttag	3060
ccatttcctt aacgtagtgg atttgataag ccttaccttc cttttctaaa gattcttcca	3120
tttcaacgtg caagttaacc aattcttggt agatcaactt catgtattct ggcaacatgt	3180
ccaaacaaga aatggaccac ttctcaacgg cttgagtga aatttccaat tcttcgtagg	3240
taccgtagtt gtcgaaggta tcatccaaaa cgaccaacca catacaagac ttcatcaaga	3300
acattctggt tctggcatgt tgtggttcat agtaaataga caaaatccag aagtaacctt	3360
cgacaactct atcacgaacg aatggcaatt tgttttgcaa gtctaaatct ttccaccact	3420
tgcagatgtg agacaattct ttcttatgca tggattgcaa aacagagaaa tctaacttag	3480
ccaacttcaa caaaacctcg tcgtgagaag tttcttggtg gtaaattggc atatagtgt	3540
aagcttcgat tctggccaat cttcttctca atggttgctt caaggcttgg tggatttggg	3600
ttcttaagga agagtcacaa gatggatcct tggcaataat gtccaagtga accttagaga	3660
attccaaagc gttgtccaag atggtttcat ctctgactct catgaaagca gcttcgtaca	3720
aggccaagat accttgagcg tcgttacaca aagattcctt aaatttacct ttttcgtcca	3780
taaagtcctt gaaaacacca gaggagacat tgaaaccttg ttgacgcaac aaacgaaacc	3840
acaaggagat agattgtaaa ttttcttat cgaccttgg ttcacctgaa gtgacatgga	3900
tatgttgtaa agcttcttcg atttcttctt caaaatggta agcaatacct aaacgttgaa	3960
cagcattgat taattcgatc aacttaacat gttgcatagg ttcgtagaa cccttaatag	4020
taatcaattc cttcttaact tcctccttta actcttcgac taattgcttc ttcataacca	4080

agtcctctgg ttcacgttaa gtcaaaaatt gatcacccca aatggaagcg ttgaagtttag 4140
 cggatgtctc aataacgtct ggcttggttag aatccttatt atcgacaaca attggggaag 4200
 tagatggaga ggaagaaaca gaggaatatag gcaaagtgga cattgtaaaag ttagttgggtt 4260
 gcgcgacttc ggggtggggtg agtatagagg tatattaaca attttttgtt gatactttta 4320
 tgacatttga ataagaagta atacaaaccg aaaatgttga aagtattagt taaagtgggtt 4380
 atgcagcttt tgcatttata tatctgttaa tagatcaaaa atcatcgctt cgctgattaa 4440
 ttaccccaga aataaggcta aaaaactaat cgcattatta tcctatgggtt gtttaattga 4500
 ttcggtgatt tgaaggtttg tggggccagg ttactgcca tttttcctct tcataacccat 4560
 aaaagctagt attgtagaat ctttattgtt cggagcagtg cggcgcgagg cacatctgcg 4620
 tttcaggaac gcgaccggtg aagaccagga cgcacggagg agagtcttcc gtcggagggc 4680
 tgtcgcccg cggcggtctt ctaatccgta cttcaatata gcaatgagca gtttaagcgta 4740
 ttactgaaag ttccaaagag aaggtttttt taggctaaga taatggggct ctttacattt 4800
 ccacaacata taagtaagat tagatatgga tatgtatatg gtggtattgc catgtaatat 4860
 gattattaaa cttctttgcg tccatccaaa aaaaaagtaa cgcacgcaca ctcccgacag 4920
 acaactagct tgataatggc ttcagaaaaa gaaattagga gagagagatt cttgaacgtt 4980
 ttccctaaat tagtagagga attgaacgca tcgcttttgg cttacggtat gcctaaggaa 5040
 gcatgtgact ggtatgccca ctcatgaac tacaacactc caggcggtaa gttaaataga 5100
 ggtttgtccg ttgtggacac gtatgtatt ctctccaaca agaccgttga acaattgggg 5160
 caagaagaat acgaaaaggt tgctattcta ggttggtgca ttgagttgtt gcaggcttac 5220
 ttcttggtcg ccgatgatat gatggacaag tccattacca gaagaggcca accatgttgg 5280
 tacaaggttc ctgaagttgg ggaaattgcc atcaatgacg cattcatgtt agaggctgct 5340
 atctacaagc ttttgaaatc tcacttcaga aacgaaaaat actacataga tatcaccgaa 5400
 ttgttccatg aagtcacctt ccaaaccgaa ttgggccaat tgatggactt aatcactgca 5460
 cctgaagaca aagtcgactt gagtaagttc tccctaaaga agcactcctt catagttact 5520
 ttcaagactg cttactattc tttctacttg cctgtcgcat tggctatgta cgttgccggt 5580
 atcacagatg aaaaggattt gaaacaagcc agagatgtct tgattccatt gggatgaatat 5640
 ttccaaattc aagatgacta cttagactgc ttcggtaccc cagaacagat cggtaagatc 5700
 ggtacagata tccaagataa caaatgttct tgggtaatca acaaggcatt agaacttgct 5760
 tccgcagaac aaagaaagac tttagacgaa aattacggta agaaggactc agtcgcagaa 5820
 gccaaatgca aaaagatttt caatgacttg aaaatcgacc agttatacca cgaatatgaa 5880
 gagtctgttg ccaaggattt gaaggccaag atctcccaag tcgacgagtc tcgtggcttc 5940

aaagccgacg tcttaactgc gtttttgaac aagggtttaca agagaagtaa atagaactaa	6000
cgctaactga taaaacatta gatttcagat tagataagga ccatgtataa gaaatatata	6060
cttcactat aatatagtat aagcttacag atagtatctc tcgatctacc gttccacgtg	6120
actagtccaa gaacctgcag gccgcgagcg ccgatacgaa aatcggtatt gtcttgaagg	6180
tgaattttct actcttatta atggtgaacg ttaagctgat gctatgatgg aagctgattg	6240
gtcttaactt gcttgtcatc ttgctaattg tcattggctc gtgttattac ttaagttatt	6300
tgtactcgtt ttgaacgtaa tgctaattgat catcttatgg aataatagtg agtggtttca	6360
gggtccataa agcttttcaa ttcattcttt ttttttttgt tctttttttt gattccgggt	6420
tctttgaaat ttttttgatt cggtaattct cgagcagaag gaagaacgaa ggaaggagca	6480
cagacttaga ttggtatata tacgcatatg tgggtgtgaa gaaacatgaa attgcccagt	6540
attcttaacc caactgcaca gaacaaaaac ctgcaggaaa cgaagataaa tcatgtcgaa	6600
agctacatat aaggaacgtg ctgctactca tcctagtcct gttgctgcc aagctatttaa	6660
tatcatgcac gaaaagcaaa caaacttgtg tgcttcattg gatgttcgta ccaccaagga	6720
attactggag ttagttgaag cattaggtcc caaaatttgt ttactaaaaa cacatgtgga	6780
tatcttgact gatttttcca tggagggcac agttaagccg cttaaaggcat tatccgccaa	6840
gtacaatttt ttactcttcg aagacagaaa atttgctgac attggttaata cagtcaaatt	6900
gcagtactct gcgggtgtat acagaatagc agaatgggca gacattacga atgcacacgg	6960
tgtggtgggc ccagggtattg ttagcgggtt gaagcaggcg gcggaagaag taacaaagga	7020
acctagaggc cttttgatgt tagcagaatt gtcattgcaag ggctccctag ctactggaga	7080
atatactaag ggtactgttg acattgcgaa gaggtagaaa gattttgtta tcggctttat	7140
tgctcaaaga gacatgggtg gaagagatga aggttacgat tgggtgatta tgacacccgg	7200
tgtgggttta gatgacaagg gagacgcatt ggggtcaacag tatagaaccg tggatgatgt	7260
gggtctctaca ggatctgaca ttattattgt tggaagagga ctatttgcaa agggaaggga	7320
tgctaaggta gaggtgaac gttacagaaa agcaggctgg gaagcatatt tgagaagatg	7380
cggccagcaa aactaaaaaa ctgtattata agtaaattgca tgtatactaa actcacaat	7440
tagagcttca atttaattat atcagttatt accacgaaaa tcggtattgt cttgaagggtg	7500
aaattttctac tcttattaat ggtgaacgtt aagctgatgc tatgatggaa gctgattggt	7560
cttaacttgc ttgtcatctt gctaattggtc atatggctcg tgttattact taagttattt	7620
gtactcgttt tgaacgtaat gctaattgat atcttatgga ataatagtga atcggcgctc	7680
gcggcctgca ggtttcctca tcctagtatg tatagcttgt acccattaaa cgaattttat	7740
catgccgcg aaaggaacaa tttcaagtac tatcggaaga tgaatggta gatgttaagc	7800
gcggtcactt caaacttcac atttataaag atgtcacatg gaccactatt atctacctta	7860

agttatattat caagataagt ttccggatct ttttctttcc taacacccca gtcagcctga	7920
gttacatcca gccattgaac cttagaaaat cttttgtcat cagcggtttg agccctaaga	7980
tcaacatcctt gcttagcaat cactgcaatg gcgtcataac caccagcacc aggtattaag	8040
caagtaagaa ctcccttttaa ggtctggcaa tcatccaata agctagtttg tacgggaggt	8100
tcgatatcgg caccagattc tttagttatt tttctaaagg aacgtctaata tgtggcaact	8160
gcactctctaa cttctgtgat ctcaggatac ttttgacagg tacagtcatt cctctcaaga	8220
gactcaaata tctgatcgtc gtaatcgtca tgagtcctgt gtaagcgtc tagtttagat	8280
agtccatcca taaatctaga atttgcatga tcgagttctg tataatattt caagctttcc	8340
ggcatatgag aatcatacca attttttacc ttctggacca gttttactgt ttctgaacca	8400
ttcttaatat cgcccatcca taaagttaat cccgaaggta aatggttact tttaatcgtt	8460
atattccagt cttcttcatt aaccaaagtc gccagtttac tgccgtaagt agcacttcca	8520
atatctggca aattagagat taatgcgggt gggaatcttc tataatctgat agatccatat	8580
gctgcgcgcg ctacatcaaa ccgccttcca attttaccct gagcttgaca atgagcaact	8640
tgtgataaat tatgaataac ttctctatat ttgtctacat tattttccag gtccgataca	8700
aaaaaggagg ccaaagctgt agttaaaact gtgactaaac ctgccgagga gccagccct	8760
gttttgggaa cttcttcaat tctgtgcgaa tgaaaactca atcttctgtt gccacgatgt	8820
tcggtaacgc tgtcctcctg agaatggtag gcatcatcag agaaaatata aataacgaac	8880
aagtttctat tgcagtagtc gtccatgta ggcttaaagt agctaaatac gttagcgata	8940
actttttcaa tgaaagggtt cttagatccg cctatcgaaa caggaatgaa gccagtttta	9000
ggacttatat ggtacagcca ctcccatct ttaaattggt tacttttcac acgcacttca	9060
aacttatcag actcttgcaa tgaaccgtaa ggatgggcta cagcatgcat tcttgccgat	9120
aatccgacta caaatgcttc atatttcgga tctaaaacta aatatccacc agctagtaac	9180
gctttccctg gggcactgaa ggctctcaac tctgacatta tcaagctagt tgtctgtcgg	9240
gagtggtcgt gcgttttttt atcatgttga tgctctgcat aataatgccc ataaatattt	9300
ccgacctgct tttatatctt tgctagccaa actaactgaa catagctaca cattattttc	9360
agcttggtta ttttgtgaac actgtatagc cagtccttcg gatcacggtc aacagttgtc	9420
cgagcgcttt ttggaccctt tcccttattt ttgggttaag gaaaatgaca gaaaatatat	9480
ctaagagcc ttcgctcaac agtgctccga agtatagctt tccaaaagga gaggcaaagc	9540
aatttaagaa tgtatgaaca aaataaagg gaaaaattac cccctctact ttaccaaacg	9600
aatactacca ataataattt caacttttcc ttatgatttt ttactgaag cgcttcgcaa	9660
tagttgtgag cgatatcaaa agtaacgaaa tgaacttcgc ggctcgtgct atattcttgt	9720

tgctaccgtc catatctttc catagatttt caatctttga tgtctccatg gtggtacaga	9780
gaacttgtaa acaattcggg ccctacatgt gaacggccgg ccaagcacgc ggggatccga	9840
agcatgtagg gaggtcatga tatgaaaaag caaaagagta ggcatacaaa agtttctcat	9900
tcaagtggta actgctgtta aaattaagat atttataaat tgaagcttg tcttccgac	9960
caataccgta gggaaacgta aattagctat tgtaaaaaaa ggaaaagaaa agaaaagaaa	10020
aatgttacat atcgaattga tcttattcct ttggtagacc agtctttgcg tcaatcaaag	10080
attcgtttgt ttcttggtgg cctgaaccga cttgagttaa aatcactctg gcaacatcct	10140
tttgcaactc aagatccaat tcacgtgcag taaagttaga tgattcaaat tgatggttga	10200
aagcctcaag ctgctcagta gtaaatttct tgtcccatcc aggaacagag ccaacaatt	10260
tatagataaa tgcaaagagt ttcgactcat ttccagctaa gtagtacaac acagcatttg	10320
gacctgcac aaacgtgtat gcaacgattg tttctccgta aaactgatta atggtgtggc	10380
accaactgat gatacgttg gaagtgtcat tcatgtagaa tattggaggg aaagagtcca	10440
aacatgtggc atggaaagag ttggaatcca tcattgtttc ctttgcaaag gtggcgaaat	10500
ctttttcaac aatggcttta cgcatactt caaatctctt tggtagaca tgttcaattc	10560
tttctttaaa tagttcggag gttgccacgg tcaattgcat accctgagtg gaactcacat	10620
cctttttaat atcgtgcaca actaggacac aagctttcat ctgaggccag tcagagctgt	10680
ctgcgatttg tactgccatg gaatcatgac catcttcagc ttttccatt tccaggcca	10740
cgtatccgcc aaacaacgat ctacaagctg aaccagacc ctttcttgct attctagata	10800
tttctgaagt tgactgtggt aattggtata acttagcaat tgcaagagacc aatgcagcaa	10860
agccagcagc ggaggaagct aaaccagctg ctgtaggaaa gttattttcg gagacaatgt	10920
ggagtttcca ttgagataat gtgggcaatg aggcgtcctt cgattccatt tcccttttta	10980
attggcgtag gtgcgcgaga caattttgag ttctttcatt gtcgatgctg tgtggtctc	11040
catttaacca caaagtgtcg cgttcaaact caggtgcagt agccgcagag gtcaacgttc	11100
tgaggtcatc ttgcgataaa gtcactgata tggacgaatt ggtgggcaga ttcaacttcg	11160
tgtccctttt cccccaatac ttaagggttg cgatgttgac ggggtgcggt acggatgctg	11220
tgtaaacggg cattgtgaag gtagttcgat ttgagggtc gcgggaggtt actttttttt	11280
tggtatggag caaagaagtt taataatcat attacatggc aataccacca tatacatatc	11340
catatctaata cttacttata tggtgtggaa atgtaaagag cccattatc ttagcctaaa	11400
aaaaccttct ctttggaact ttcaagtaata cgcttaactg ctcatgtcta tattgaagta	11460
cggattagaa gccgccgagc gggcgacagc cctccgacgg aagactctcc tccgtgcgtc	11520
ctggtcttca ccggtcgcgt tcctgaaacg cagatgtgcc tcgcgccgca ctgctccgaa	11580
caataaagat tctacaatac tagcttttat ggttatgaag aggaaaaatt ggcagtaacc	11640

tggccccaca aaccttcaaa tcaacgaatc aaattaacaa ccataggata ataatgcgat	11700
tagtttttta gccttatttc tggggttaatt aatcagcgaa gcgatgattt ttgatctatt	11760
aacagatata taaatgcaaa agctgcataa ccactttaac taatactttc aacattttcg	11820
gtttgtatta cttcttattc aaatgtcata aaagtatcaa caaaaaattg ttaatatacc	11880
tctatactta cccaccgga agtcgcgcaa ccaactaact ttacaatgtc attaccgttc	11940
ttaacttctg caccgggaaa gggttattatt tttgggtgaac actctgctgt gtacaacaag	12000
cctgccgtcg ctgctagtgt gtctgcgttg agaacctacc tgctaataag cgagtcactc	12060
gcaccagata ctattgaatt ggacttcccg gacattagct ttaatcataa gtgggtccatc	12120
aatgatttca atgccatcac cgaggatcaa gtaaacctcc aaaaattggc caaggctcaa	12180
caagccaccg atggcttgct tcaggaactc gttagtcttt tggatccgtt gttagctcaa	12240
ctatccgaat ccttccacta ccatgcagcg ttttggttcc tgtatatgtt tgtttgccta	12300
tgcccccatg ccaagaatat taagttttct ttaaagtcta ctttaccat cggtgctggg	12360
ttgggctcaa ggcctctat ttctgtatca ctggccttag ctatggccta cttggggggg	12420
ttaataggat ctaatgactt ggaaaagctg tcagaaaacg ataagcatat agtgaatcaa	12480
tgggccttca taggtgaaaa gtgtattcac ggtaccctt caggaataga taacgctgtg	12540
gccacttatg gtaatgccct gctatttgaa aaagactcac ataatggaac aataaacaca	12600
aacaatttta agttcttaga tgatttccca gccattocaa tgatcctaac ctatactaga	12660
attccaaggt ctacaaaaga tcttggtgct cgcgttcgtg tgttggtcac cgagaaattt	12720
cctgaagtta tgaagccaat tctagatgcc atgggtgaat gtgccctaca aggcttagag	12780
atcatgacta agttaagtaa atgtaaaggc accgatgacg aggctgtaga aactaataat	12840
gaactgtatg aacaactatt ggaattgata agaataaatc atggactgct tgtctcaatc	12900
gggtgtttctc atcctggatt agaacttatt aaaaatctga gcgatgattt gagaattggc	12960
tccacaaaac ttaccggtgc tgggtggcggc ggttgctctt tgactttgtt acgaagagac	13020
attactcaag agcaaattga cagtttcaaa aagaaattgc aagatgattt tagttacgag	13080
acatttgaaa cagacttggg tgggactggc tgctgtttgt taagcgcaa aaatttgaat	13140
aaagatctta aaatcaaatc cctagtattc caattatttg aaaataaaac taccacaaag	13200
caacaaattg acgatctatt attgccagga aacacgaatt taccatggac ttcataagct	13260
aatttgcgat aggcattatt tattagttgt ttttaatctt aactgtgtat gaagttttat	13320
gtaataaaga tagaaagaga aacaaaaaaa aatttttcgt agtatcaatt cagctttcga	13380
agacagaatg aaatttaagc agaccatagt atccttgata cattgactca ggtccgcggg	13440
cgttgagcga gcgaagcatc ttgccctgtg cttggccccc agtgcagcga acgttataaa	13500

ES 2 628 847 T3

aacgaatact gagtatatat ctatgtaaaa caaccatatac atttcttggt ctgaactttg	13560
tttacctaac tagttttaaa tttccctttt togtgcatgc ggggtgttctt atttattagc	13620
atactacatt tgaaatatca aatttcctta gtagaaaagt gagagaaggt gcactgacac	13680
aaaaaataaa atgctacgta taactgtcaa aactttgcag cagcgggcat ccttccatca	13740
tagcttcaaa catattagcg ttcctgatct tcatacccggt gctcaaaatg atcaaacaaa	13800
ctgttattgc caagaaataa acgcaaggct gccttcaaaa actgatccat tagatcctca	13860
tatcaagctt cctcatagaa cgccaatta caataagcat gttttgctgt tatcaaccggg	13920
tgatagggtt gctcaggcgg tttaaacgcg tggccgtgcc gtc	13963

REIVINDICACIONES

1. Una célula de levadura modificada genéticamente capaz de producir un isoprenoide, comprendiendo la célula:

- (a) uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más enzimas de una ruta de mevalonato (MEV) para fabricar isopentenil pirofosfato; y
- (b) un ácido nucleico heterólogo que codifica una acetilaldehído deshidrogenasa de acilación (ADA).

2. La célula de levadura modificada genéticamente de la reivindicación 1, en la que:

- (a) dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que condensa acetil-CoA con malonil-CoA para formar acetoacetil-CoA;
- (b) dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una acetil-CoA:malonil-CoA aciltransferasa;
- (c) dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que usa NADH que convierte 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) en mevalonato; y/o
- (d) dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una HMG-CoA reductasa que usa NADH.

3. La célula de levadura modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica una fosfoacetolasa (PK).

4. La célula de levadura modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica una fosfotransacetilasa (PTA).

5. La célula de levadura modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una alteración funcional de una o más enzimas del bypass de la piruvato deshidrogenasa (PDH) nativa.

6. La célula de levadura modificada genéticamente de la reivindicación 5, en la que dichas una o más enzimas del bypass de PDH se seleccionan entre acetil-CoA sintasa 1 (ACS1), acetil-CoA sintasa 2 (ACS2) y aldehído deshidrogenasa 6 (ALD6).

7. La célula de levadura modificada genéticamente de la reivindicación 6, en la que:

- (a) ACS1 está alterada funcionalmente;
- (b) ACS2 está alterada funcionalmente;
- (c) ALD6 está alterada funcionalmente;
- (d) ACS1 y ACS2 están alteradas funcionalmente; o
- (e) ACS1, ACS2 y ALD6 están alteradas funcionalmente.

8. La célula de levadura modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además una alteración funcional de una o más enzimas que tienen actividad alcohol deshidrogenasa (ADH).

9. La célula de levadura modificada genéticamente de la reivindicación 8, en la que dichas una o más enzimas que tienen actividad ADH se seleccionan entre alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1), alcohol deshidrogenasa 3 (ADH3), alcohol deshidrogenasa 4 (ADH4) y alcohol deshidrogenasa 5 (ADH5).

10. La célula de levadura modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que:

- (a) dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA;
- (b) dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que condensa acetoacetil-CoA con acetil-CoA para formar HMG-CoA;
- (c) dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que convierte HMG-CoA en mevalonato;
- (d) dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que fosforila mevalonato para dar mevalonato 5-fosfato;
- (e) dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que convierte mevalonato 5-fosfato en mevalonato 5-pirofosfato;
- (f) dichas una o más enzimas de la ruta de MEV comprenden una enzima que convierte mevalonato 5-pirofosfato en isopentenil pirofosfato; y/o
- (g) dichas una o más enzimas de la ruta de MEV se seleccionan entre HMG-CoA sintasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa y mevalonato pirofosfato descarboxilasa.

11. La célula de levadura modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la célula de levadura comprende una pluralidad de ácidos nucleicos heterólogos que codifican todas las enzimas de la ruta de MEV.

12. La célula de levadura modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que:

(a) dichos uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más enzimas de la ruta de MEV están bajo el control de un solo regulador de la transcripción; o

(b) dichos uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más enzimas de la ruta de MEV están bajo el control de múltiples reguladores de la transcripción heterólogos.

13. La célula de levadura modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además:

(a) un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que puede convertir isopentenil pirofosfato (IPP) en dimetilalil pirofosfato (DMAPP);

(b) un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que puede condensar moléculas de IPP y/o DMAPP para formar un compuesto de poliprenilo; y/o

(c) un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que puede modificar IPP o un poliprenilo para formar un compuesto de isoprenoide.

14. La célula de levadura modificada genéticamente de la reivindicación 13, en la que la enzima que puede modificar IPP o un poliprenilo para formar un compuesto de isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en careno sintasa, geraniol sintasa, linalool sintasa, limoneno sintasa, mirceno sintasa, ocimeno sintasa, α -pineno sintasa, β -pineno sintasa, γ -terpineno sintasa, terpinoleno sintasa, amorfadieno sintasa, α -farneseno sintasa, β -farneseno sintasa, farnesol sintasa, nerolidol sintasa, patchoulol sintasa, nootkatona sintasa y abietadieno sintasa.

15. La célula de levadura modificada genéticamente de la reivindicación 13, en la que:

(a) el isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en un hemiterpeno, monoterpeno, diterpeno, triterpeno, tetraterpeno, sesquiterpeno y politerpeno;

(b) el isoprenoide es un sesquiterpeno;

(c) el isoprenoide es un isoprenoide C_5 - C_{20} ; o

(d) el isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en abietadieno, amorfadieno, careno, α -farneseno, β -farneseno, farnesol, geraniol, geranilgeraniol, isopreno, linalool, limoneno, mirceno, nerolidol, ocimeno, patchoulol, β -pineno, sabineno, γ -terpineno, terpinoleno y valenceno.

16. Un método para producir un isoprenoide que comprende:

(a) cultivar una población de la célula de levadura modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en un medio con una fuente de carbono en condiciones adecuadas para fabricar dicho compuesto isoprenoide; y

(b) recuperar dicho compuesto isoprenoide del medio.

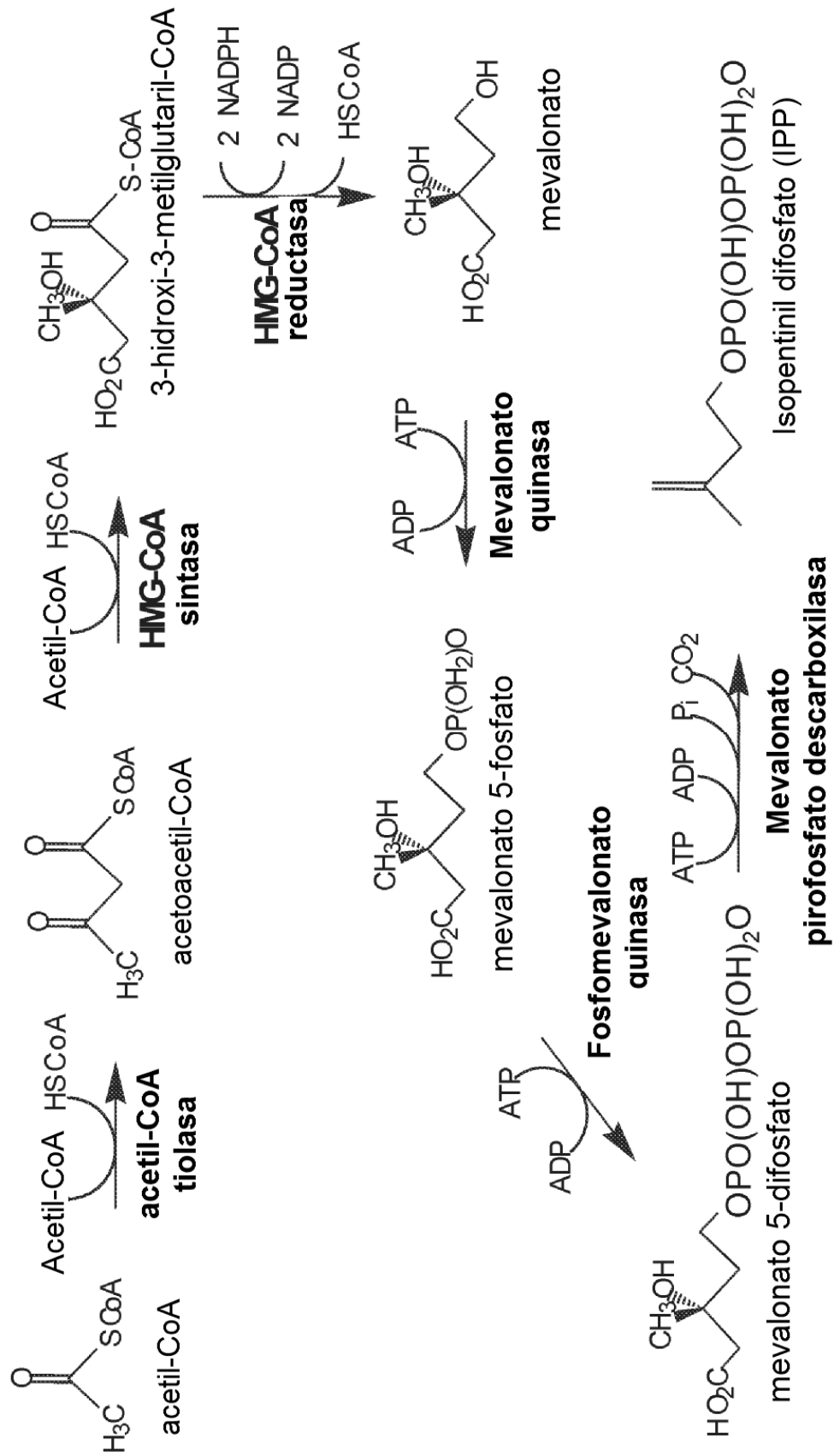


FIG. 1

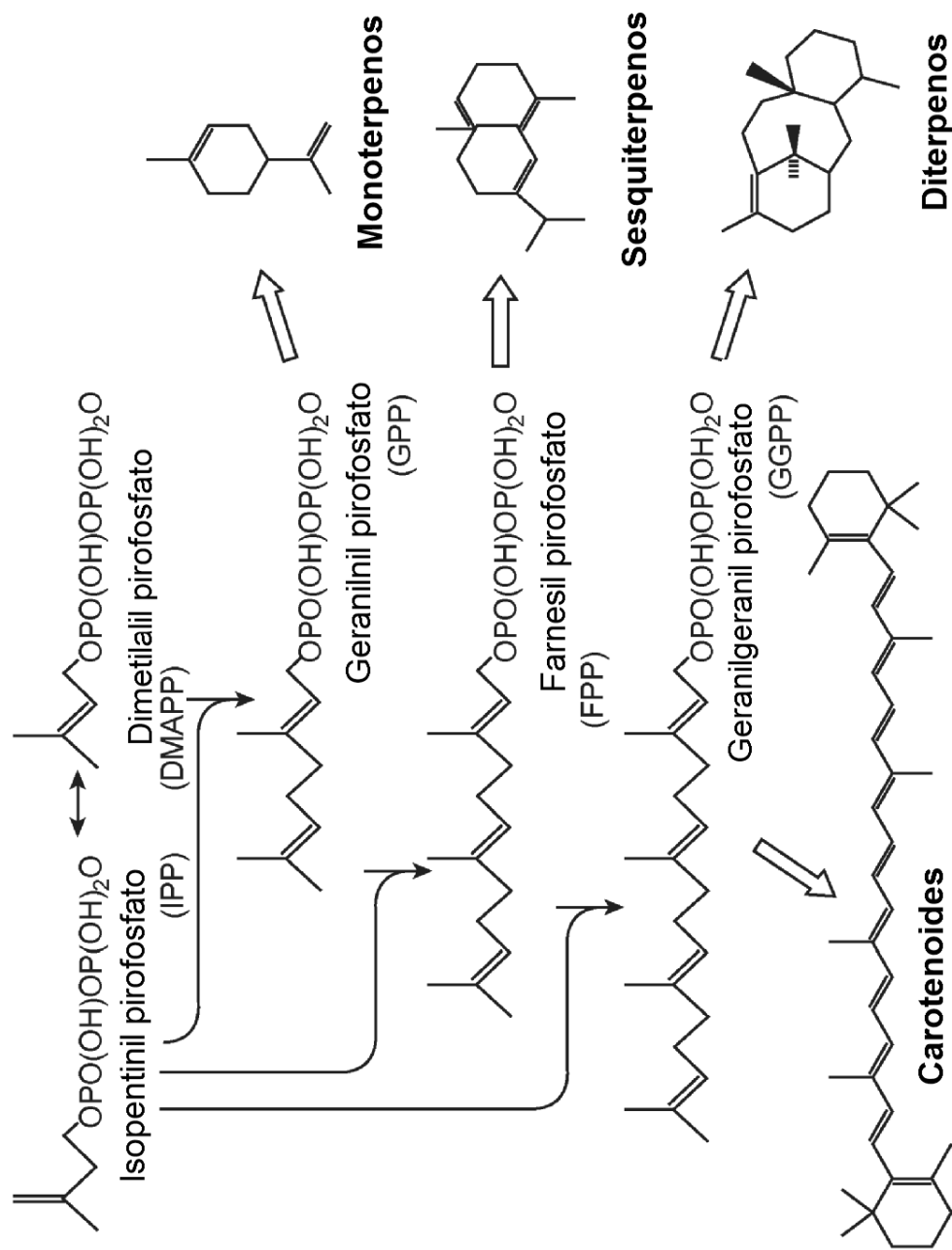


FIG. 2

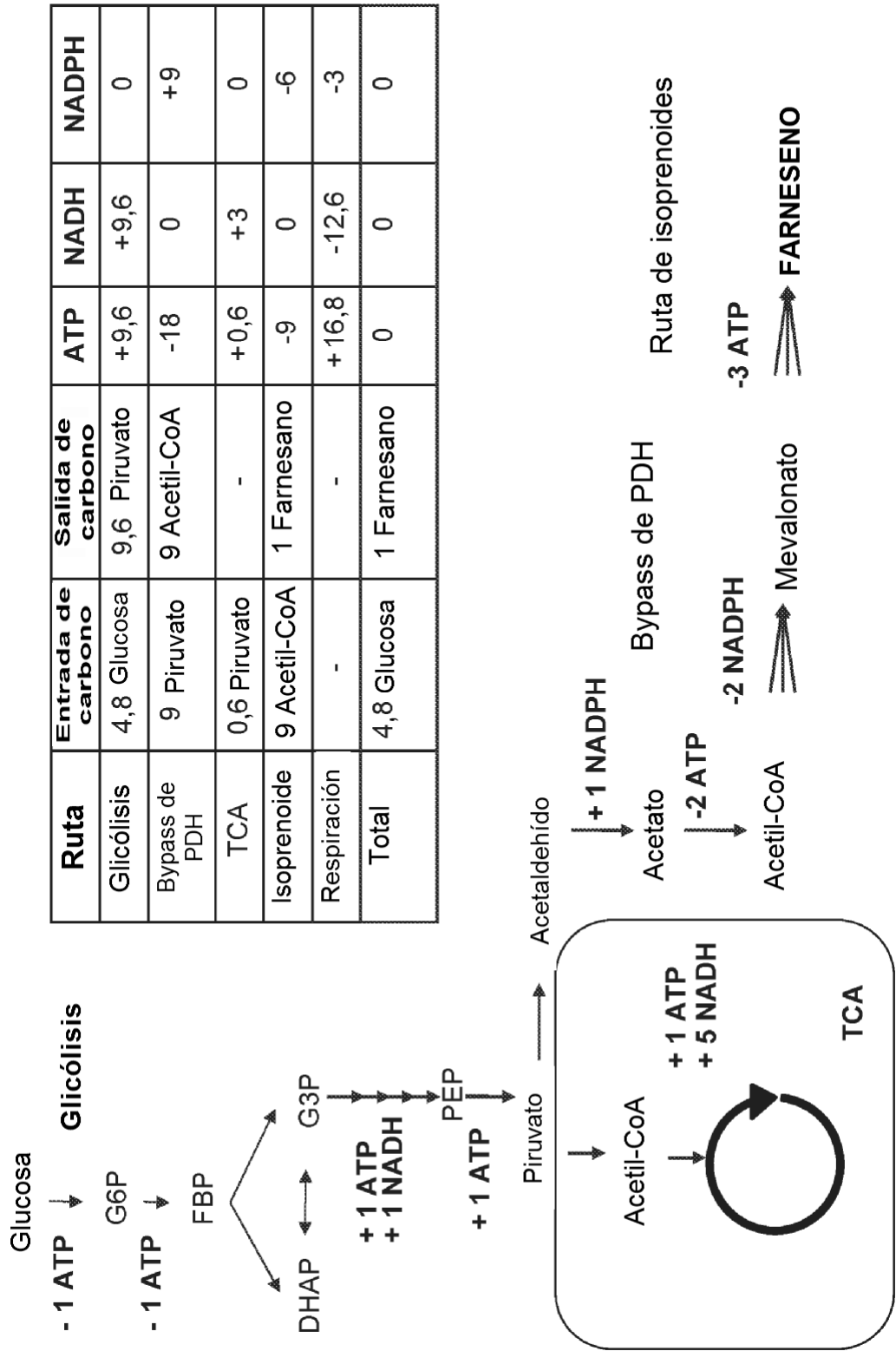


FIG. 3

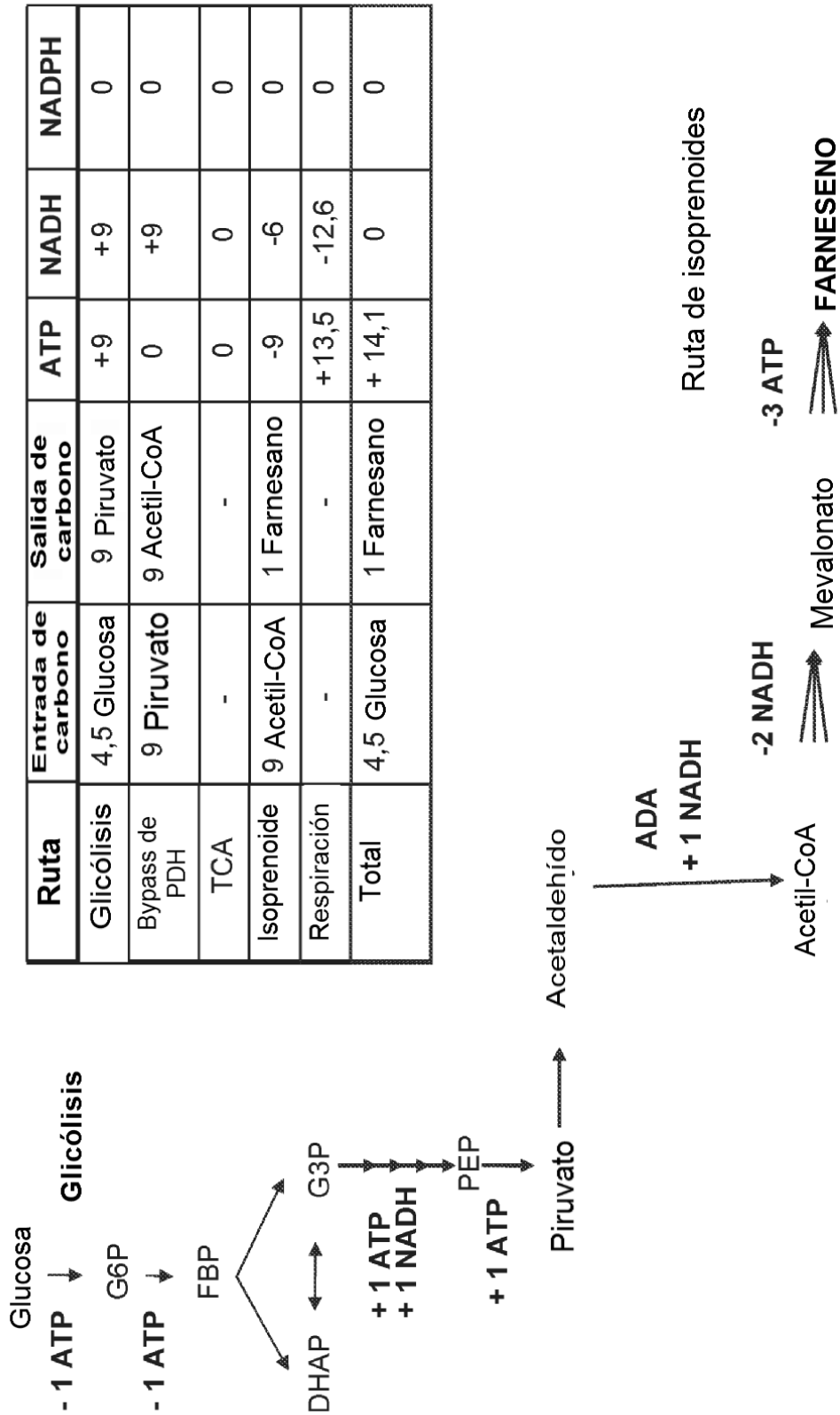


FIG. 4

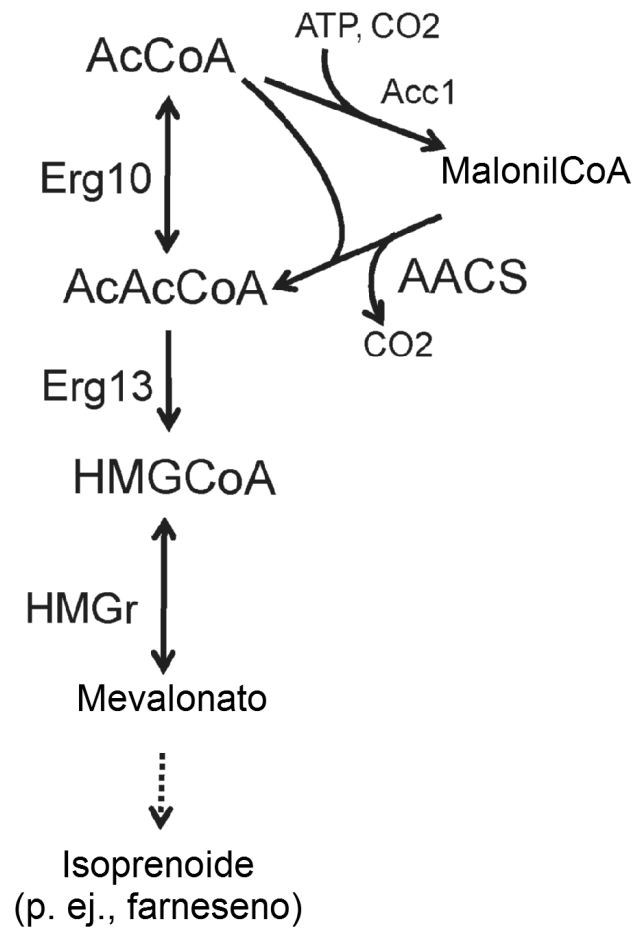


FIG. 5

Ruta	Entrada de carbono	Salida de carbono	ATP	NADH	NADPH
Glicólisis	4,5 Glucosa	9 Piruvato	+9	+9	0
Bypass de PDH	9 Piruvato	9 Acetil-CoA	0	+9	0
TCA	-	-	0	0	0
Isoprenoide	9 Acetil-CoA	1 Farnesano	-12	-6	0
Respiración	-	-	+13,5	-12,6	0
Total	4,5 Glucosa	1 Farnesano	+ 11,1	0	0

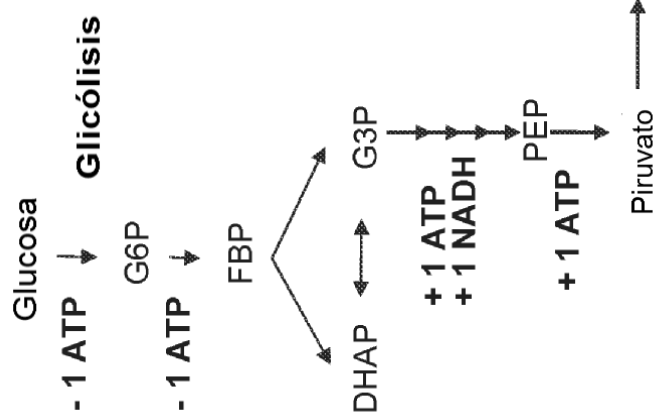


FIG. 6

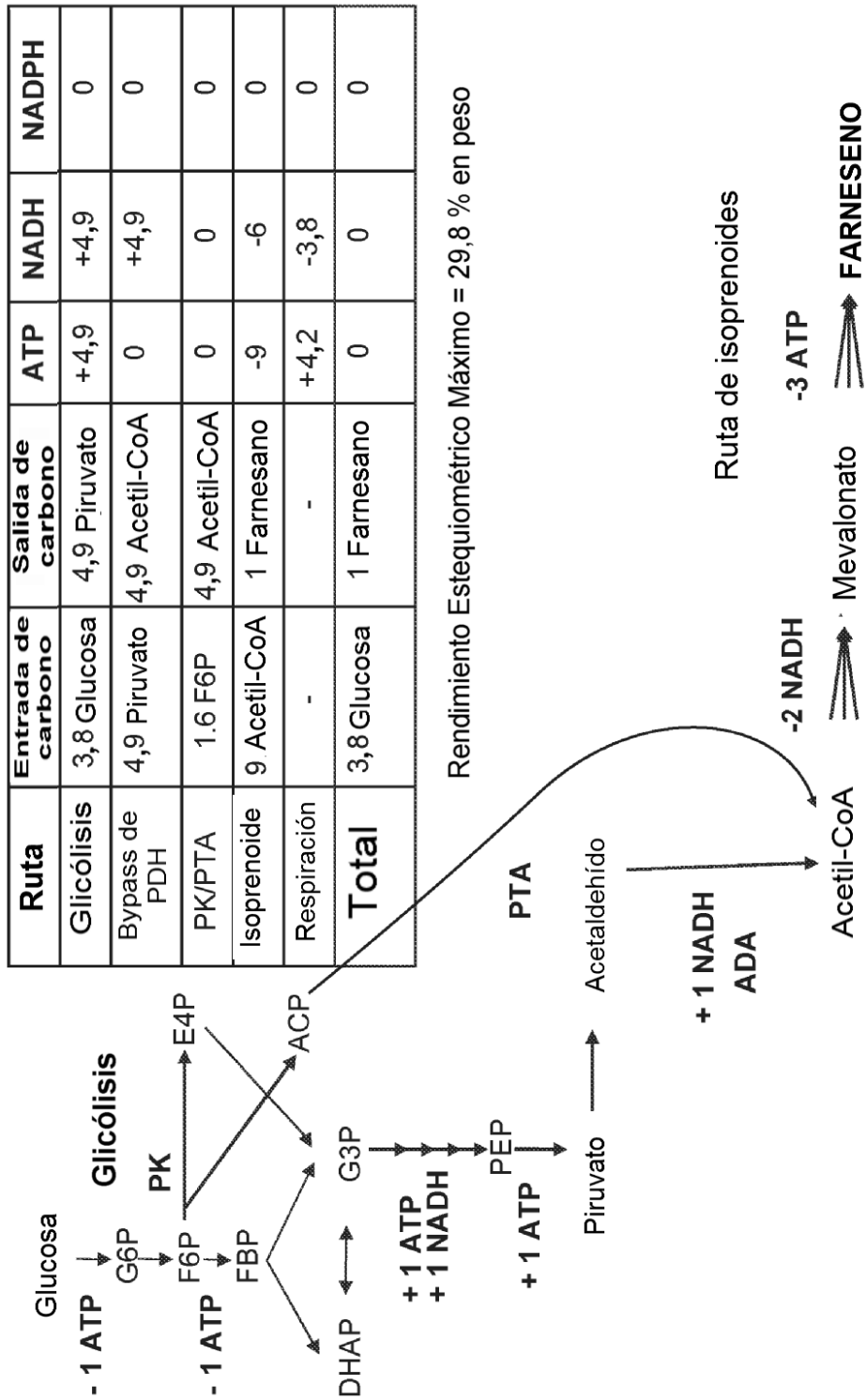


FIG. 7

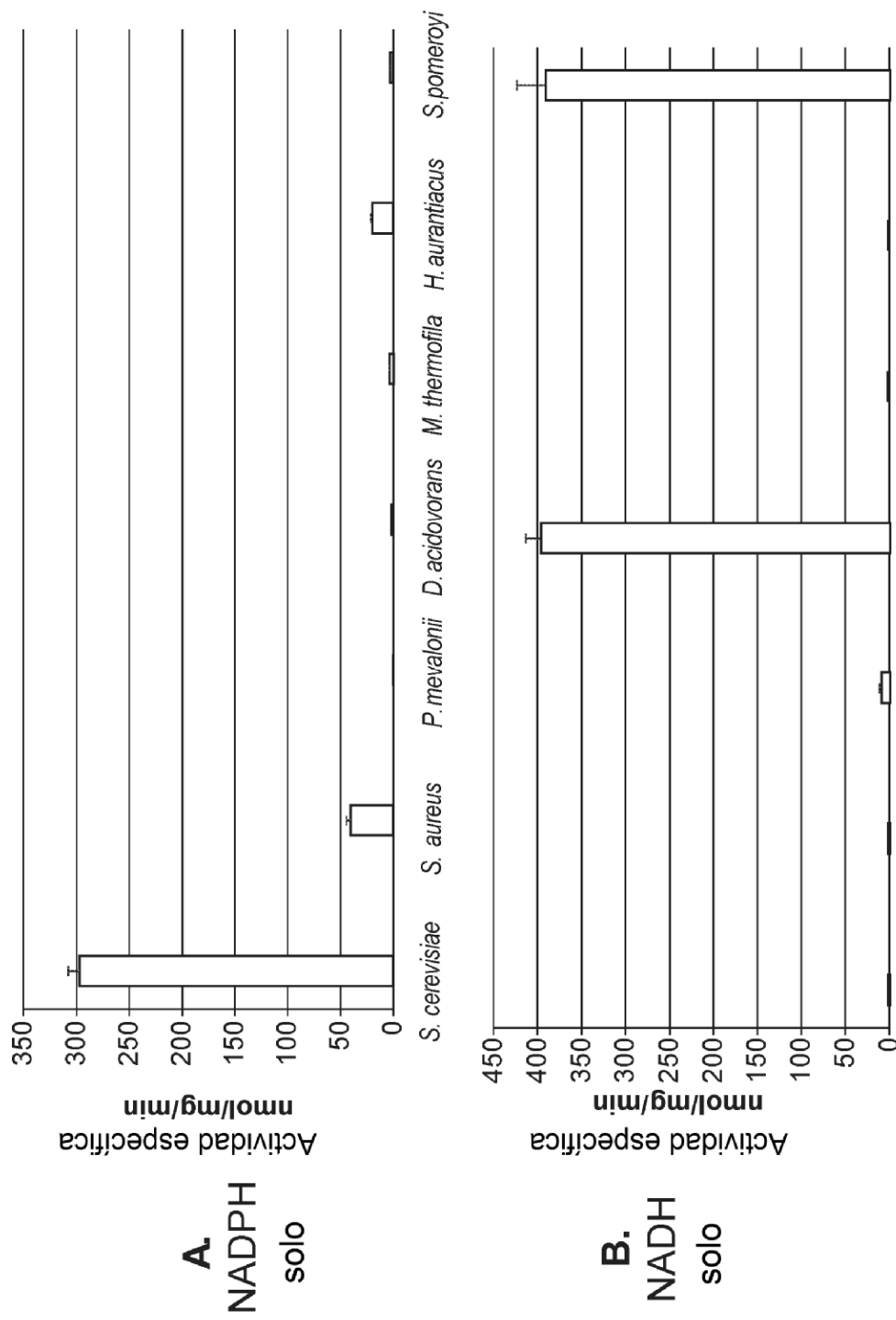


FIG. 8

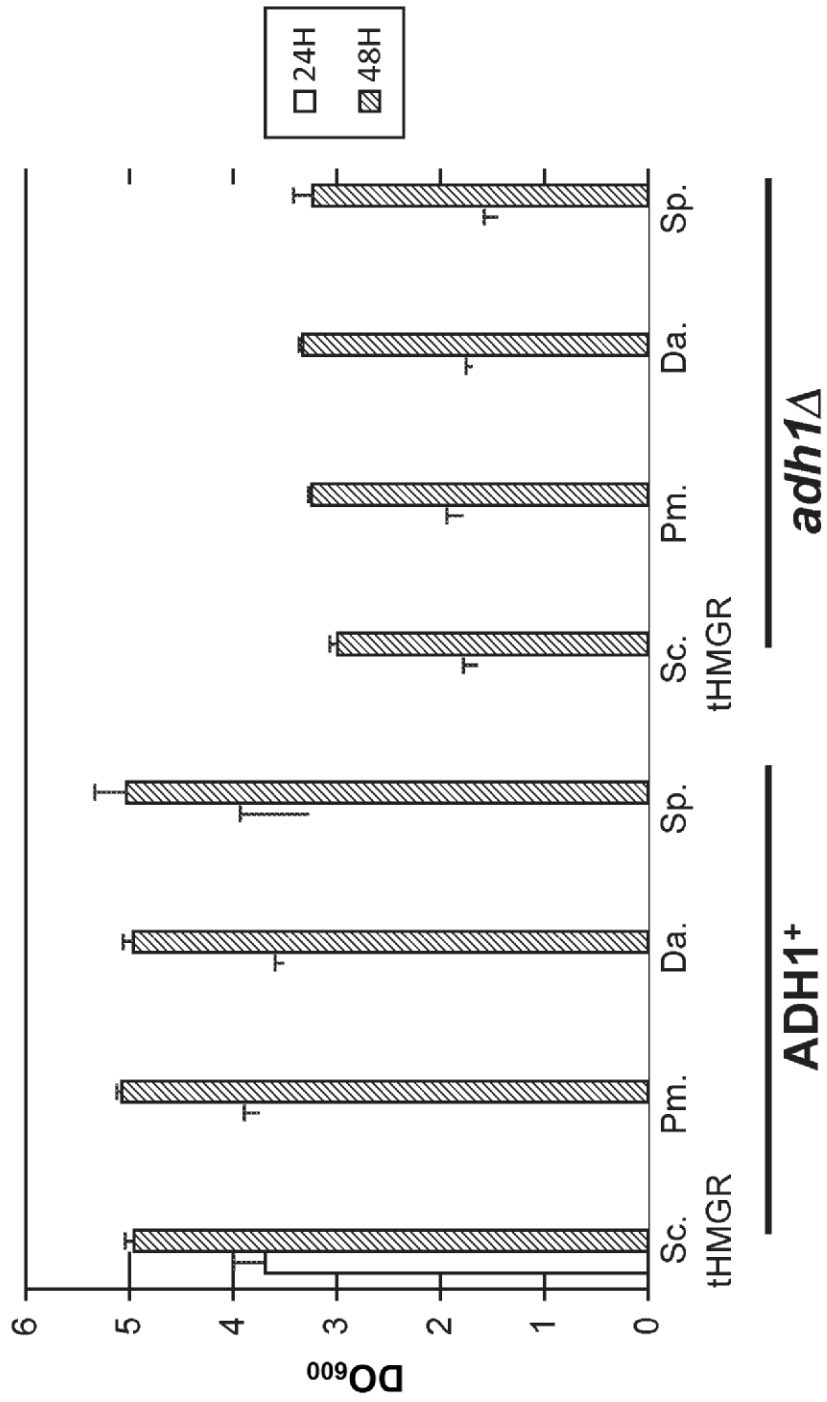


FIG. 9

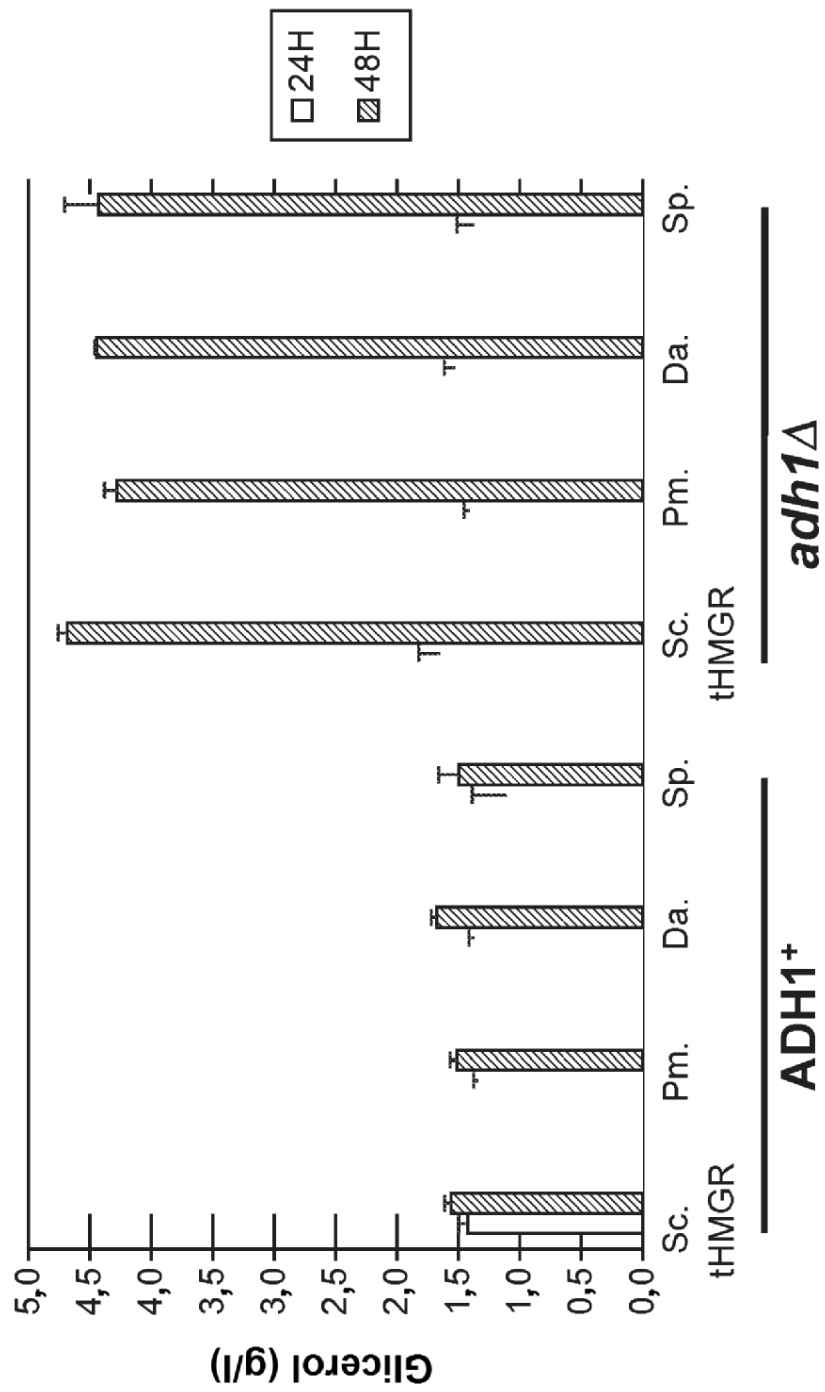


FIG. 10

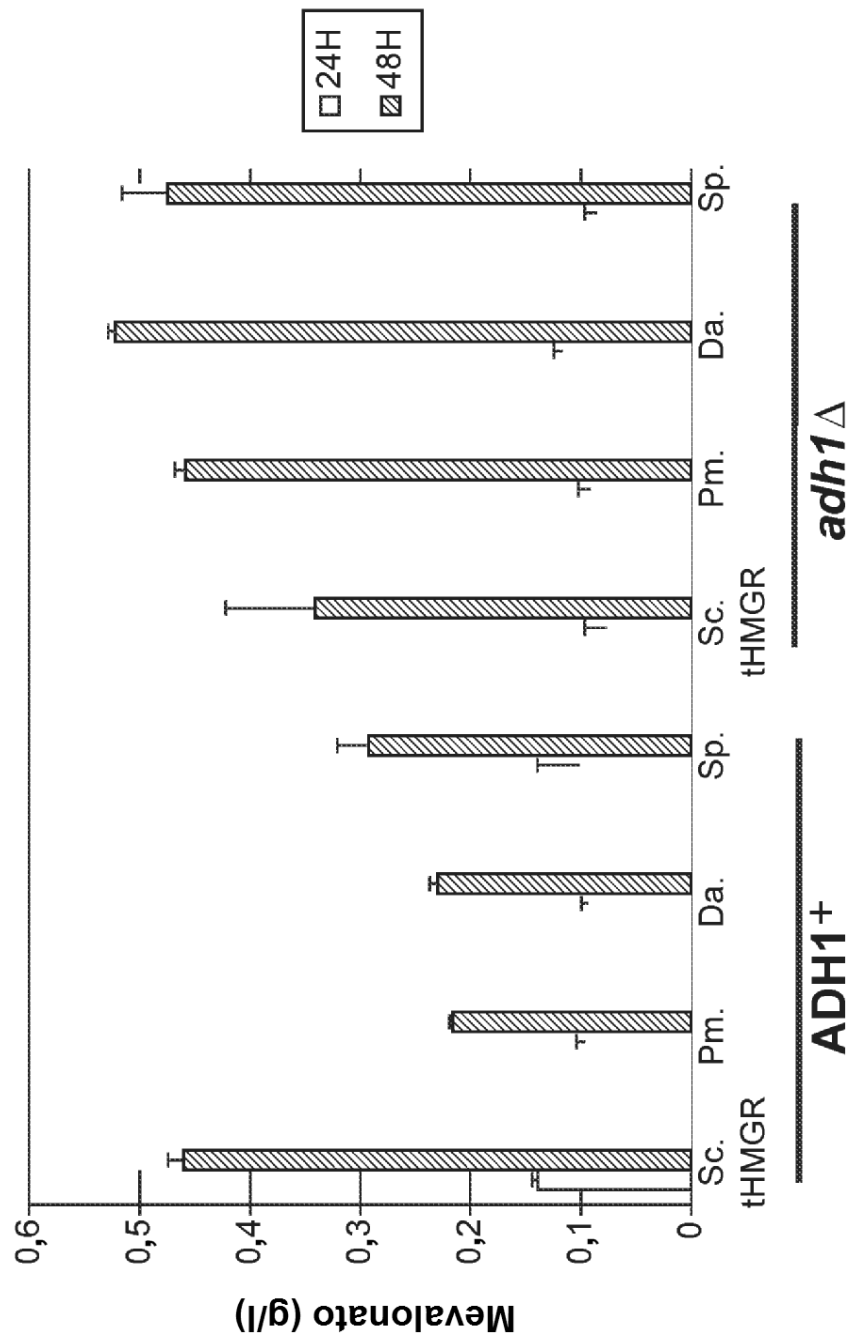


FIG. 11

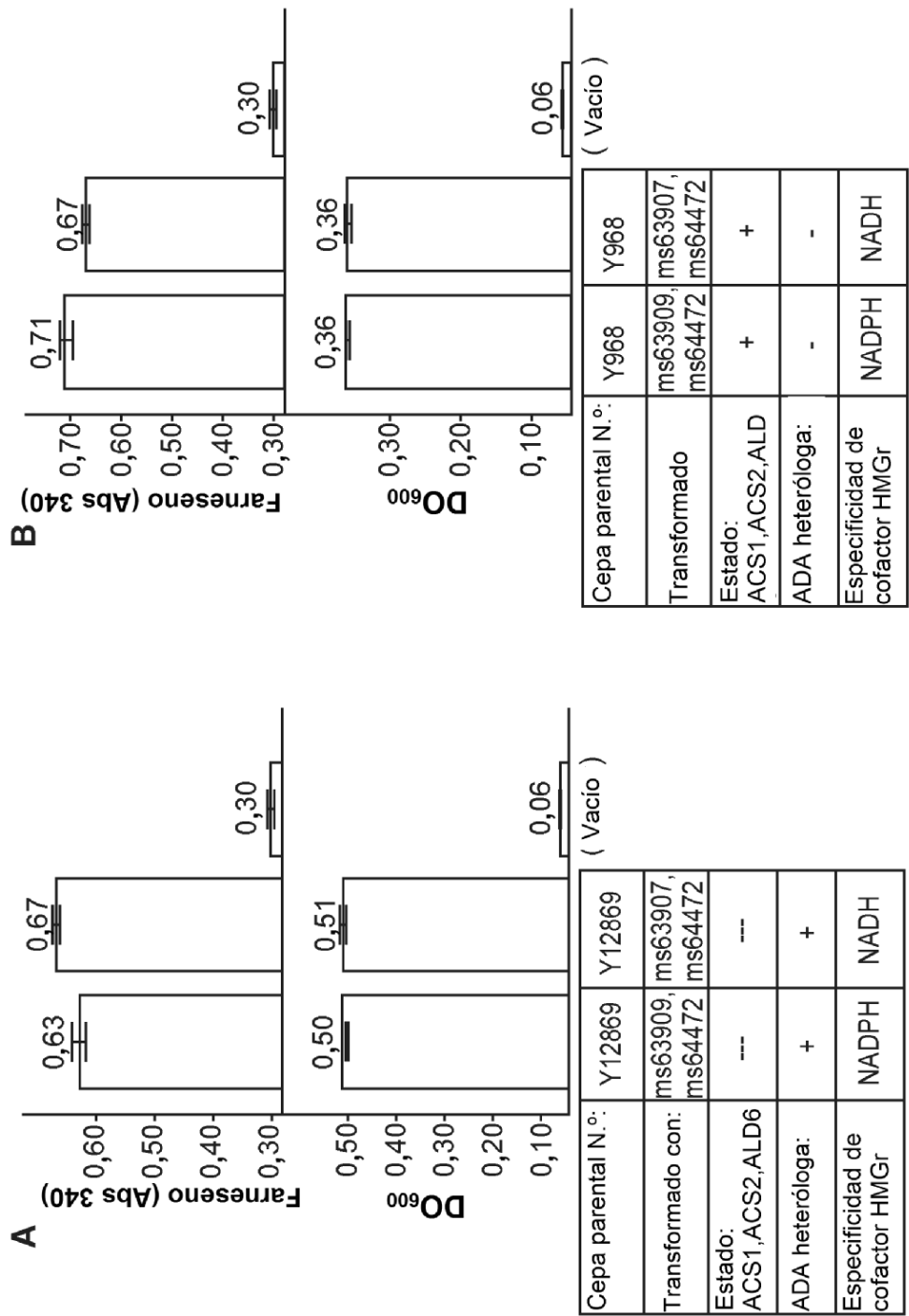


FIG. 12

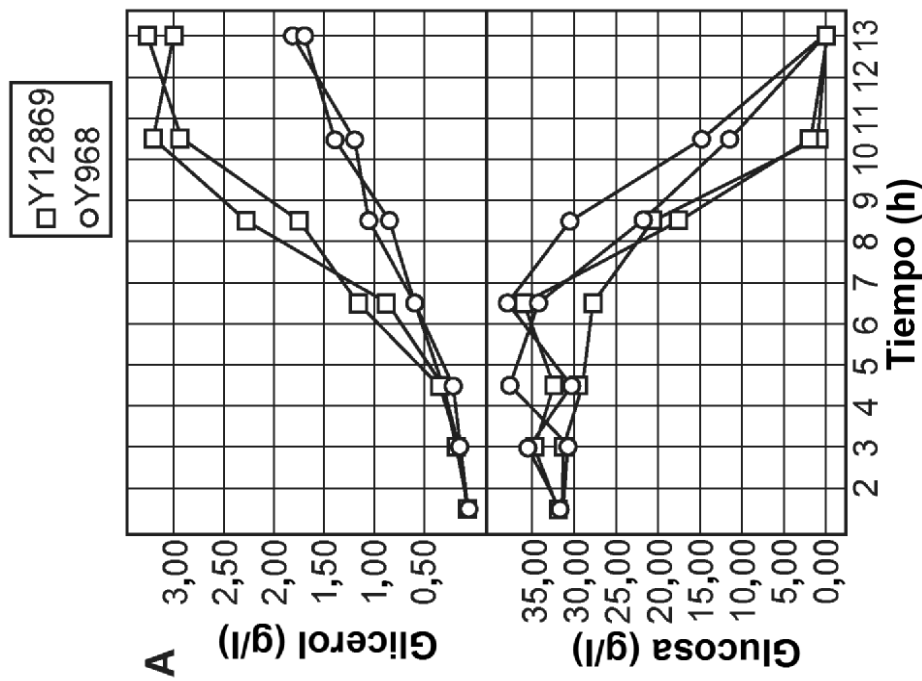
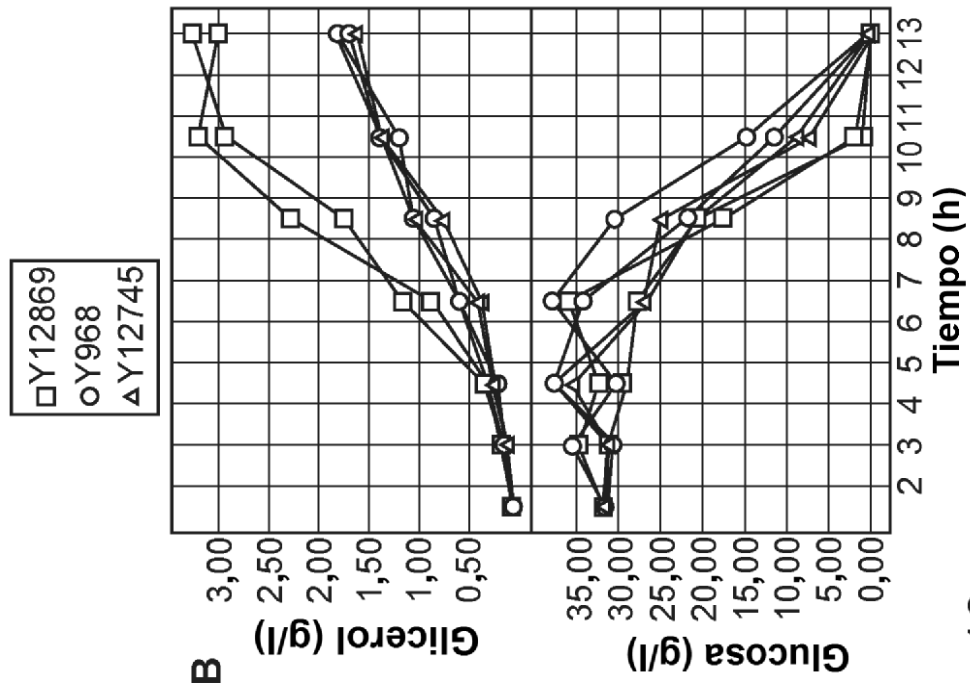


FIG. 13

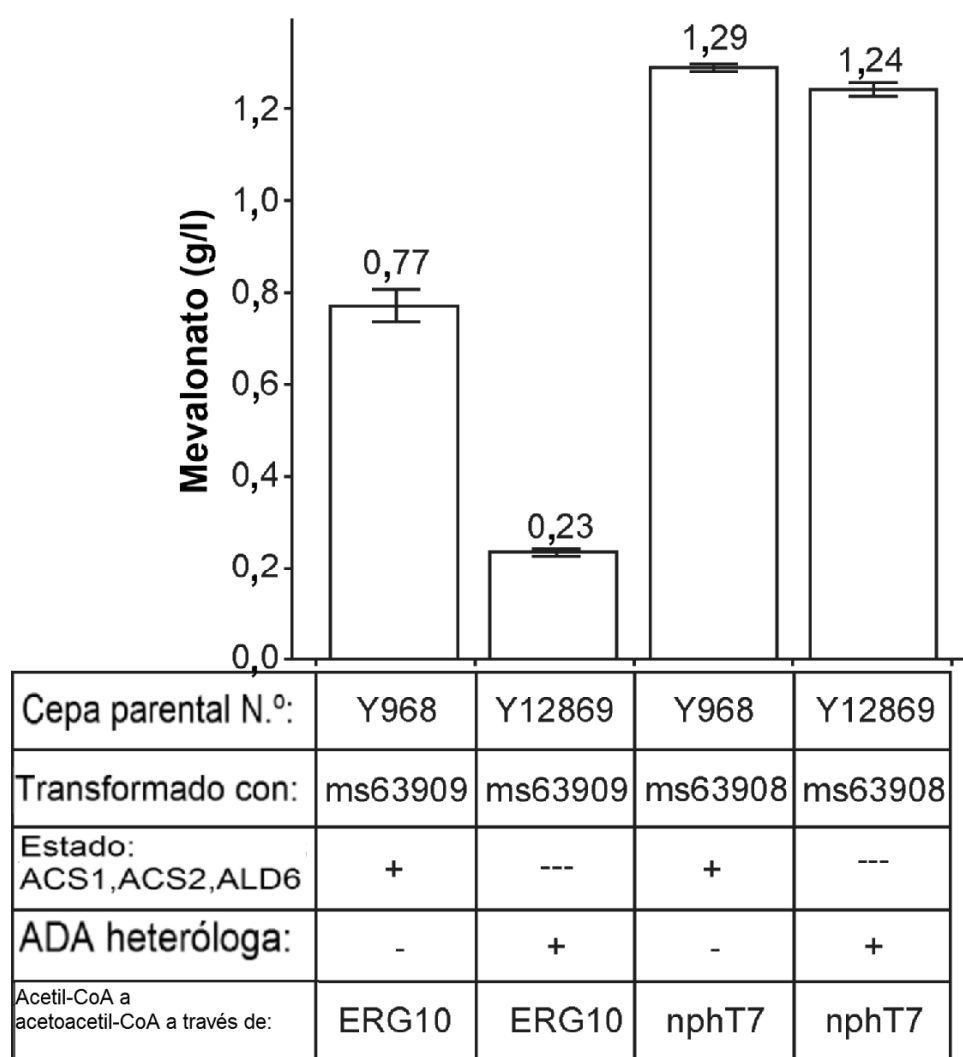


FIG. 14