

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 258**

51 Int. Cl.:

C07K 14/37 (2006.01)

C07K 14/395 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 1/18 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2011 PCT/EP2011/058447**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11147818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2011 E 11720810 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2576605**

54 Título: **Producción de metabolitos**

30 Prioridad:

26.05.2010 GB 201008826

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

25.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KATZ, MICHAEL;
DURHUUS, THOMAS;
SMITS, HANS PETER y
FÖRSTER, JOCHEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 665 258 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 metabolitos

La presente invención se refiere a la producción de estilbenoides tales como resveratrol o pinosilvina y otros metabolitos por medio de microorganismos modificados mediante ingeniería genética.

- 5 Los microorganismos modificados genéticamente para poder producir resveratrol se describen en los documentos WO06/089898, WO2009/016108, WO2009/124879 y WO2009/124967. Los microorganismos productores de pinosilvina se describen en el documento WO2008/009728. La Patente Sudafricana 2004/8194 (Universidad de Stellenbosch) y Becker et al. describieron una *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de mosto de vino en la que se ha introducido un gen de resveratrol sintasa de vid (*vst1*). El documento WO2006/125000 describe células oleaginosas que tienen capacidad de producción de resveratrol. El documento WO2006/124999 describe bacterias que producen resveratrol. Las levaduras que producen PUFA se describen en el documento WO2005/118814.

Es deseable mejorar la cantidad de estilbenoide u otro metabolito tal como PUFA producido por células de microorganismos y además mejorar el transporte de metabolitos fuera de las células productoras y en el medio en el que están creciendo.

- 15 Un mecanismo que poseen las células para transportar sustancias a través de sus membranas celulares es proporcionado por transportadores ABC (Transportadores de Casetes de Unión a ATP). Éstos son proteínas asociadas a la membrana plasmática que transportan sustancias en un procedimiento impulsado por ATP. Los transportadores ABC son proteínas que abarcan toda la membrana que utilizan ATP para transportar diversos sustratos a través de las membranas, tales como productos metabólicos, lípidos, esteroides y fármacos. Los transportadores ABC se pueden encontrar en todos los organismos, tanto eucariotas como procariotas. En la levadura y los hongos también están involucrados en la resistencia a los fármacos y son responsables de la excreción de diversos compuestos xenobióticos. *S. cerevisiae* tiene aproximadamente 16 transportadores relacionados con ABC (Rogers et al., 2001; Jungwirth y Kuchler 2006), y muchos de estos transportadores dependientes de ATP están involucrados en la respuesta a los fármacos pleiotrópicos (Jungwirth y Kuchler 2006).

- 25 Se han realizado estudios de micromatrices en levaduras alimentada con diversos sustratos; un análogo de resveratrol metilado llamado pteroesstilbeno (Pan et al, 2008), y dos esteroides i) celastrol (Trott et al., 2008) y ii) progesterona (Banerjee et al., 2008). Los esteroides tienen un tamaño similar al del resveratrol y una estructura general plana.

- 30 Cuando se suministró pteroesstilbeno a la levadura, se indujeron los transportadores ABC PDR5, PDR10, YOR1 y SNQ2 (Pan et al., 2008), y la progesterona y el celastrol indujeron PDR5, PDR15, PDR10, SNQ2 (Banerjee et al., 2008) y PDR5, PDR10, PDR15, PDR16, SNQ2, YCF1, YOR1 (Trott et al., 2008), respectivamente.

- 35 Si bien estos estudios se refieren a la respuesta del microorganismo a la exposición a los compuestos sometidos a ensayo y no están relacionados con el transporte de los microorganismos de compuestos producidos por el microorganismo como tal, los autores de la presente invención suponen que la regulación al alza de un transportador ABC relevante podría mejorar el transporte de resveratrol fuera de una célula productora de resveratrol, con un efecto beneficioso. Ahora los autores de la presente invención han establecido que SNQ2 es un transportador ABC que es eficaz para transportar resveratrol de acuerdo con la reacción:

Resveratrol (dentro de la célula) + ATP → Resveratrol (fuera de la célula) + ADP

- 40 Adicionalmente, los autores de la presente invención han establecido que esto es eficaz para aumentar la producción de resveratrol por las células.

Trantas et al. (Metabolic Engineering, 2009, 11:355-366) describen cepas de levadura recombinantes que se pueden utilizar para la producción de estilbenoides y flavonoides.

- 45 El documento WO 2006/124999 describe un método para producir resveratrol en una célula anfitriona bacteriana recombinante.

- Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo recombinante que produce y excreta al medio de cultivo un metabolito estilbenoide producto cuando se cultiva en condiciones de producción de estilbenoide, cuyo microorganismo tiene genes que codifican enzimas que constituyen una ruta metabólica para la producción de dicho estilbenoide y un transportador ABC que transporta dicho estilbenoide fuera de dicho microorganismo a dicho medio de cultivo, en donde dicho transportador es exógeno a dicho microorganismo o dicho gen que codifica dicho transportador es endógeno y está presente en un número de copias mayor que en el microorganismo nativo y/o está bajo el control de un promotor más fuerte de modo que dicho gen endógeno se expresa a un nivel más alto que el nivel de expresión nativo,

en donde dicho microorganismo tiene genes que codifican las enzimas:

- fenilalanina amoniaco liasa, 4-cumarato-CoA ligasa y estilbeno sintasa; y/o
- fenilalanina amoniaco liasa, cinamato 4-hidroxilasa, 4-cumarato-CoA ligasa y estilbeno sintasa; y/o
- tirosina amoniaco liasa, 4-cumarato-CoA ligasa y estilbeno sintasa; y/o
- tirosina amoniaco liasa, cinamato 4-hidroxilasa, 4-cumarato-CoA ligasa y estilbeno sintasa.

5 Las cepas de microorganismos que producen estilbenoides como se describe en las anteriores enseñanzas de los autores de la presente invención comentadas más arriba son eficaces para producir los estilbenoides, pero tales cepas generalmente evolucionan disminuyendo la producción de estilbenoides a lo largo del tiempo. Los genes heterólogos necesarios para la producción de estilbenoides, p. ej., el resveratrol, o la producción de otros metabolitos se pueden incluir en plásmidos de múltiples copias o plásmidos integrativos que también contienen genes para expresar productos marcadores de deficiencia necesarios para complementar un carácter auxótrofo en la cepa anfitriona. Esto sirve para mantener los plásmidos, ya que su pérdida completa haría que la célula anfitriona fuera inviable en virtud de su carácter auxótrofo y la reducción del número de copias de los plásmidos de múltiples copias tendería a un resultado similar y sería desventajoso para la supervivencia y la replicación. Por lo tanto, cualquier célula de la progenie que carezca del plásmido requerido, o suficientes copias del mismo, morirá. Sin embargo, esto da lugar a un "tira y afloja" entre las fuerzas opuestas del requisito de mantener un número suficiente de copias de los plásmidos para producir los productos marcadores, por una parte, y la carga metabólica impuesta sobre la célula anfitriona por la presencia de los plásmidos y la producción de estilbenoide resultante. La carga metabólica incluye el consumo de energía en la síntesis de ADN necesaria para replicar el sistema de expresión, la expresión de proteínas homólogas y heterólogas localizadas en el sistema de expresión, o los productos generados a partir de las proteínas expresadas. Por lo tanto, los autores de la presente invención han encontrado que un número de copias inicialmente alto puede disminuir a lo largo de las generaciones de células.

La eficacia de la compensación de microorganismos a partir de la auxotrofia proporcionada por el gen marcador de deficiencia depende del mantenimiento de una concentración suficiente de proteína expresada por el gen dentro de la célula. Esto depende en parte de la vida de la proteína en cuestión. Como comentaron Gilon et al: 1998, las proteínas que se van a degradar en células eucariotas se marcan comúnmente para su destrucción al etiquetarse con ubiquitina. Las moléculas etiquetadas con ubiquitina se degradan por diversos mecanismos, pero principalmente por el proteosoma 26S. Gilon informó de que ciertas secuencias C-terminales añadidas al final de una proteína podrían aumentar la tasa de etiquetado con ubiquitina, lo que llevaría a una degradación más rápida de la proteína.

Los autores de la presente invención han apreciado ahora que proporcionar extensiones C-terminales de productos de expresión de proteínas de genes marcadores de deficiencia que conducen a una ubiquitinación y una degradación más rápidas de esos productos cambiaría el equilibrio en el "tira y afloja" mencionado anteriormente. Las células necesitarían un mayor número de copias de los plásmidos afectados para proporcionar un mayor suministro de los productos de expresión de los genes marcadores de deficiencia incorporados a los plásmidos para compensar la auxotrofia, y esto a su vez conduciría a un aumento del número de copias de los genes de la ruta del resveratrol y una mayor producción de resveratrol. Además, este principio se puede aplicar generalmente a metabolitos producidos por una ruta metabólica dependiente de enzimas codificadas por genes de un plásmido multicopia.

Por consiguiente, la presente invención proporciona en un segundo aspecto el microorganismo recombinante anterior que produce y preferiblemente excreta al medio de cultivo un estilbenoide como un metabolito producto deseado cuando crece en condiciones de producción de metabolitos deseadas, en donde el genoma del microorganismo produce un fenotipo auxótrofo cuyo fenotipo auxótrofo es compensado por al menos un producto de expresión de un plásmido de múltiples copias o integrativo autorreplicante presente en dicho microorganismo, cuyo plásmido también expresa una o más enzimas que participan en una ruta metabólica que produce dicho metabolito deseado, y en donde al menos uno de dichos productos de expresión del plásmido autorreplicante o integrativo está genéticamente modificado para incluir una secuencia de etiqueta de ubiquitinación.

La producción de resveratrol en *S. cerevisiae* recombinante normalmente requiere cuatro genes heterólogos, fenilalanina amoniaco liasa, cinamato-4-hidroxilasa, 4-cumarato-CoA ligasa y resveratrol sintasa. La ruta se expresa en forma de proteínas citosólicas solubles, con la excepción de la cinamato-4-hidroxilasa que se ancla en las membranas del RE que se orientan al citosol. La ruta del resveratrol prefiere fenilalanina y malonil-CoA como precursores principales para la producción.

En *s. cerevisiae* el exceso de fenilalanina se degrada a feniletanol o fenilacetato a través de la ruta de Ehrlich (Etschmann et al., 2002). Una de las enzimas clave para la degradación de la fenilalanina es la fenilpiruvato descarboxilasa (*ARO10*) (Vuralhan et al., 2005). *ARO10* (YDR380w) codifica una enzima, la fenilpiruvato descarboxilasa, que cataliza la descarboxilación de fenilpiruvato a fenilacetaldehído, en la ruta de Ehrlich (también llamada ruta del alcohol fusel), lo que significa la generación de alcoholes a partir de aminoácidos mediante transaminación, seguido de una descarboxilación y una etapa final de reducción (transaminasa => descarboxilasa => reductasa/deshidrogenasa). Para aumentar el acceso a la fenilalanina, los autores de la presente invención han eliminado *ARO10* eliminando así una ruta competitiva que consume fenilalanina. Los autores de la presente

invención han encontrado que la delección de la función del gen *ARO10* de la levadura nativa aumenta el rendimiento del resveratrol y del ácido cumárico en una levadura productora de resveratrol. Se pueden aplicar principios similares a la producción de otros metabolitos estilbenoides.

5 Por consiguiente, en un tercer aspecto, la presente invención proporciona el microorganismo recombinante anterior que produce y excreta al medio de cultivo un metabolito estilbenoide producto cuando se cultiva en condiciones de producción de estilbenoide, en el que la expresión por un microorganismo de una enzima que participa en el catabolismo de fenilalanina por la ruta de Ehrlich se reduce en comparación con su nivel de expresión nativo.

De acuerdo con el primer aspecto de la invención, el estilbenoide producido puede ser cualquiera de los diversos estilbenoides, pero es preferiblemente resveratrol.

10 Dicho transportador ABC puede ser el producto de expresión del gen *SNQ2* de *Saccharomyces cerevisiae*. Puede ser el producto de expresión del gen *BcatrB* de *Botrytis cinerea*.

En el presente contexto, el término "microorganismo" se refiere a organismos microscópicos, que incluyen bacterias, hongos microscópicos, incluyendo levaduras.

15 Preferiblemente, el microorganismo es *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. Sin embargo, otros numerosos microorganismos que pueden ser modificados genéticamente para producir resveratrol u otros estilbenoides se describen en los documentos WO06/089898, WO2009/016108, WO2009/124879, WO2009/124967 y WO2008/009728. El primer aspecto de la invención se puede aplicar a cualquiera de esos microorganismos. Por lo tanto, el microorganismo puede ser un hongo, y más específicamente un hongo filamentosos que pertenece al género de *Aspergillus*, p.ej. *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, una levadura perteneciente al género *Saccharomyces*, p. ej. *S. cerevisiae*, *S. kluyveri*, *S. bayanus*, *S. exiguus*, *S. sevazzi*, *S. uvarum*, una levadura perteneciente al género *Kluyveromyces*, p. ej. *K. lactis* *K. marxianus* var. *marxianus*, *K. thermotolerans*, una levadura perteneciente al género *Candida*, p. ej. *C. utilis* *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. lipolytica*, *C. versatilis*, una levadura perteneciente al género *Pichia*, p. ej. *P. stipidis*, *P. pastoris*, *P. sorbitophila*, u otros géneros de levadura, p. ej. *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. Con respecto a otros microorganismos, se proporciona una lista no exhaustiva de hongos filamentosos adecuados: una especie perteneciente al género *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Fusidium*, *Gibberella*, *Mucor*, *Mortierella*, *Trichoderma*.

30 Con respecto a las bacterias, se proporciona una lista no exhaustiva de bacterias adecuadas de la siguiente manera: una especie que pertenece al género *Bacillus*, una especie que pertenece al género *Escherichia*, una especie que pertenece al género *Lactobacillus*, una especie que pertenece al género *Lactococcus*, una especie que pertenece al género *Corynebacterium*, una especie que pertenece al género *Acetobacter*, una especie que pertenece al género *Acinetobacter*, una especie que pertenece al género *Pseudomonas*, etc.

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

35 El microorganismo construido y modificado genéticamente se puede cultivar utilizando procedimientos comúnmente conocidos, que incluyen cultivos quimiostáticos, por lotes, de alimentación por lotes, etc.

Los siguientes microorganismos son bacterias preferidas *Escherichia coli* y *Lactococcus lactis*, y hongos, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y todas las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*.

40 Preferiblemente, un gen que expresa dicho Transportador ABC está bajo el control de un promotor que proporciona una expresión constitutiva. El gen que expresa dicho Transportador ABC puede ser endógeno o exógeno. Si es endógeno, puede estar presente opcionalmente en un número de copia más alto que en el microorganismo nativo. Sin embargo, se puede obtener un mayor nivel de expresión al colocar el gen relevante bajo el control de un promotor más fuerte, ya sea constitutivo o inducible.

45 El microorganismo tiene genes que expresan enzimas que proporcionan una ruta metabólica productora de estilbenoide que incluye al menos fenilalanina amoniaco liasa (PAL), 4-cumarato-CoA ligasa (4CL1) y estilbeno sintasa o puede tener genes que expresan enzimas que proporcionan una ruta metabólica que produce estilbenoide que incluye al menos fenilalanina amoniaco liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (4CH), 4-cumarato-CoA ligasa (4CL1) y estilbeno sintasa. Como alternativa a PAL, se puede proporcionar TAL y se puede utilizar la ruta TAL (por ejemplo, TAL, 4CL1, estilbeno sintasa). La estilbeno sintasa puede ser una resveratrol sintasa o una pinosilvina sintasa, pero preferiblemente es una resveratrol sintasa (VST). Pueden estar presentes simultáneamente tanto VST como STS.

55 Este primer aspecto de la invención se refiere al uso de transportadores ABC para aumentar la exportación de estilbenoides tales como resveratrol o pinosilvina desde células de microorganismos. Los autores de la presente invención consideran que la identificación y la expresión en exceso de un transportador de resveratrol en microorganismos, incluyendo en *S. cerevisiae*, permitirían una mayor producción de resveratrol ya que la acumulación de una alta concentración intracelular de resveratrol podría inhibir el crecimiento y el metabolismo de la

5 levadura. Se aplicarían Principios similares a otros estilbenoides. Se realizaron búsquedas *in silico* utilizando la herramienta BLAST en una base de datos del genoma de *S. cerevisiae* y sometiendo a búsqueda blast transportadores ABC de otras levaduras y hongos y de la propia *S. cerevisiae*. Los candidatos resultantes se muestran en la Tabla 1. Se encontraron algunos candidatos más que los 16 transportadores ABC anteriormente descritos (Rogers et al., 2001; Jungwirth y Kuchler 2006) en estas búsquedas de homología.

Tabla 1. Transportadores ABC en *S. cerevisiae* (Nomenclatura de acuerdo con la base de datos del genoma de *Saccharomyces*).

YOR153W - PDR5	YCR011C - ADP1
YDR406W - PDR15	YPL270W - MDL2
YOR328W - PDR10	YLR188W - MDL1
YNR070W - PDR18	YDR135C - YCF1
YPL058C - PDR12	YLL048C - YBT1
YDR011W - SNQ2	YHL035C - VMR1
YOR011W - AUS1	YKL209C - STE6
YIL013C - PDR11	YMR301C - ATM1
YOL075C	YLL015W - BPT1
	YGR281W - YOR1

10 Se han descrito supuestos genes de resveratrol sintasa en el hongo de la raíz blanca *Botrytis Cinerea* (Número de acceso del gen BcatrB: AJ006217) (Schoonbeek et al., 2001) y el hongo *Aspergillus nidulans* (Número de acceso del gen ATRB: Z68905) (del Sorbo et al., 1997, Andrade et al., 2000). Los mutantes de delección de *Botrytis cinerea* (delta-BcatrB) y *Aspergillus Nidulans* (delta-ATRB) mostraron una mayor sensibilidad hacia el resveratrol (Schoonbeek et al., 2001, Andrade et al., 2000). Estas dos proteínas, ATRBp y BcatrBp, tienen la homología más alta (30-39%) para los genes transportadores de *S. cerevisiae* codificados por los genes PDR18, SNQ2, PDR10, PDR12, PDR5 y PDR15. Los autores de la presente invención consideran que al menos uno de los genes homólogos en *S. cerevisiae* debe ser un transportador de resveratrol. Como se muestra en los ejemplos a continuación, tanto SNQ2 como BcatrBp son eficaces para aumentar la producción de resveratrol en *S. cerevisiae*.

20 Muchos transportadores ABC de otros organismos se han expresado en *S. cerevisiae* (Connolly et al., 2005; Del Sorbo et al., 2008; Nimii et al., 2005; Zwiers et al., 2002). Sin embargo, también se han expresado transportadores ABC de *S. cerevisiae* en otros organismos. Esto ha sido ilustrado por la expresión funcional del transportador YCF1 en la planta *Arabidopsis thaliana* (Song et al., 2003) y PDR5, un pariente cercano de SNQ2, en la planta de tabaco (Muhitch et al., 2000). En general, parece que la expresión funcional de cualquier transportador ABC es posible a través de las barreras de especie, como se ha ilustrado por la expresión de 25 transportadores ABC humanos en *Pichia pastoris* (Chloupkova et al., 2007). Incluso los transportadores unidos a la membrana eucarióticos se han expresado en organismos procarióticos tales como *Lactococcus lactis* (Kunji et al., 2003). Por lo tanto, es probable que otros organismos puedan volverse tolerantes a altos niveles de resveratrol por la expresión heteróloga de SNQ2 o BcatrB de *S. cerevisiae* o *Botrytis cinerea*.

El segundo aspecto se refiere al uso de etiquetas de ubiquitinación y es útil ya sea de forma aislada o combinadas con el primer aspecto.

30 Dicha secuencia de etiqueta de ubiquitinación es preferiblemente una prolongación C-terminal de dicho producto de expresión.

Preferiblemente, dicha prolongación C-terminal de dicho producto de expresión satisface los siguientes criterios:

1. Es una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido conectado en marco al extremo N o C terminal de un marco de lectura abierto de un gen.

2. La secuencia de proteína consiste en al menos 10 aminoácidos e incluye una región hidrófoba de al menos cinco aminoácidos.

3. Al menos 40% de los aminoácidos en la región hidrófoba deben ser aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas.

5 Preferiblemente, la secuencia de la etiqueta tiene una de las siguientes secuencias:

ACKNWFSSLSHFVIHL (SEQ ID NO: 1)

SLISLPLPTRVKFSSLLLIRIMKIITMTFPKKLRS (SEQ ID NO: 2)

FYYPIWFARVLLVHYQ (SEQ ID NO: 3)

SNPFSSLFGASLLIDSVSLKSNWDTSSSSCLISFFSSVMFSSTTRS (SEQ ID NO: 4)

10 CRQRFSCHLTASYPQSTVTPFLAFLRRDFFFLRHNSAD (SEQ ID NO: 5)

GAPHVVLDFELRITNPLSHIQSVSLQITLIFCSLPSLILSKFLQV (SEQ ID NO: 6)

NTPLFSKSFSTTCGVAKKTLLLAQISSLFFLLSSNIAV (SEQ ID NO: 7)

PTVKNSPKIFCLSSSPYLAFNLEYLSLRIFSTLSKCSNTLLTSL (SEQ ID NO: 8)

SNQLKRLWLWLEVRSFDRTLRRPWIHLPS (SEQ ID NO: 9)

15 SISFVIRSHASIRMGASNDFFHKLYFTKCLTSVILSKFLIHLLLRSTPRV (SEQ ID NO: 10)

cuyos ejemplos pueden ser codificados como sigue:

1. ACKNWFSSLSHFVIHL (SEQ ID NO: 1)

GCT TGT AAA AAT TGG TTT TCT TCT TTG TCT CAT TTT GTT ATT
CAT TTG (SEQ ID NO 11)

2. FYYPIWFARVLLVHYQ (SEQ ID NO: 3)

TTT TAT TAT CCA ATT TGG TTT GCT AGA GTT TTG TTG GTT CAT
TAT CAA (SEQ ID NO 12)

20

La etiqueta de ubiquitinación también puede ser FSSLA (SEQ ID NO: 13).

Dicho producto de expresión que lleva la secuencia de etiqueta de ubiquitinación es preferiblemente el producto de expresión de un marcador que incluye *ura3* o *his3* o *trp1*, *leu2*, *lys2*, o *met15*.

25 De acuerdo con el primer aspecto de la invención, el metabolito deseado producto es preferiblemente un estilbenoide pero también puede ser un ácido graso poliinsaturado y cualquiera de los dos puede ser producido en una *Saccharomyces cerevisiae* recombinante apropiada.

Generalmente, todas las características preferidas del primer aspecto de la invención se pueden emplear combinadas con las características preferidas del segundo aspecto.

30 El sistema de replicación autónoma de 2 micras (2 μ m) se utiliza como un sistema de expresión de elevado número de copias con una alta estabilidad. Una célula anfitriona que contiene un sistema de expresión con el origen de replicación de 2 μ m generalmente contiene aproximadamente 30-40 copias de vectores de expresión, dependiendo del uso del marcador y de la carga metabólica, también denominado tira y afloja (Moriya et al., 2006). La incorporación de un marcador deficiente como el marcador de deficiencia de *leu2* (Moriya et al., 2006) puede aumentar el número de copias en el sistema de expresión de 2 μ m de 30-40 a 150-160 copias.

35 La producción de resveratrol en *S. cerevisiae* generalmente está habilitada por la expresión de cuatro genes heterólogos, y la fenilalanina y la malonil-CoA del precursor (documento WO06/089898). Las cuatro proteínas heterólogas se pueden localizar en dos plásmidos que contienen dos genes heterólogos cada uno o un plásmido que contiene los cuatro genes, que constituyen la ruta del resveratrol. El sistema de expresión utilizado contiene un sistema de expresión de 2 μ m como origen de replicación y un marcador tal como *ura3* y/o *his3* o uno de los otros marcadores mencionados anteriormente para complementar la cepa anfitriona auxótrofa. La expresión de la ruta productora de resveratrol en un plásmido da como resultado un número de copias inicial determinado por el tira y afloja (Moriya et al., 2006) que da como resultado un título dado de resveratrol. El uso de dos plásmidos eleva la concentración final que muestra que un aumento en el número de copias del plásmido afecta al rendimiento de resveratrol como se muestra en el Ejemplo 35.

40

Para aumentar el equilibrio del número de copias, se necesita diseñar el anfitrión para que se adapte mejor a la presión conferida por el sistema de expresión/producción o aumentar la necesidad del gen marcador. La última solución se utiliza en ejemplos de acuerdo con este aspecto de la invención, centrándose en la semivida de proteínas del producto del gen marcador fusionando la secuencia codificante del marcador *ura3* a una etiqueta C-terminal que contiene secuencias de direccionamiento para los genes *Ubc6* y *Ubc7* de *S. cerevisiae* (Gilon et al., 1998). Esto debería disminuir la semivida de las proteínas y, por lo tanto, aumentar la demanda de número de copias del gen marcador.

El tercer aspecto se refiere a la eliminación u otra negación de la función de la ruta de Ehrlich, ya que afecta a los precursores del metabolito deseado.

Dicha enzima cuya actividad se suprime o reduce puede ser preferiblemente una fenilpiruvato descarboxilasa. Un gen que expresa dicha enzima puede ser eliminado o desactivado funcionalmente, por ejemplo mediante eliminación parcial o inserción de una secuencia sin sentido. Preferiblemente, el microorganismo es una *Saccharomyces cerevisiae* recombinante y dicha enzima está codificada por *Aro10*.

El tercer aspecto, que incluye todas sus características preferidas, se puede utilizar combinado con uno o ambos aspectos primero y segundo, incluyendo todas o cualquiera de sus características preferidas.

La producción de estilbenoide puede aumentar aún más al aumentar la expresión del gen *ACC1* para aumentar el conjunto de malonil-CoA disponible en la ruta metabólica, como se describe en los documentos WO2009/124879 y WO2009/124966.

Los microorganismos particularmente preferidos, especialmente *S. cerevisiae*, de acuerdo con la invención contienen cuatro plásmidos integrativos que contienen los genes de la ruta del resveratrol heterólogo y los genes del transportador de resveratrol de la planta y portan una delección en los genes *Aro10*, *Ura3*, *His3*, *Leu2*, *Trp1* y una expresión en exceso de los genes *ACC1* y *SNQ2*.

De acuerdo con cada aspecto de la invención, se puede preferir cambiar y modificar la expresión del gen *Aro4* y/o *Aro7* a niveles superiores a los producidos en el tipo salvaje del microorganismo. Estos genes están implicados en la síntesis de aminoácidos aromáticos y la mejora de la producción de estilbenoide que han observado los autores de la presente invención al utilizarlos puede deberse a la provisión de niveles más elevados de precursores de aminoácidos.

En un aspecto preferido, la invención proporciona una *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que tiene genes que codifican enzimas que constituyen una ruta metabólica para la producción de un estilbenoide y que expresan un Transportador (preferiblemente un transportador ABC) que tiene actividad exportadora para el estilbenoide, en donde el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* produce un fenotipo auxótrofo cuyo fenotipo auxótrofo es compensado por al menos un producto de expresión de un plásmido autorreplicante o de múltiples copias integrativo presente en dicha *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo plásmido también expresa una o más de dichas enzimas que constituyen dicha ruta metabólica que produce dicho estilbenoide, y en donde al menos uno de dichos productos de expresión del plásmido autorreplicante o integrativo está modificado genéticamente para que incluya una secuencia de etiqueta de ubiquitinación.

Preferiblemente, en semejante organismo recombinante, la expresión de una enzima que participa en el catabolismo de la fenilalanina por la ruta de Ehrlich se reduce en comparación con su nivel de expresión nativo como se describió anteriormente y preferiblemente la expresión del gen *ACC1* se eleva por encima de su nivel de expresión nativo.

En una realización particularmente preferida, se proporciona una *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que tiene un fenotipo cromosómico TRP auxótrofo, URA auxótrofo, LEU auxótrofo e HIS auxótrofo y que tiene incorporado un plásmido integrante que contiene el gen *SNQ2* de *Saccharomyces cerevisiae* bajo el control de un promotor constitutivo de TDH3, cuyo plásmido restaura la prototrofia para TRP, y que contiene adicionalmente un primer plásmido de múltiples copias autorreplicante que contiene los genes *4CL2*, *VST1* y *URA3* C-terminalmente prolongados por la secuencia de etiqueta de ubiquitinación GCT TGT AAA AAT TGG TTT TCT TCT TTG TCT CAT TTT GTT ATT CAT TTG, un segundo plásmido de múltiples copias autorreplicante que contiene los genes *PAL2*, *C4H:CYB5:ATR2*, *HIS3*, *4CL2*, y *VST1*, y un tercer plásmido de múltiples copias autorreplicante que contiene los genes *VST1*, *4CL2*, *LEU2*, *C4H: CYB5: ATR2*, y *PAL2*.

En otra realización particularmente preferida, se proporciona una *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que tiene un fenotipo cromosómico TRP auxótrofo, URA auxótrofo, LEU auxótrofo e HIS auxótrofo y que tiene incorporado un plásmido integrativo que contiene el gen *SNQ2* de *Saccharomyces cerevisiae* bajo el control de un promotor constitutivo de TDH3, cuyo plásmido restaura la prototrofia para TRP y que contiene adicionalmente un primer plásmido integrativo que contiene los genes *PAL2*, *C4H* y *C4H:CYB5:ATR2*, un segundo plásmido integrativo que contiene los genes *VST*, *4CL2* e *HIS5* C-terminalmente prolongados por la secuencia de etiqueta de ubiquitinación GCT TGT AAA AAT TGG TTT TCT TCT TTG TCT CAT TTT GTT ATT CAT TTG, y un tercer plásmido integrativo que contiene los genes *VST* y *STS*.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- La Figura 1 muestra una ruta metabólica que produce resveratrol;
- La Figura 2 muestra una ruta metabólica alternativa que produce resveratrol;
- La Figura 3 muestra una ruta metabólica que produce pinosilvina;
- La Figura 4 muestra la estructura de un plásmido Rho0053 producido en el Ejemplo 19;
- 5 La Figura 5 muestra la estructura de un plásmido Rho0032B producido en el Ejemplo 17;
- La Figura 6 muestra la estructura de un plásmido Rho0044 producido en el Ejemplo 18;
- La Figura 7 muestra la estructura de un plásmido Rho0051 producido en el Ejemplo 24;
- La Figura 8 muestra las cantidades de resveratrol obtenidas en el Ejemplo 21;
- La Figura 9 muestra las cantidades de resveratrol obtenidas en el Ejemplo 22;
- 10 La Figura 10 muestra las cantidades de resveratrol obtenidas en el Ejemplo 35;
- La Figura 11 muestra las cantidades de resveratrol obtenidas en el Ejemplo 36;
- La Figura 12 muestra las cantidades de resveratrol obtenidas en el Ejemplo 36;
- La Figura 13 muestra la producción de resveratrol medida en el Ejemplo 41;
- La Figura 14 muestra una secuencia a la que se hace referencia en el Ejemplo 55 (SEQ ID NO: 185);
- 15 La Figura 15 muestra un análisis de varios transformantes FS09258 + p0204 + p0180 producidos en el Ejemplo 65; y
- La Figura 16 muestra los resultados de las fermentaciones de alimentación por lotes conducidas descritas en el Ejemplo 72 utilizando las cepas FS09258-51-53-32B-44, FS09326 y FS09322.
- La Figura 17 muestra un perfil de tiempo típico de la producción de resveratrol y otros productos en el cultivo de la cepa FS09322 de *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo con la invención. La barra vertical a aproximadamente 55 minutos indica el tiempo de cambio a una fase de producción.
- 20
- Como se muestra en la Figura 1, el resveratrol se puede formar a partir de fenilalanina a través de una ruta en la que fenilalanina se transforma en ácido cinámico por una fenilalanina amoniaco liasa (PAL1, PAL2 o PAL3), que se transforma en ácido cumárico por acción de una cinamato 4-hidroxilasa (C4H). A partir del ácido cumárico se forma 4-cumaroil-CoA por la acción de una 4-cumarato-CoA ligasa (4CL1). La 4-cumaroil-CoA se hace reaccionar con malonil-CoA mediante una resveratrol sintasa para producir resveratrol. Una ruta alternativa que se muestra en la Figura 2 comienza con tirosina en lugar de fenilalanina y forma ácido cumárico más directamente. Una ruta para producir pinosilvina mostrada en la Figura 3 se parece a la de la figura 1, pero forma el estilbenoide a partir de una reacción entre malonil-CoA y cinamoil-CoA catalizada por una resveratrol sintasa o más preferiblemente por una pinosilvina sintasa (es decir, una estilbeno sintasa que tiene una preferencia por cinamoil-CoA como sustrato).
- 25
- Se puede proporcionar una ruta de estilbenoide en un microorganismo tal como *Saccharomyces cerevisiae* proporcionando los genes necesarios para expresar las enzimas que se muestran en las rutas de estas figuras.
- 30
- A continuación se describirá con detalle una *Saccharomyces cerevisiae* recombinante preferida FS09258-51-53-32B-44 que combina los diversos aspectos de la invención.
- El microorganismo receptor es una *Saccharomyces cerevisiae* con genotipo MAT α ura3-52 his3 MAL2-8c SUC2].
- 35 Se introducen los siguientes plásmidos.

Material genético introducido

Vectores/plásmidos introducidos

Plásmidos/Cepas	FS09258-51-53-32B-44
RHO 0051	+
RHO0053	+
RHO0032B	+

Plásmidos/Cepas	FS09258-51-53-32B-44
RHO0044	+
+ Plásmido expresado en la cepa;	

FS09258-51-53-32B-44 contiene tres plásmidos de múltiples copias que contienen los genes de la ruta del resveratrol heterólogos de la planta.

5 Los tres vectores de plásmidos, RHO0053, RHO0032B y RHO0044, están basados en los vectores PESC de Stratagene, PESC-URA, PESC-HIS y PESC-LEU (www.stratagene.com) y han sido modificados mediante la sustitución de los promotores de galactosa inducibles originales por promotores constitutivos de levadura. Los tres vectores de plásmidos, RHO0053, RHO0032B y RHO0044 contienen adicionalmente los genes de la ruta del resveratrol de la planta, con el conjunto completo de genes de la ruta del resveratrol incluidos en cada plásmido (véanse los mapas de plásmidos más adelante). Los genes de plantas heterólogas provienen de los organismos no patógenos *Arabidopsis thaliana* y *Vitis vinifera* (uva) (resveratrol, sintasa).

10 El plásmido Rho51 también se basa en el vector de Stratagene (pesc-trp) y también tiene promotores constitutivos fuertes. Adicionalmente, la región de 2 micras, que señala la autorreplicación y las múltiples copias, se ha eliminado y, por lo tanto, este plásmido solo puede replicar como una única copia integrada en el genoma de la levadura.

15 El plásmido RHO51 contiene una expresión en exceso de un transportador SNQ2 de resveratrol. SNQ2 es un transportador de casete de unión a ATP (ABC) de membrana plasmática, transportador de múltiples fármacos implicado en la resistencia a múltiples fármacos y tiene resistencia a especies de oxígeno singlete. SNQ2 se clonó entre los sitios de restricción BamHI y KpnI del vector PSF57-TRP1 para generar el vector RHO0051 (véanse las características del plásmido y el mapa) bajo el control del promotor de TDH3. Al cortar este vector con Hind III (que corta al final del marcador TRP1) y transformar una levadura auxótrofa para TRP, el vector integrativo se integra en el cromosoma del promotor de TRP1 eliminado y restaura el TRP1 no funcional.

A continuación aparecen más detalles de los plásmidos:

Plásmido RHO0053 - véase también la Figura 4

Características de Rho0053

Nombre	Region	Tipo
CYC1	Terminador	4987..5107
ADH1	Terminador	complemento (157..321)
ADH1	Terminador	complemento (6884..7048)
CYC1	Terminador	14786..14906
F1	Origen de replicación	complemento (6482..6788)
Origen pUC	Origen de replicación	14936..15603
2mu	Origen de replicación	16745..17900
TDH3	Promotor	complemento (2190..2844)
TEF1	Promotor	3134..3534
TDH3	Promotor	complemento (9365..10019)
TEF1	Promotor	10309..10709

ES 2 665 258 T3

Nombre	Region	Tipo
Tag 2	Promotor	6169..6216
4CL2	ORF	complemento (507..2177)
VST1	ORF	3547..4725
URA3 con TAG2	ORF	5365..6219 /nota=Longitud: 807
PAL2 Codón opt.	ORF	complemento (7199..9352)
Bla	ORF	complemento (15751..16623)
C4H-CYB5-ATR2	ORF	10722..14540

Plásmido RHO0032b véase también la Figura 5

Características Rho0032b

Nombre	Tipo	Región
CYC1	Terminador	8094..8214
ADH1	Terminador	complemento (157..321)
pUC	Origen de replicación	14999..15666
2 mu	Origen de replicación	16808..17963
Origen F1	Origen de replicación	9613..9919
TEF1	Promotor	12996..13396
TDH3	Promotor	complemento (12052..12706)
TDH3	Promotor	complemento (2673..3327)
TEF1	Promotor	3617..4017
VST1	ORF	13409..14587
4CL2	ORF	complemento (10369..12039)
HIS3	ORF	8562..9221
Bla	ORF	complemento (15814..16674)
PAL2	ORF	complemento (507..2660)
C4H-CYB5-ATR2	ORF	4030..7848

5 Plásmido RHO0044 -véase también la Figura 6

Características Rho0044

ES 2 665 258 T3

Nombre	Tipo	Región
LEU2_terminador	Terminador	9721..10171
CYC1	Terminador	7985..8105
CYC1	Terminador	15627..15747
ADH1	Terminador	complemento (48..212)
ADH1	Terminador	complemento (10797..10961)
2 mu	Origen de replicación	17586..18741
Origen PUC	Origen de replicación	15777..16444
TDH3	Promotor	13514..14180
TEF	Promotor	complemento (12824..13236)
LEU2_promotor	Promotor	8234..8613
TEF	Promotor	3502..3914
TDH3	Promotor	complemento (2558..3223)
VST1	ORF	14187..15368
4CL2	ORF	complemento (11147..12817)
LEU2	ORF	8614..9720
C4H::Cyb5::AR2codopt	ORF	3957..8105
PAL2codopt	ORF	complemento (398..2551)
BLA	ORF	complemento (16592..17464)

Plásmido RHO0051 - véase también la Figura 7

Características Rho0051

Nombre	Tipo	Región
PTRP1	Promotor	187..468
TDH3	Promotor	2865..3514
TEF	Promotor	complemento (2164..2564)
SNQ2	ORF	3521..8026
TRP1	ORF	469..1140

FS09258-51-53-32B-44 lleva una delección en el gen *ARO10*, *Ura3*, *His3*, *Leu2*, *Trp1* y una expresión en exceso del gen *ACC1*:

Expresión en exceso de *ACC1* por intercambio de promotor

5 Se expresó en exceso *ACC1* utilizando el promotor de *TPI1* (Triosa fosfato isomerasa) de *S. cerevisiae* constitutivo nativo. El *TPI-ACC1* es una regulación al alza cromosómica del gen *ACC1* mediante la sustitución del promotor débil natural de *ACC1* por el promotor de *TPI* de *S. cerevisiae* nativo constitutivo del gen *TPI* (*YDR050c*) que codifica una enzima glicolítica abundante, la triosa fosfato isomerasa. El método utilizado para el cambio de promotor se describe en (Erdeniz et al, 1997). *ACC1* (*YNR016c*) codifica una enzima, la acetil-CoA carboxilasa, que cataliza la carboxilación de acetil-CoA para formar malonil-CoA. La malonil-CoA se requiere normalmente para la biosíntesis de
10 novo de ácidos grasos de cadena larga en levadura y también se necesita para la síntesis de resveratrol (reacción de resveratrol sintasa: 3 malonil-CoA + 4-cumaroil-CoA = 4 CoA + 3,4',5-trihidroxiestilbeno + 4 CO₂).

Delección de genes

La delección de genes se realizó utilizando un sistema cre-lox (Gueldener et al., 2002) que deja una secuencia loxP corta en el ADN acortado.

15 A continuación, se describen con más detalle las delecciones: *Ura3-52* es un marcador auxótrofo común y bien caracterizado y significa que el gen *Ura3* natural (o el nombre del gen sistemático *YEL021w*) se ha mutado mediante la inserción de un elemento *TY1* (transponible). El gen *Ura3* codifica una enzima, orotidina-5'-fosfato (OMP) descarboxilasa, que cataliza la sexta etapa enzimática en la biosíntesis de novo de pirimidinas. Esta mutación es una mutación no reversible (Rose y Winston, 1984).

20 *His3* también es un marcador común y bien caracterizado y significa que el gen *His3* (*YOR202w*) es una forma mutada no reversible que lo hace auxótrofo. *His3* codifica una enzima, la imidazologlicerol-fosfato deshidratasa, que cataliza la sexta etapa en la biosíntesis de histidina.

Leu2 es un marcador auxótrofo común. Por lo general, estos marcadores auxótrofos consisten en mutaciones y mutaciones de cambio de marco en la posición *leu2-3,112* (Meira et al., 1995). Sin embargo, en esta cepa, los
25 autores de la presente invención han eliminado las partes principales del gen *LEU2* utilizando el método descrito anteriormente (Erdeniz et al., 1997) para hacer que la cepa auxótrofa para *Leu2* evite las estrategias de mutación en las cepas de los autores de la presente invención.

Trp1 es un marcador auxótrofo común en cepas de *S. cerevisiae* de laboratorio. Los autores de la presente invención eliminaron las partes principales del gen *TRP1* utilizando el método descrito anteriormente (Erdeniz et al.,
30 1997) para volver auxótrofa la cepa para *TRP1* para evitar las estrategias de mutación en las cepas de los autores de la presente invención.

ARO10 (*YDR380w*) codifica una enzima, la fenilpiruvato descarboxilasa, que cataliza la descarboxilación de fenilpiruvato a fenilacetaldehído, en la ruta de Ehrlich (también denominada ruta del alcohol fusel), lo que significa la generación de alcoholes a partir de aminoácidos por transaminación, seguida de una descarboxilación y una etapa final de reducción (transaminasa => descarboxilasa => reductasa/deshidrogenasa).
35

Ruta del resveratrol

Los genes heterólogos insertados codifican las enzimas implicadas en la ruta de fenilpropanoide. Esta ruta implica el consumo de L-fenilalanina a través del ácido cinámico a ácido cumárico a cumaril-CoA. Finalmente, la formación de resveratrol es posible a través de la resveratrol sintasa de la uva. El resveratrol producto formado es un nutraceutico con propiedades anticancerígenas y antioxidantes. Los genes son los siguientes:
40

a) Fenilalanina amoniaco liasa (*PAL2*) con codones optimizados de *Arabidopsis thaliana* para la expresión en *S. cerevisiae* que cataliza la desaminación de fenilalanina a ácido cinámico.

b) Un fragmento de ADN fusionado que consiste en tres genes (partes):

Parte i) un gen de cinnamato 4-hidroxilasa (*C4H*) de *Arabidopsis thaliana* con codones optimizados para la expresión en *S. cerevisiae*;
45

Parte ii) Portador de electrones Citocromo b5 *CYB5* codificado por ORF nativo *YNL111c* de *S. cerevisiae*;

Parte iii) Un gen de citocromo p450 reductasa (*AR2*) de *Arabidopsis thaliana*, con codones optimizados para la expresión en *S. cerevisiae*.

Las tres partes se han fusionado de tal manera que se expresan como una única enzima y la orientación del fragmento de ADN fusionado es > Codón de inicio *C4H::CYB5::AR2* codón de parada < (donde :: representa genes fusionados en el marco) . Estas construcciones de fusión permiten actividades catalíticas más elevadas de la etapa de hidroxilación (conversión de ácido cinámico en ácido cumárico), que cuando *C4H* se expresa solo.
50

c) Una 4-cumaroil CoA-ligasa sin codones optimizados (4CL2) de *Arabidopsis thaliana* que cataliza la activación del ácido cumárico a cumaroil-CoA mientras que consume ATP y acetil-CoA.

d) Resveratrol sintasa con codones optimizados de uva (*Vitis vinifera*) que cataliza la reacción de plegamiento del anillo de un cumaroil-CoA y 3 malonil-CoA en resveratrol.

5 Las secuencias reguladoras que permiten la expresión únicamente del gen o los genes de interés.

Promotor TEF1 de *S. cerevisiae* (Mumberg et al., 1995), que es el promotor del gen YBR118w. Este gen codifica un promotor del factor de elongación de la traducción EF-1 alfa TDH3 de *S. cerevisiae* (Mumberg et al., 1995), que es el promotor del gen YGR192c. Este gen codifica una gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

Terminador CYC1 del gen de *S. cerevisiae* YJR048w que codifica la isoforma 1 del citocromo C.

10 Terminador ADH1 del gen de *S. cerevisiae* YOL086c que codifica la alcohol deshidrogenasa 1.

Terminador LEU2 del gen de *S. cerevisiae* YCL018W que codifica la beta-isopropilmalato deshidrogenasa.

Las secuencias de nucleótidos necesarias para el mantenimiento del vector.

- Ori F para la replicación y subclonación en *E. coli* (sin embargo, no tiene función en *S. cerevisiae*).

- Ori de 2 micras para la replicación en *S. cerevisiae*.

15 - Gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli* (sin embargo, no tiene función y no se expresa en *S. cerevisiae*).

- Marcadores auxótrofos de aminoácidos URA3 e HIS3 y LEU2 y TRP1 para la selección y el mantenimiento en *S. cerevisiae*.

La invención se describirá e ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

20 En este trabajo se han utilizado ciertos métodos que se describirán brevemente aquí.

Tecnología de infusión

Se generaron las construcciones de vectores utilizando i) la clonación basada en enzimas de restricción convencionales combinada con la ligación utilizando ADN ligasa de T4 o ii) la tecnología Infusión (In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit) de Clontech (Clontech, Mountain View, CA). Esta tecnología In-Fusion permite la recombinación homóloga entre un plásmido linealizado y un inserto generado por PCR que contiene salientes homólogos al vector linealizado. El vector linealizado se generó por digestión con enzimas de restricción o por PCR utilizando Herculase® II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies - Stratagene, La Jolla, CA) y cebadores con una temperatura de fusión de 60 grados Celsius.

30 *Método bipartito de expresión en exceso de genes de levadura nativos mediante el método de direccionamiento de genes basado en el marcador URA de Kluyveromyces lactis.*

La expresión en exceso de genes de levaduras nativas con promotores de levadura constitutivos se lleva a cabo por medio de un método de sustitución del promotor basado en un sustrato de direccionamiento de genes generados por PCR lineal y utilizando URA3 de *K. lactis* como un marcador reciclable descrito previamente (Erdeniz et al., 1997). Este método incluye la generación de una cepa de levadura intermedia, donde el gen marcador URA3 de *Kluyveromyces lactis* se integra combinado con dos copias de la secuencia promotora constitutiva fuerte como una repetición directa en cada lado del gen marcador. El gen marcador se enlaza a continuación a través de la recombinación mediada por la repetición directa, un evento que se selecciona cultivando en placa la cepa intermedia sobre un medio que contiene ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), que es tóxico para las células que expresan el gen URA3. El resultado es una cepa de levadura, en la cual el promotor nativo ha sido reemplazado por el promotor constitutivo fuerte. La integración de la secuencia promotora descrita anteriormente y el gen marcador se dirige a la ubicación correcta en el genoma por medio de secuencias diana generadas por PCR.

El sustrato de direccionamiento de genes descrito anteriormente se puede construir por medio de múltiples rondas de fusión-PCR. Sin embargo, para evitar la introducción de mutaciones generadas por PCR, es beneficioso utilizar un sustrato de direccionamiento de genes bi-partito o incluso cuádruple (Erdeniz et al., 1997).

45 Por ejemplo, para expresar en exceso un gen con el promotor fuerte de ADH1, este promotor se ha introducido en vectores de trabajo intermedios a cada lado de URA3 de *K. lactis*, dando como resultado los vectores pWAD1, pWAD2, (documento WO2005/118814). Con estos vectores como moldes, se pueden amplificar fragmentos que contienen (en la dirección de 5' a 3') 1) el ADH1 acoplado a dos tercios de URA3 de *K. lactis* hacia el extremo 5', utilizando los cebadores AD-fw e Int3', y 2) dos tercios de URA3 de *K. lactis* hacia el extremo 3' acoplado a ADH1, utilizando los cebadores Int5' y AD-rv. Se amplifican las secuencias diana correspondientes a una secuencia de 300-

500 pb aguas arriba del gen que se va a expresar en exceso y 300-500 pb que comienzan con ATG del gen que se va a expresar en exceso, a partir de ADN genómico de levadura utilizando cebadores adecuados. El cebador inverso utilizado para la amplificación de la secuencia diana aguas arriba contiene un saliente 5' que permite la fusión con el fragmento 1 descrito anteriormente. El cebador directo utilizado para la amplificación de la secuencia diana que comienza con ATG contiene un saliente 5' que permite la fusión con el fragmento 2 descrito anteriormente. Después de la fusión por PCR de la secuencia diana aguas arriba con el fragmento 1, y fusión por PCR del fragmento 2 con la secuencia diana que comienza con ATG, los dos sustratos lineales están listos para la transformación.

Método cre/lox para delección de genes

La delección de genes diana se llevó a cabo por medio de un método basado en un sustrato de direccionamiento de genes generados por PCR, lineal utilizando un marcador auxótrofo o de resistencia a antibióticos flanqueado por secuencias de 34 pb llamadas sitios loxP, junto con un plásmido que contiene recombinasa (Johansson y Hahn-Hagerdal, 2002, Yoon et al., 1998).

El método utiliza una recombinasa cre procedente del bacteriófago P1 que reconoce y facilita un evento de recombinación entre secuencias loxP que causa la pérdida de la secuencia marcadora entre estos sitios. Este método incluye la generación de una cepa de levadura intermedia, donde el gen marcador elegido se integra combinado con dos copias de las secuencias de direccionamiento loxP como una repetición directa a cada lado del gen marcador. La cepa intermedia también contiene un plásmido de replicación autónoma que lleva un marcador auxótrofo o de resistencia a antibióticos y un gen de recombinasa Cre controlado por el promotor inducible por galactosa GAL1. El gen marcador enlaza a continuación a través de la recombinación mediada por la recombinasa Cre que se dirige a los sitios loxP, un evento activado por el metabolismo de la galactosa. El resultado es una cepa de levadura, en la que la secuencia codificante del gen diana ha sido reemplazada por un sitio loxP.

El sustrato de direccionamiento de genes descrito anteriormente se puede construir por medio de fusión-PCR. Sin embargo, para evitar la introducción de mutaciones generadas por PCR, es beneficioso utilizar un sustrato de direccionamiento de genes bi-partito o incluso cuádruple (Erdeniz et al., 1997).

Por ejemplo, para eliminar un gen diana utilizando un marcador elegido, es decir URA3 de *K. lactis* flanqueado por sitios loxP, se han introducido dos sitios de 34 pb en un vector de trabajo a cada lado, lo que da como resultado el vector pUG72 (Johansson y Hahn-Hagerdal, 2002). Con este vector como molde, se pueden amplificar fragmentos que contienen (en la dirección 5' a 3') i) la secuencia loxP acoplada a dos tercios de URA3 de *K. lactis* hacia el extremo 5', utilizando los cebadores URA3_R 5'-ATACATTTGCCTTTTGAAAAC y X1_F 5'-GTCAGCGGCCGCATCCCTGCTACGCTGCAGGTCGACAA, y ii) dos tercios de URA3 de *K. lactis* hacia el extremo 3' acoplado a una secuencia loxP, utilizando los cebadores X2_R 5'-CACGGCGCGCCTAGCAGCGGAGGCCACTAGTGGATCTGATAT y URA3_F 5'-CCAACAATGATGATATCTGATC.

Las secuencias diana correspondientes a una secuencia de 300-500 pb aguas arriba del gen que se va a suprimir y a 300-500 pb del codón de parada del gen que se va a eliminar, se amplifican a partir de ADN genómico de levadura utilizando cebadores adecuados. El cebador inverso utilizado para la amplificación de la secuencia diana aguas arriba contiene un saliente 5' que permite la fusión con el fragmento 1 descrito anteriormente. El cebador directo utilizado para la amplificación de la secuencia diana que comienza con el codón de parada contiene un saliente 5' que permite la fusión con el fragmento 2 descrito anteriormente. Después de la fusión por PCR de la secuencia diana aguas arriba con el fragmento 1, y la fusión por PCR del fragmento 2 con la secuencia diana que comienza con el codón de terminación, los dos sustratos lineales están listos para la transformación.

Transformaciones de levadura y nomenclatura

La transformación de células de levadura se lleva a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando el método de transformación con acetato de litio (Gietz y Schiestl, 1991) seguido de cultivo en placa sobre medio selectivo, placas de agar completo sintético que carecen de aminoácidos correspondientes a los marcadores en los vectores y la auxotrofia de los mutantes de levadura. En general, a menos que se establezca en los Ejemplos específicos, las cepas resultantes después de la transformación recibieron la siguiente nomenclatura de cepas FSX-Y-Z-V-W, donde X es el fondo de cepa e Y, Z, V, W indican vectores, integrativos y auto-replicantes de 2 micras de múltiples copias, que se han transformado en esa cepa de fondo X. Por ejemplo, tomando Ejemplos de cepas para FS01529-9-28 y FS09258-53-32-44-51 que aparecen en los siguientes Ejemplos, para la cepa FS01529-9-28, la cepa X de levadura de fondo de cepa es 01529 y contiene los vectores Y y Z, que son el vector RHO009 y RHO028. Para la cepa FS09258-53-32-44-51, el fondo de cepa X es 09258 y la cepa contiene los vectores, Y, Z, V, W, que son RHO053, RHO032 RHO044 y RHO051, respectivamente.

Extracción de lípidos de la levadura

Antes de la extracción de lípidos, se realizó una estimación de la concentración de peso seco (PS) del cultivo y el cultivo se diluyó o se concentró en dH₂O de manera que se obtuvo una suspensión con una concentración de peso seco de aproximadamente 8 mg/ml.

Las células para extracción se prepararon transfiriendo 1 ml de suspensión celular (aproximadamente 8 mg de peso

seco) a tubos de trans-metilación (100 x 16 mm) con microtubos con tapa de rosca de color "negro" con un revestimiento de PTFE de color "rojo", con tapón de rosca (SciLabware Limited, Staffordshire, Reino Unido), se centrifugaron a 8.000 rpm durante 4 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 50 µl de patrón interno (C23:0 FFA, > 99% p.a., Larodan) con 1 ml de metanol, 1 ml de HCL metanólico y 600 µl de heptano (con BHT al 0,02%), las muestras se sometieron a agitación vorticial y se incubaron durante 60 min a 100°C con sacudidas a mano durante 5 segundos cada 20 minutos. Después de la incubación, las muestras se dejaron enfriar por debajo de la temperatura ambiente en un baño de hielo. Con posterioridad, se añadieron 2 ml de milli-Q H₂O y se sometieron a agitación vorticial brevemente y la muestra se centrifugó a 1.730 rpm durante 2 minutos. Se transfirieron aproximadamente 150 µl de la fase de heptano superior a un vial para CG con un inserto (200 µl) y se almacenaron a -20°C hasta el análisis de CG.

Cromatografía de gases con detección de FID

Se analizaron FAME en un cromatógrafo de gases (GC) (Agilent 7890A, Agilent) acoplado a un detector de ionización de llama (FID). El GC-FID se hizo funcionar con un autoinyector (GC-Pal, CTC Analytics) y el soporte lógico para GC, EZChrom Elite (versión 3.3.1).

Los volúmenes de inyección de muestra fueron 1 µl (2-6 mg/mL) y la razón de división 200:1 se hizo funcionar a una temperatura de inyector de 250°C. El número de enjuagues con muestra antes de la inyección fue de 1 y después de la inyección el número de enjuagues con disolvente fue de 5. Las muestras se separaron en una columna DB-Wax (10 m x 0,1 mmDI, 0,1 µm de espesor de película) (J & W Scientific). La columna se ajustó a un detector de ionización de llama (FID) para la identificación y la cuantificación. Se utilizó hidrógeno como gas portador y se hizo funcionar a una velocidad lineal de 30 ml/min. Basándose en la naturaleza polar del revestimiento de la columna (DB-Wax al 100%) y un programa de temperatura optimizado (véase a continuación), se separaron FAME de acuerdo con las diferencias de polaridad y punto de ebullición. La temperatura del horno se fijó inicialmente a 190°C. Inmediatamente después de la inyección, se aumentó hasta 230°C a 40°C/min, después se aumentó hasta 240°C a 12°C/min y finalmente se aumentó hasta 260°C a 60°C/min y se mantuvo durante 0,5 min. El tiempo total de ejecución fue de 3,0667 min.

En el lado de FID, se utilizó nitrógeno como gas de relleno (25 mL/min) y la razón de aire/hidrógeno se ajustó a 13,33:1 (400:30 mL/min). El detector de FID se ajustó a 275°C.

Los FAME se identificaron en función del tiempo de retención relativo (TRR). Utilizando el soporte lógico para GC (EzChrom Elite), se produjeron TRR y se actualizaron utilizando una matriz de FAME patrón disponibles comercialmente (patrón de referencia para GLC 68D, 409 y 85, Nu-Chek-Prep) y C22:4 (n-6), C23: 0, C22: 5 (n-3) y C18: 4 (n-3) (Sigma, Larodan y Avanti). Se ejecutó rutinariamente un patrón de FAME cuantitativo (GLC 68D, Nu-Chek-Prep) para controlar el estado de la columna y el rendimiento global de la GC.

Cuantificación y rendimiento de ácidos grasos

La cuantificación se basó en datos de FID autointegrados por el soporte lógico de GC y se corrigió manualmente para artefactos potenciales. Las cantidades de ácidos grasos individuales (FA) y FA totales (mg) se calcularon basándose en ISTD (C23:0 FFA), agregado durante la extracción de lípidos. Se preparó ISTD en una solución de cloroformo:metanol (2:1, v/v) y se añadió una cantidad adecuada para representar un 5-10% de los FA totales. El rendimiento de FA (mg FA/g PS) se determinó por medio de un cálculo basado en ISTD y se dividió por el peso seco (PS) de la biomasa en 1 ml de la suspensión celular inicial.

Ejemplo 1. Aislamiento de los genes de la ruta del resveratrol que codifican PAL2, C4H, ATR2, 4CL2, 4CL1 y VST1

Se sintetizaron fenilalanina amoniaco liasa (gen PAL2) con codones optimizados para *S. cerevisiae* de *Arabidopsis thaliana* (Cochrane et al., 2004) (SEQ ID NO: 14), cinnamato 4-hidroxilasa (gen C4H) con codones optimizados para *S. cerevisiae* de *Arabidopsis thaliana* (Mizutani et al., 1997) (SEQ ID NO: 15), citocromo P450 reductasa (gen ATR2) con codones optimizados para *S. cerevisiae* de *Arabidopsis thaliana* (Mizutani y Ohta, 1998) (SEQ ID NO: 16), 4-cumarato:coenzimaA ligasa (4CL1) con codones optimizados para *S. cerevisiae* de *Arabidopsis thaliana* (Hamberger y Hahlbrock 2004; Ehltting et al., 1999) (SEQ ID NO: 17), y resveratrol sintasa (gen VST1) con codones optimizados de *Vitis vinifera* (vid) (Hain et al., 1993) (SEC ID NO: 18) para su expresión en *S. cerevisiae* por medio de GenScript Corporation (Piscataway, NJ). Los genes con codones optimizados sintéticos se suministraron insertados en el vector pUC57 de *E. coli*. Los genes sintéticos se reamplificaron con PCR utilizando los vectores pUC57 como moldes. Después de la digestión con DPN1, los productos de PCR se purificaron en gel de agarosa utilizando el kit de extracción en gel QiaQuick (Qiagen).

Se aisló 4-cumarato:coenzima A ligasa (4CL2) (Hamberger y Hahlbrock 2004; Ehltting et al., 1999) (SEQ ID NO: 19) mediante PCR a partir de ADNc de *A. thaliana* (BioCat, Heidelberg, Alemania) utilizando el cebador directo 5'-GC GAATTC TT ATGACGACAC AAGATGTGAT AGTCAATGAT (SEC ID NO: 20) que contiene el sitio de restricción EcoRI subrayado y el cebador inverso 5'-GC ACTAGT ATC CTA GTT CAT TAA TCC ATT TGC TAG TCT TGC T (SEQ ID NO: 21) que contiene el sitio de restricción Spel subrayado.

Construcción de vector que produce resveratrol

Ejemplo 2. Construcción de un vector de levadura para la expresión inducida por galactosa PAL2 y el gen de fusión C4H:ATR2

El gen que codifica PAL2 de *A. thaliana* fue reamplificado por PCR a partir del vector Genscript pUC-57-PAL2 utilizando el cebador directo 5-CTC ACT AAA GGG CGG CCG CAT GGA CCA AAT TGA AGC AAT-3 (SEQ ID NO: 22) que contiene el sitio de restricción EcoRI y el cebador inverso que contiene el sitio de restricción BglII 5-TAA GAG CTC AGA TCT TTA GCA GAT TGG AAT AGG TG-3 (SEQ ID NO: 23).

El gen que codifica C4H de *A. thaliana* fue reamplificado por PCR a partir del vector Genscript pUC-57-C4H utilizando el cebador directo 5-GAA GAA GAC CTC GAG ATG GAT TTG TTA TTG CTG GA-3 (SEQ ID NO: 24) y el cebador inverso 5 AGT AGA TGG AGT AGA TGG AGT AGA TGG ACA ATT TCT GGG TTT CAT GA-3 (SEQ ID NO: 25). ATR2 de *A. thaliana* se reamplificó mediante PCR a partir del vector Genscript pUC-57-ATR2 utilizando el cebador directo 5-CCA TCT ACT ACT CCA TCT ACT CCA TCT ACT CCA TCT ACT AGG AGG AGC GGT TCG GGC-3 (SEC ID 26) y el cebador inverso 5-GCT AGC CGC GGT ACC TTA CCA TAC ATC TCT CAG ATA T-3 (SEQ ID NO: 27).

Los productos de PCR amplificados C4H y ATR2 se utilizaron como moldes para la creación del gen de fusión C4H:ATR2 utilizando el cebador directo 5-GAA GAA GAC CTC GAG ATG GAT TTG TTA TTG CTG GA-3 (SEQ ID NO: 28) y el cebador inverso 5-GCT AGC CGC GGT ACC TTA CCA TAC ATC TCT CAG ATA T-3 (SEQ ID NO: 29).

El gen de fusión C4H:ATR2 se digirió con XhoI/KpnI y se ligó en pESC-URA-PAL2 digerido con XhoI/KpnI. El plásmido resultante, pESC-URA-PAL2-C4H:ATR2 (RHO003), contenía los genes que codificaban PAL2 y C4H:ATR2 bajo el control de los promotores \leq GAL1/GAL10 \Rightarrow inducidos por galactosa divergentes. La secuencia del gen que codifica C4H:ATR2 se verificó por secuenciación de dos clones diferentes de RHO003.

Ejemplo 3. Construcción de un vector de levadura para la expresión inducida por galactosa de PAL2 y el gen de fusión C4H:CYP5:ATR2

El gen que codifica PAL2 de *A. thaliana* fue reamplificado por PCR a partir del vector Genscript pUC-57-PAL2 utilizando el cebador directo 5-CTC ACT AAA GGG CGG CCG CAT GGA CCA AAT TGA AGC AAT-3 (SEQ ID NO: 30) que contiene el sitio de restricción EcoRI y el cebador inverso que contiene el sitio de restricción BglII 5-TAA GAG CTC AGA TCT TTA GCA GAT TGG AAT AGG TG-3 (SEQ ID NO: 31).

El producto de la PCR PAL2 amplificado se digirió con EcoRI/BglII y se ligó en el vector pESC-URA digerido con EcoRI/BglII (Stratagene), dando como resultado el vector pESC-URA-PAL2. Se secuenciaron dos clones diferentes de pESC-URA-Pal2 para verificar la secuencia del gen clonado.

PAL2 de *A. thaliana* se reamplificó por PCR a partir del vector Genscript pUC-57-PAL2 utilizando el cebador directo 5-GAA GAA GAC CTC GAG ATG GAT TTG TTA TTG CTG GA-3 (SEQ ID NO: 32) y el cebador inverso 5-ACC TAG AGC ACC ACC ACA ATT TCT GGG TTT CAT GAC T-3 (SEQ ID NO: 33). ATR2 de *A. thaliana* fue reamplificado por PCR del vector Genscript pUC-57-ATR2 utilizando el cebador directo 5-GGT GCT ATT CTA GTT GGT AGG AGG AGC GGT TCG GGC-3 (SEQ ID NO: 34) y el cebador inverso 5-GCT AGC CGC GGT ACC TTA CCA TAC ATC TCT CAG ATA T-3 (SEQ ID NO: 35). CYP5 (codificado por el gen YNL111c de *S. cerevisiae*) se amplificó utilizando ADN genómico purificado de *S. cerevisiae* como molde utilizando el cebador directo 5-CCA GCT CAA TCA GTT CCA GCT CTT TCA GTT CCT AAA GTT TAC AGT TAC C-3 (SEQ ID NO: 36) y el cebador inverso 5-AAC TAG AAC TGA TTG AGC AGT TGG TGA TGG TTT ACT TTG GTT TTC AGA GG-3 (SEQ ID NO: 37).

Los productos de PCR amplificados C4H, CYP5 y ATR2 se utilizaron como moldes para la creación del gen de fusión C4H:CYP5:ATR2 utilizando el cebador directo 5-GAA GAA GAC CTC GAG ATG GAT TTG TTA TTG CTG GA-3 (SEQ ID NO: 38) y el cebador inverso 5-GCT AGC CGC GGT ACC TTA CCA TAC ATC TCT CAG ATA T-3 (SEQ ID NO: 39).

El gen de fusión C4H:CYP5:ATR2 se digirió con XhoI/KpnI y se ligó en pESC-URA-PAL2 digerido con XhoI/KpnI. El plásmido resultante, pESC-URA-PAL2-C4H:CYP5:ATR2 (RHO004), contenía los genes que codificaban PAL2 y C4H:CYP5:ATR2 bajo el control de los promotores \leq GAL1/GAL10 \Rightarrow inducidos por galactosa divergentes. La secuencia del gen que codificaba C4H:ATR2 se verificó por secuenciación de dos clones diferentes de (RHO004).

Ejemplo 4. Construcción de un vector de levadura para la expresión inducida por galactosa de 4CL2 y VST1

El gen que codificaba 4CL2 se aisló como se describe en el Ejemplo 5. El producto de la PCR 4CL2 amplificado se digirió con EcoRI/Spe1 y se ligó en el vector pESC-HIS digerido con EcoRI/Spe1 (Stratagene), dando como resultado el vector pESC-HIS-4CL2. Se secuenciaron dos clones diferentes de pESC-HIS-4CL2 para verificar la secuencia del gen clonado.

El gen que codificaba VST1 se reamplificó a partir del vector Genscript puc57-VST1 mediante PCR utilizando el cebador directo 5'-CC GGATCC ATG GCA TCC GTA GAG GAG TTC AGA A-3' (SEQ ID NO: 40) que contiene el sitio de restricción BamHI subrayado y el cebador inverso 5'-CG CTCGAG TCA TTA GTT AGT GAC AGT TGG AAC AGA GT-3' (SEQ ID NO: 41) que contiene el sitio de restricción subrayado para XhoI. El gen VST1 sintético

amplificado se digirió con BamH1/Xho1 y se ligó en pESC-HIS-4CL2 digerido con BamH1/Xho1. El plásmido resultante, pESC-HIS-4CL2-VST1 (Rh0043), contenía los genes que codificaban 4CL2 y VST1 bajo el control de los promotores \leq GAL1/GAL10 \Rightarrow inducidos por galactosa divergentes. La secuencia del gen que codificaba VST1 se verificó por secuenciación de dos clones diferentes de pESC-HIS-4CL2-VST1.

5 Ejemplo 5. Construcción de un vector de levadura para expresión inducida por galactosa de 4CL1 y VST1

El gen que codificaba 4CL1 se aisló mediante PCR a partir del vector puc57-4CL1 utilizando el cebador directo 5'-TTGAAAATTCGAATTC ATGGCCCCCAAGAA-3' (SEQ ID NO: 42) que contiene el sitio de restricción EcoRI subrayado y el cebador inverso 5'-GCGAAGAATTGTTAATTAA TTAAGACCGTTTGCTAGTTT-3' (SEQ ID NO: 43) que contiene el sitio de restricción para PACI subrayado. El producto de PCR 4CL1 amplificado se digirió con EcoR1/PAC1 y se ligó en el vector pESC-HIS digerido con EcoR1/PAC1 (Stratagene), dando como resultado el vector pESC-HIS-4CL1. Se secuenciaron dos clones diferentes de pESC-HIS-4CL1 para verificar la secuencia del gen clonado.

El gen que codificaba VST1 se amplificó a partir del vector Genscript puc57-VST1 mediante PCR utilizando el cebador directo 5'-CC GGATCC ATG GCA TCC GTA GAG GAG TTC AGA A-3' (SEQ ID NO: 40) que contiene el sitio de restricción BamHI subrayado y el cebador inverso 5'-CG CTCGAG TCA TTA GTT AGT GAC AGT TGG AAC AGA GT-3' (SEQ ID NO: 45) que contiene el sitio de restricción para XHOI subrayado. El gen VST1 sintético amplificado se digirió con BamH1/Xho1 y se ligó en pESC-HIS-4CL1 digerido con BamH1/Xho1. El plásmido resultante, pESC-HIS-4CL1-VST1 (Rh0001), contenía los genes que codificaban 4CL1 y VST1 bajo el control de los promotores \leq GAL1/GAL10 \Rightarrow inducidos por galactosa divergentes. La secuencia del gen que codificaba VST1 se verificó por secuenciación de dos clones diferentes de pESC-HIS-4CL1-VST1 (RHO001).

Ejemplo 6. Construcción de un fragmento promotor constitutivo fuerte TDH3

El promotor TDH3 (GPD) de 600 pares de bases se amplificó a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae* utilizando el cebador directo 5'-GC GAGCTC AGT TTA TCA TTA TCA ATA CTC GCC ATT TCA AAG-3' (SEQ ID NO: 46) que contiene un sitio de restricción Sac1 y el cebador inverso 5'-CG TCTAGA ATC CGT CGA AAC TAA GTT CTG GTG TTT TAA AAC TAA AA-3' (SEQ ID NO: 47) que contiene un sitio de restricción Xba1. El fragmento de TDH3 amplificado se digirió con Sac1/Xba1 y se ligó en el plásmido pRS416 digerido con Sac1/Xba1 (Sikorski y Hieter, 1989) como se describió previamente (Mumberg et al., 1995) dando como resultado el plásmido pRS416-TDH3.

Ejemplo 7. Construcción del fragmento promotor fuerte constitutivo TEF2

Se amplificó el promotor TEF2 de 400 pares de bases a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae* utilizando el cebador directo 5'-GC GAGCTC ATA GCT TCA AAA TGT TTC TAC TCC TTT TTT ACT CTT-3' (SEQ ID NO: 48) que contiene un sitio de restricción Sac1 y el cebador inverso 5'-CG TCTAGA AAA CTT AGA TTA GAT TGC TAT GCT TTC TTT CTA ATG A-3' (SEQ ID NO: 49) que contiene un sitio de restricción Xba1. El fragmento de TEF2 amplificado se digirió con Sac1/Xba1 y se ligó en el plásmido pRS416 digerido con Sac1/Xba1 (Sikorski y Hieter, 1989) como se describió previamente (Mumberg et al., 1995) dando como resultado el plásmido pRS416-TEF2.

35 Ejemplo 8. Construcción del fragmento del promotor TEF y TDH3 constitutivo divergente fusionado

Se construyó un fragmento de fusión divergente entre el promotor TEF2 y el promotor TDH3 comenzando a partir de pRS416-TEF y pRS416-TDH3.

El fragmento de TDH3 de 600 pares de bases se amplificó de nuevo a partir de pRS416-TDH3 utilizando el cebador directo 5' TTGCGTATT GGGCGCTCTTCC GAG CTC AGT TTA TTA TTA TCA ATA CTC GC-3' (SEQ ID NO: 50) que contiene el saliente subrayado para la fusión de PCR al fragmento de TEF2 y el cebador inverso 5' AT GGATCC TCT AGA ATC CGT CGA AAC TAA GTT CTG-3' (SEQ ID NO: 51) que contiene el sitio de restricción BamHI subrayado. Esto dio como resultado un fragmento listo para la fusión al fragmento de TEF2 a continuación.

Se amplificó de nuevo el fragmento de TEF2 de 400 pares de bases que incluía un espaciador de 277 pares de bases aguas arriba del sitio de restricción Sac1 a partir de pRS416-TEF2 utilizando el cebador directo 5' AT GAATTC TCT AGA AAA CTT AGA TTA GAT TGC TAT GCT TTC-3' (SEQ ID NO: 52) que contiene el sitio de restricción EcoR1 subrayado y el cebador inverso 5' TGA TAA TGA TAA ACT GAG CTC GGA AGA GCG CCC AAT ACG CAA AC-3' (SEQ ID NO: 53) que contiene el saliente subrayado para la fusión al fragmento de TDH3. Esto dio como resultado un fragmento de 680 pares de bases listo para la fusión al fragmento de TDH3.

El fragmento de TEF2 de 680 pares de bases y los fragmentos de TDH3 de 600 pares de bases se unieron entre sí (fusionaron) utilizando PCR de fusión con el cebador directo 5' AT GAATTC TCT AGA AAA CTT AGA TTA GAT TGC TAT GCT TTC-3' (SEC ID NO 54) y el cebador inverso 5' AT GGATCC TCT AGA ATC CGT CGA AAC TAA GTT CTG-3' (SEQ ID NO: 55), dando como resultado el fragmento de promotor divergente \leq TEF2/TDH3 \Rightarrow (SEQ ID NO: 56).

55 Ejemplo 9. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva de PAL2 y el gen de fusión C4H:ATR2

El vector pESC-URA-PAL2-C4H:ATR2 con promotores inducibles por galactosa GAL1/GAL10 divergentes se digirió secuencialmente con NotI y BsiWI para eliminar los promotores GAL1/GAL10.

5 El fragmento del promotor <= TEF2/TDH3 => constitutivo divergente (Ejemplo 8) se volvió a amplificar con el cebador directo 5-GC GCGGCCGC TCT AGA AAA CTT AGA TTA GAT TGC TAT GCT TTC-3 (SEQ ID NO: 57) y cebador inverso 5-ATT CGTACG TCT AGA ATC CGT CGA AAC TAA GTT CTG-3 (SEQ ID NO: 58). El producto de PCR resultante se digirió secuencialmente con NotI y BsiWI y se ligó en el vector anterior sin el fragmento GAL1/Gal10. Esto dio como resultado un vector pESC-URA-TDH3-PAL2-TEF1-C4H: ATR2 (RHO0019) con promotores reemplazados, de GAL1/Gal10 a TEF2/TDH3.

10 Ejemplo 10. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva de PAL2 y el gen de fusión C4H:CYB5:ATR2

El vector pESC-URA-PAL2-C4H:CYB5:ATR2 con promotores inducibles por galactosa GAL1/GAL10 divergentes se digirió secuencialmente con NotI y BsiWI para eliminar los promotores GAL1/GAL10.

15 El fragmento del promotor <= TEF2/TDH3 => constitutivo divergente (Ejemplo 8) se volvió a amplificar con el cebador directo 5-GC GCGGCCGC TCT AGA AAA CTT AGA TTA GAT TGC TAT GCT TTC-3 (SEQ ID NO: 57) y el cebador inverso 5-ATT CGTACG TCT AGA ATC CGT CGA AAC TAA GTT CTG-3 (SEQ ID NO: 58). El producto de PCR resultante se digirió secuencialmente con NotI y BsiWI y se ligó en el vector anterior sin el fragmento GAL1/Gal10. Esto dio como resultado un vector pESC-URA-TDH3-PAL2-TEF1-C4H:CYB5:ATR2 (RHO0025) con promotores reemplazados, de GAL1/GA110 a TEF2/TDH3.

Ejemplo 11. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva inducida de 4CL2 y VST1

20 El vector pESC-HIS-4CL2-VST1 con promotores inducibles por galactosa GAL1/GAL10 divergentes se digirió secuencialmente con EcoR1 y BamH1 para eliminar los promotores GAL1/GAL10.

25 El fragmento del promotor <= TEF2/TDH3 => constitutivo divergente (Ejemplo 8) se digirió secuencialmente con EcoR1 y BamH1 y se ligó en el vector linealizado anterior sin el fragmento GAL1/GAL10. Esto dio como resultado un vector pesc-HIS3-TEF2-4CL2-TDH3-VST1 (RHO0011) con promotores reemplazados, de GAL1/GA110 a TEF2/TDH3.

Ejemplo 12. Generación de vectores de control RHO0020 y RHO0022

30 Los vectores pESC-URA3 y pESC-HIS3 (Stratagene) se digirieron con BamHI y EcoRI para eliminar los promotores de galactosa GAL1/Gal10 divergentes. Los promotores TEF/TDH3 divergentes se cortaron del vector RHO009 y se ligaron en dos cadenas principales de vectores de Stratagene abiertas para generar los vectores de control vacíos pESC-URA3-TEF/TDH3 (RHO0020) y pESC-HIS3-TEF/TDH3 (RHO0022).

Ejemplo 13: Generación del vector RHO0028 a partir de RHO0025 (intercambio de marcadores)

35 El marcador URA3 en el vector RHO0025 se intercambió por el marcador HIS3 utilizando la tecnología Infusion. La cadena principal del vector RHO0025 a excepción del casete del marcador URA3 se linealizó con PCR utilizando la polimerasa Herculasa II con el cebador directo 5'-ATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGG-3' (SEQ ID NO: 59) y el cebador inverso 5'-CTC TCA GTA CAA TCT GCT CTG ATG CCG-3' (SEQ ID NO: 60). El casete del marcador HIS3 se amplificó de nuevo a partir de pESC-HIS (Stratagene) utilizando el cebador directo 5' CAGAGCA GATTGTACTG AGAG GAG CTT GGT GAG CGC TAG GAG TCA y el cebador inverso 5'-CGG TAT TTT CTC CTT ACG CAT GGA AAG CGC GCC TCG TTC AGA ATG-3' (SEQ ID NO: 62) con los salientes homólogos subrayados para el vector RHO0025 linealizado. Los dos fragmentos se recombinaron utilizando el kit de Clonación Infusion. El vector resultante pESC-HIS3-TDH3-PAL2-TEF1-C4H:CYB5:ATR2 (RHO0028).

Ejemplo 14. Generación del vector RHO009 a partir de RHO0011 (intercambio de marcadores)

45 El marcador HIS3 en el vector RHO0011 se intercambió por el marcador URA3 utilizando la tecnología Infusion. La cadena principal del vector RHO0011 a excepción del casete marcador HIS3 se linealizó con PCR utilizando la polimerasa Herculasa II con el cebador directo 5'-TCG ACG GAT CTA TGC GGT GTG AAA TAC C-3' (SEQ ID NO: 63) y el cebador inverso 5' -ACT CTC AGT ACA ATC TGC TCT GAT GCC G-3' (SEQ ID NO: 64). El casete del marcador URA3 se volvió a amplificar a partir de pESC-URA (Stratagene) utilizando el cebador directo 5'-AGA GCAGATTGTA CTGAGAGT CAT CAG AGC AGA TTG TAC TGA GAG TGC-3' (SEQ ID NO: 65) y el cebador inverso 5'-CAC ACC GCA TAG ATC CGT CGA GGA TTT TGC CGA TTT CGG CCT ATT GG-3' (SEQ ID NO: 66) con los salientes homólogos subrayados para el vector RHO0011 linealizado. Los dos fragmentos se recombinaron utilizando el kit de Clonación Infusion. El vector resultante pESC-URA3-TEF2-4CL2-TDH3-VST1 se denominó RHO009.

Ejemplo 15. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva de PAL2, C4H:ATR2, 4CL2 y VST1 que contienen el marcador ura3 RHO0029

Se utilizó RHO0019 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-CAG

AGC AGA TTG TAC TGA GAG TG-3 (SEC ID NO 70) y el cebador inverso 5-ATG CCG CAT AGT TAA GCC A-3 (SEC ID NO 67). Se utilizó RHO0011 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando cebador directo 5-TGG CTT AAC TAT GCG GCA TGA GCG ACC TCA TGC TAT ACC T-3 (SEQ ID NO: 68) y el cebador inverso 5-TCT CAG TAC AAT CTGC TCT GCT GTG GAT AAC CGT ATT ACC G-3 (SEQ ID NO: 69).

- 5 Los dos fragmentos obtenidos por PCR se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion que dio como resultado el plásmido pESC-URA-TDH3-PAL2-TEF1-C4H:ATR2-TDH3-4CL2-TEF-VST1 (RHO0029).

Ejemplo 16. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva de PAL2, C4H:ATR2, 4CL2 y VST1 que contienen el marcador His3 RHO0030

- 10 Se utilizó RHO0011 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando cebador directo 5-CAG AGC AGA TTG TAC TGA GAG TG-3 (SEQ ID NO: 70) y el cebador inverso 5-ATG CCG CAT AGT TAA GCC A-3 (SEC ID NO 67). Se utilizó RHO0019 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-TGG CTT AAC TAT GCG GCA TGA GCG ACC TCA TGC TAT ACC T-3 (SEQ ID NO: 68) y el cebador inverso 5-TCT CAG TAC AAT CTGC TCT GCT GTG GAT AAC CGT ATT ACC G-3 (SEQ ID NO: 69). Los dos fragmentos obtenidos por PCR se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion dando como resultado el plásmido pESC-HIS-TDH3-PAL2-TEF1-C4H:ATR2-TDH3-4CL2-TEF-VST1 (RHO0030).
- 15

Ejemplo 17. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva de PAL2, C4H:CYB5:ATR2, 4CL2 y VST1 que contienen el marcador His3 RHO0032b

- 20 Se utilizó RHO0025 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-CAG AGC AGA TTG TAC TGA GAG TG-3 (SEQ ID NO: 70) y el cebador inverso 5-ATG CCG CAT AGT TAA GCC A-3 (SEC ID NO 67). Se utilizó RHO0011 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando cebador directo 5-TGG CTT AAC TAT GCG GCA TGA GCG ACC TCA TGC TAT ACC T-3 (SEQ ID NO: 68) y el cebador inverso 5-TCT CAG TAC AAT CTGC TCT GCT GTG GAT AAC CGT ATT ACC G-3 (SEQ ID NO: 69). Los dos fragmentos obtenidos por PCR se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion dando resultado el plásmido pESC-HIS-TDH3-PAL2-TEF1-C4H:CYB5:ATR2-TDH3-4CL2-TEF-VST1 (RHO0032b).

- 25 Ejemplo 18. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva de PAL2, C4H:CYB5:ATR2, 4CL2 y VST1 que contienen el marcador Leu2 RHO0044

- 30 El vector RHO0044 (la ruta de resveratrol completa en un vector de múltiples copias autorreplicativo basado en el sistema de expresión de 2 micras con marcador leu2) se construyó de la siguiente manera. Primero se intercambió el marcador HIS3 en el plásmido pes-HIS3-TDH3-4CL2-TEF-VST1 (RhO0011) utilizando la Clonación InFusion fusionando el fragmento i) RHO0011 linealizado construido por PCR con Herculasa II y el cebador directo 5'-TCG ACG GAT CTA TGC GGT GTG AAA TAC C (SEQ ID NO: 63) y el cebador inverso 5'-ACT CTC AGT ACA ATC TGC TCT GAT GCC G (SEQ ID NO: 64) y el fragmento ii) construido amplificando el casete de expresión LEU2 de pESC-LEU2 (Stratagene) con el cebador directo 5'-AGA GCAGATTGTA CTGAGAGT AAG ATG CAA GAG TTC GAA TCT CTT AGC AA (SEC ID NO 71) y el cebador inverso 5'-CAC ACC GCA TAG ATC CGT CGA TCG ACT ACG TCG TAA GGC CGT TTC T-3' (SEQ ID NO: 72). Esto dio como resultado el vector pESC-LEU2-TDH3-4CL2-TEF-VST1 (RhO0072). El casete de expresión que contenía TDH3-PAL2-TEF-C4H::CYb5::ATR2 se insertó a continuación en RHO0072 utilizando Tecnología Infusion entre el fragmento i) RHO0072 linealizado construido mediante PCR con la polimerasa Herculasa II con el cebador directo 5'-AAGATGCAAG AGTTCGAATCTCTTAGCAACC (SEQ ID NO: 73) y el cebador inverso 5'-CTC TCA GTA CAA TCT GCT CTG ATG CC (SEQ ID NO: 60) y el fragmento ii) construido por PCR del plásmido RhO0025 con el cebador directo 5'-CAGAGCAGATTGACTG AGAGGAGCGACCTCATGCTAT ACCT (SEQ ID NO: 74) y el cebador inverso 5'-AGATTCGAACTCTTGATCTT CTGTGGATAACCGTATTACCG-3' (SEQ ID NO: 75). Esto dio como resultado el vector pESC-LEU-TDH3-PAL2-TEF1-C4H:CYB5:ATR2-TDH3-4CL2-TEF-VST1 (RhO0044).
- 40

- 45 Ejemplo 19. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva de PAL2, C4H:CYB5:ATR2, 4CL2 y VST1 que contienen el marcador Ura3-tag2 RHO0053

Se utilizó RHO0025 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) eliminando la secuencia codificante de ura3 utilizando el cebador directo 5-CTC ATT TTG TTA TTC ATT TGT AAA AAA CTG TATATATAG TAA ATG CAT GT-3 (SEQ ID NO: 76) que contiene una etiqueta de ubiquitinación y el cebador inverso 5-TCC TTA TAT GTA GCT TTC GAC AT-3 (SEQ ID NO: 77).

- 50 Se utilizó RHO0020 como molde para la amplificación por PCR de la secuencia codificante de ura3 utilizando el cebador directo 5-ATG TCG AAA GCT ACA TAT AAG GAA CGT G-3 (SEQ ID NO: 78) y el cebador inverso 5-CAA ATG AAT AAA ATG AGA CAA AGA AGA AAA CCA ATT TTT ACA AGC GT TTG CTG GCC-3 (SEQ ID NO: 79) que contiene una etiqueta de ubiquitinación. Los dos fragmentos obtenidos por PCR se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion dando como resultado el plásmido pESC-URA3:TAG-TDH3-PAL2-TEF1-C4H:CYB5:ATR2. El plásmido se llamó RHO0058.
- 55

Se linealizó RHO0058 mediante amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-CAG AGC AGA TTG TAC TGA GAG TG-3 (SEQ ID NO: 70) y el cebador inverso 5-ATG CCG CAT AGT TAA GCC A-3 (SEQ ID NO:

67). Se utilizó RHO0011 como molde para la amplificación por PCR de los casetes de expresión 4CL2 y VST1 (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-TGG CTT AAC TAT GCG GCA TGA GCG ACC TCA TGC TAT ACC T-3 (SEQ ID NO: 68) y el cebador inverso 5 -CT CAG TAC AAT CTGC TCT GCT GTG GAT AAC CGT ATT ACC G-3 (SEQ ID NO: 69). Los dos fragmentos obtenidos por PCR se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion dando como resultado el plásmido pESC-URA3:TAG-TDH3-PAL2-TEF1-C4H:CYB5:ATR2-TDH3-4CL2-TEF-VST1. La secuencia de la etiqueta añadida al extremo C-terminal del producto del gen URA3 fue ACKNWFSSLSHFVIHL (SEQ ID NO: 1). El plásmido se denominó RHO0053. En la Figura 4 aparece un diagrama de este sistema de expresión que contiene el gen de fusión de fenilalanina amoniaco liasa y cinamato-4-hidroxilasa, 4-cumarato-CoA ligasa y resveratrol sintasa. El sistema de expresión tiene una etiqueta adicional ACKNWFSSLSHFVIHL (SEQ ID NO: 1) situada en el extremo C-terminal del gen marcador, en este caso ura3. Una etiqueta alternativa para utilizar aquí sería FYYPIWFARVLLVHYQ (SEQ ID NO: 3).

Ejemplo 20. Transformación de mutantes por delección de Euroscarf con el supuesto resveratrol suprimido para escrutar supuestos transportadores de resveratrol.

Se escrutó la colección de cepas mutantes por delección del archivo Europeo de *S. cerevisiae* para determinar el análisis funcional (Euroscarf). Esta colección consiste en diferentes mutantes en los cuales se ha suprimido un gen conocido (Giaever, et al 2002). De esta biblioteca, los autores de la presente invención seleccionaron mutantes con los transportadores eliminados, identificados en la Tabla 2, que se eligieron como se ha descrito anteriormente.

Tabla 2 Transportadores ABC seleccionados candidatos para el escrutinio

ORF suprimido de la cepa Euroscarf	Nombre del gen para ORF suprimido
YOOOO *1)	Cepa de control, Sin delección
Δ YGR281w	YOR1
Δ YDR406w	PDR15
Δ YDR011w	SNQ2
Δ YOR328w	PDR10
Δ YOR153w	PDR5
Δ YPL058c	PDR12
Δ YNR070w	PDR18
Δ YIL013c	PDR11
*1) El fondo de cepa (genotipo) para la levadura de control YOOOO es [BY4741 MATA his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0] y para cepas con delecciones génicas es [BY4741 MATA his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0 Gene: delta: KanMx] donde Genne:delta:KanMX significa que cada gen ha sido suprimido por la incorporación homóloga del casete de kanamicina (KANMM), resistencia a la geneticina G418.	

Los mutantes por delección de Euroscarf y el control en la Tabla 2 se transformaron con dos vectores RHO009 y RHO0028, que juntos albergaban la ruta completa heteróloga del resveratrol dividida en las dos copias múltiples de 2 micras diferentes. El vector RHO009 contenía los genes que codificaban las enzimas que convierten la fenilalanina en ácido cumárico, es decir, fenilalanina amoniaco liasa (PAL2) de *Arabidopsis thaliana* y Cinamato-4-hidroxilasa (C4H) de *Arabidopsis thaliana* fusionadas en marco a su citocromop-450-reductasa (AR2) de *Arabidopsis thaliana*. RHO0028 contiene los genes que convierten el ácido cumárico en resveratrol, es decir 4-cumarato:CoA-ligasa (4CL2) de *A. thaliana* y resveratrol sintasa (VST1) de *Vitis vinifera*. En detalle, las células de levadura Euroscarf se extrajeron del agar inclinado suministrado de Euroscarf y se inocularon en 5 ml de YPD en tubos de escrutinio estériles durante la noche a 30°C. Las células se transformaron de acuerdo con el método convencional de acetato de litio (Gitez y Schiestl, 1989) con el vector RHO009 y RHO0028. Los transformantes en forma de colonias individuales se seleccionaron sobre placas de agar SC-URA-HIS.

Ejemplo 21. Escrutinio en tubo de ensayo de mutantes por delección del transportador Euroscarf que producen resveratrol

Los transformantes de las placas SC-ura-his se recogieron con asas de inoculación de plástico estériles y se inocularon 5 colonias de cada placa de transformación en 5 ml de medio mineral definido que contenía 40 g/l de glucosa con un suplemento de 750 mg/l de leucina y 300 mg/l de metionina. Las células se cultivaron durante 72 horas hasta que se agotó la glucosa. Los autores de la presente invención calcularon la cantidad de resveratrol producido por biomasa producida (DO600) a las 72 horas cuando se agotó la glucosa. Los valores se presentan en la Figura 8 (mg de resveratrol/DO). Los resultados se presentan como la Cantidad total de resveratrol en mg por DO a las 72 horas. Los mutantes por delección con productores bajos, tales como SNQ2 e YOR1, se consideraron candidatos prometedores para transportadores de resveratrol.

Ejemplo 22. Escrutinio en matraz oscilante de mutantes por delección de transportador Euroscarf que producen resveratrol

El trabajo en los tubos de escrutinio se repitió en matraces oscilantes que contenían un medio mineral definido con 40 g/l de glucosa, 750 mg/l de leucina y 300 mg/l de metionina. Los matraces oscilantes se inocularon a una DO de 0,1 a partir de los tubos de escrutinio cultivados durante 72 horas (Ejemplo 21) y se cultivaron durante 72 horas hasta que se agotó la glucosa. Los autores de la presente invención calcularon la cantidad de resveratrol producido por biomasa producida (DO600) a las 72 horas cuando se agotó la glucosa. Los valores se presentan en la Figura 9 (mg de resveratrol/DO). Los resultados se presentan como la cantidad total de resveratrol en mg por DO a las 72 horas. En el matraz oscilante, el único mutante que produjo niveles más bajos de resveratrol en comparación con el control fue el mutante SNQ2, lo que significa que SNQ2 era un potencial transportador de resveratrol. A diferencia de los resultados en el tubo de escrutinio, esta vez, YOR1 no se consideró un candidato prometedor.

Ejemplo 23. Aislamiento de genes transportadores de resveratrol

El transportador ABC SNQ2 (codificado por el gen YDR011w) (SEQ ID NO: 80) se aisló mediante PCR utilizando ADN genómico de *S. cerevisiae* CEN.PK113-5D K1, que se había preparado utilizando el mini kit QIAamp DNA (Qiagen). El cebador directo fue 5'-TCGACGGATTCTAGAGGATCC ATG AGC AAT ATC AAA AGC ACG CAA GAT A (SEQ ID NO: 81) y el cebador inverso fue 5'-ATC TTA GCT AGC CGC GGT ACC TTAGTGCTTC TTTTCCTTATGT TTTTAATTT TATTGA-3' (SEQ ID NO: 82).

El transportador ABC BcatrB de *Botrytis cinerea* (Schoonbeek et al., 2001) fue sintetizado por GenScript Corporation (Piscataway, NJ) basándose en la secuencia de proteínas para el gen BcatrB (núm. de acceso de proteína Q9UW03). Se optimizaron los codones del gen (SEQ ID NO: 83) para la expresión en *S. cerevisiae*. La secuencia de proteínas en la base de datos para BcatrBp (proteína Q9UW03) tenía una secuencia de aminoácidos indefinida en la posición 99 llamada X. Para revelar qué aminoácido X podía ser, los autores de la presente invención sometieron a búsqueda BLAST la secuencia de proteína BcatrB-Q9UW03 hacia otros transportadores ABC en la base de datos Uniprot (www.uniprot.org/) con los siguientes resultados:

BcatrB/Q9UW03	MPEL ¹ ---QAMQQQSDKD ² -----QAKRRDLGVTWKNLTVKGIGADAX ³	99
A6RVE0	MPEL---QAMQQQSDKD-----QAKRRDLGVTWKNLTVKGIGADAA ⁴	99
Q8TFM7	MPEI ⁵ ---QAMREQGEKD ⁶ -----QVKRRDLGVTWRNLTVKGIGADAA ⁷	106
A7F7S9	MPEI---QAIRNQEEKD ⁸ -----QVKRRDLGVTWKNLTVKGIGADAA ⁹	99
Q96W59	TEEL ¹⁰ ---KQTQQQNEND ¹¹ -----GAKDKKLGITWTDLDIKIGADAA ¹²	93

Búsqueda Blast de la proteína BcatrB y el alineamiento utilizando Clustal W, solo se muestran las secuencias parciales que se conservan, no se indica el número ni la identidad de los aminoácidos intermedios. La X en la posición 99 en la proteína BcatrB se alinea muy bien con alanina en otro transportador ABC con alta homología para BcatrBp.

Otras secuencias con un alto nivel de identidad para la proteína BcatrB revelaron que la X es muy probablemente una alanina (A), que los autores de la presente invención incluyen en el orden final del gen sintético.

¹ SEQ ID NO: 186

² SEQ ID NO: 189

³ SEQ ID NO: 84

⁴ SEQ ID NO: 85

⁵ SEQ ID NO: 187

⁶ SEQ ID NO: 190

5 ⁷ SEQ ID NO: 86

⁸ SEQ ID NO: 191

⁹ SEQ ID NO: 87

¹⁰ SEQ ID NO: 188

¹¹ SEQ ID NO: 192

10 ¹² SEQ ID NO: 88

El gen fue suministrado en un vector puc de *E. coli* convencional (Puc-57-BcatrB). El gen BcatrB se aisló volviendo a amplificar el gen mediante PCR a partir del vector puc-BcatrB con cebadores Directo: TCGACGGATTCTAGAGGATCC ATG GCA GCA ATA GAG CCA GAA GGT TT (SEQ ID NO: 89) e Inverso: ATC TTA GCT AGC CGC GGT ACC TCA TTC AGC ACC TTT TGT TTT CTT TGT TCT C (SEQ ID NO: 90).

15 Ejemplo 24. Generación de vectores de integración con expresión de transportadores de resveratrol

El vector integrativo con promotores TEF/TDH constitutivos y marcador TRP1, denominado pSF057, se construyó de la siguiente manera. El vector RHO011 se digirió con EcoRI y BamHI para obtener el fragmento con los promotores de glucosa TDH3/TEF. A continuación, el vector pESC-TRP (Stratagene) se digirió con las mismas enzimas de restricción, EcoRI y BamHI, para eliminar el fragmento de promotores de galactosa (Gal1/GAI10) de este vector y se mantuvo la cadena principal del vector. El fragmento del promotor de glucosa TEF/TDH3 de RHO0011 se ligó a continuación en la cadena principal restante de pesc-TRP utilizando ADN ligasa de T4. El vector resultante se llamó pSF055. El plásmido pSF055 se digirió con la enzima de restricción Afel y se ligó de nuevo con ADN ligasa de T4. El producto digerido de Afel elimina la mayor parte del origen de 2 micras y convierte un vector autorreplicante de múltiples copias en un vector integrativo. El vector integrativo resultante se llamó pSF057.

25 Los genes BcatrB y SNQ2 del transportador ABC, aislados con los cebadores descritos en el Ejemplo 23, se clonaron en el vector pSF057 bajo el control del promotor TDH3 por medio de clonación por infusión entre los productos de PCR de los transportadores y pSF057 linealizado. El pSF057 se linealizó con la polimerasa Herculasa II y el cebador directo 5'-GGT ACC GCG GCT AGC TAA GAT CCG-3' (SEC ID NO 91) y el cebador inverso 5'-GGA TCC TCT AGA ATC CGT CGA AAC TAA GTT-3' (SEQ ID NO: 92). Los vectores resultantes pSF57-TRP1-TDH3-SNQ2 y pSF057-TRP1-TDH3-BCATRB se denominaron RHO0051 y RHO006, respectivamente.

30 Ejemplo 25 Generación de una cepa de *S. cerevisiae* con dos marcadores *ura3-52* e *his3*.

Se construyó una cepa mutante de levadura marcadora doble FS01528 [MatA *ura3-52*, *his3*] y FS01529 [Matalfa *ura3-52*, *his3*] cruzando FS01210 [Matalfa *his3*] y FS01202 [MatA *ura3-52*] diseccionando esporas y puntuación el mutante de doble delección en placas de agar SC-Ura (medio completo sintético que carece de uracilo) y SC-His (medio completo sintético que carece de histidina) y SC-Ura-His (medio completo sintético que carece de uracilo e histidina).

35 Ejemplo 26. Construcción de una cepa que expresa en exceso el gen ACC1 de *S. cerevisiae* nativo bajo el promotor TPI

El gen de ACC1 de levadura (YNR016c), que codifica la acetil-CoA carboxilasa, se expresó en exceso con el promotor TPI1 de levadura constitutivo como se describió anteriormente (documento WO2005/118814). Esto se hizo reemplazando el promotor de ACC1 nativo por el promotor de TPI1, utilizando un método de reemplazo de promotor ligeramente modificado basado en el método de direccionamiento de genes bipartito. Una parte del sustrato bipartito consistía en dos tercios (hacia el extremo 3') de URA3 de *K. lactis*, fusionado a la secuencia del promotor TPI1 y una secuencia diana correspondiente al comienzo de ACC1. La segunda parte del sustrato bipartito consistía en una secuencia diana aguas arriba de ACC1, fusionada a la secuencia promotora de TPI1 y dos tercios (hacia el extremo 5') de URA3 de *K. lactis*. Tras la transformación con el sustrato bipartito y la selección en medio que carecía de uracilo, se obtuvieron transformantes en los que el promotor nativo había sido eliminado y reemplazado por dos copias de la secuencia del promotor de TPI1 en forma de una repetición directa en cualquier lado del gen marcador URA3 de *K. lactis*. Se seleccionó un segundo evento de recombinación, que dio lugar a la salida del marcador de selección, cultivando en placa de nuevo los transformantes en un medio que contenía ácido 5'-fluoroorótico (5-FOA), que es tóxico para las células que expresan el gen URA3. Esto dio lugar a una cepa, en la cual el promotor ACC1 nativo había sido reemplazado por el promotor TPI1.

Para construir la parte 1 del sustrato bipartito, se amplificaron dos tercios (hacia el extremo 3') de *ura3* de *K. lactis* a partir del plásmido pWJ716 utilizando los cebadores 5' CTTGACGTTTCGTTCCGACTGATGAGC 3' (SEQ ID NO: 93) y 5' CTGGAATTCGATGATGTAGTTTCTGG 3' (SEQ ID NO: 94). Por otra parte, se amplificó la secuencia del promotor *TPI1* a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae* utilizando los cebadores 5' CTACATCATCGAATTCCAGCTACGTATGGTCATTTCTTCTTC 3' (SEC ID NO 95) y 5' TTTTGTATTTAAATTAATAAAAAAAGCTTTTATGTTATGTATGTGTTTTTGTG 3' (SEC ID NO 96) y se amplificó una secuencia de direccionamiento aguas abajo, que consistía en el comienzo del gen *ACC1* (es decir, los primeros 553 pb del gen) a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae* utilizando los cebadores 5' AGTTTTTTAATTATTAATCAAAAAATGAGCGAAGAAAGCTTATTCGAGTC 3' (SEQ ID NO: 97) y 5' CACCTAAAGACCTCATGGCGTTACC 3' (SEQ ID NO: 98). Estos tres fragmentos se fusionaron entre sí en dos rondas de PCR. Primero se fusionó la secuencia del promotor *TPI1* a la secuencia de direccionamiento aguas abajo, utilizando los cebadores 5' CTACATCATCGAATTCCAGCTACGTATGGTCATTTCTTCTTC 3' (SEQ ID NO: 95) y 5' CACCTAAAGACCTCATGGCGTTACC 3' (SEQ ID NO: 98). El producto resultante se fusionó a continuación al fragmento que contenía dos tercios (hacia el extremo 3') de *URA3* de *K. lactis*. El fragmento resultante, 3' 2/3 *K. lactis* *URA3-pTPI1-DOWN(ACC1)* era la parte 1 del sustrato de direccionamiento del gen bipartito.

Para construir la parte 2 del sustrato bipartito, se amplificaron dos tercios (hacia el extremo 5') de *URA3* de *K. lactis* a partir del plásmido pWJ716 utilizando los cebadores 5' CGGTCTGCATTGGATGGTGGTAAC 3' (SEQ ID NO: 99) y 5' GAGCAATGAACCCAATAACGAAATC 3' (SEQ ID NO: 100). La secuencia del promotor *TPI1* se amplificó a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae* utilizando los cebadores 5' CTACATCATCGAATTCCAGCTACGTATGGTCATTTCTTCTTC 3' (SEC ID NO 95) y 5' CACCATCCAATGCAGACCGTTTTAGTTTATGTATGTGTTTTTGTG 3' (SEC ID NO 101), y se amplificó una secuencia diana aguas arriba de *ACC1* a partir de ADN genómico *S. cerevisiae* utilizando cebadores 5' TGTTCTGCTCTTTCAATTTTCTTTCTTC 3' (SEC ID NO 102) y 5' CTGGAATTCGATGATGTAGTTTCTAATTTTCTGCGTGTTCG 3' (SEC ID NO 103). Estos tres fragmentos se fusionaron en dos rondas de PCR. Primero, se fusionó la secuencia de direccionamiento aguas arriba con la secuencia del promotor *TPI1*, utilizando los cebadores 5' TGTTCTGCTCTTTCAATTTTCTTTCTTC 3' (SEQ ID NO: 102) y 5' CACCATCCAATGCAGACCGTTTTAGTTTATGTATGTGTTTTTGTG 3' (SEQ ID NO: 101). El fragmento resultante se fusionó a continuación al fragmento que contenía dos tercios (hacia el extremo 5') de *URA3* de *K. lactis*, dando como resultado el fragmento *UP(ACC1)-pTPI1-5' 2/3 K. lactis* *URA3*, que constituía la parte 2 del sustrato de direccionamiento del gen bipartito.

La cepa de levadura FS01529 [MAT_{alfa} *ura3-52*, *his3*] se transformó con los sustratos lineales *UP(ACC1)-pTPI1-5' 2/3 K. lactis* *URA3* y 3' 2/3 *K. lactis* *URA3-pTPI1-DOWN(ACC1)*. Los transformantes se seleccionaron y se purificaron mediante siembra en estrías en un medio que carecía de uracilo y a continuación se transfirieron a placas que contenían 5-FOA. Los recombinantes salto fuera ("pop-out") se purificaron mediante siembra en estrías en medio que contenía 5-FOA. La cepa resultante se denominó FS09216 y tenía el genotipo [MAT_{alfa} *ura3-52*, *his3*, *TPI-ACC1*]. La correcta integración del promotor *TPI1* fue verificada por medio de PCR de colonias.

Ejemplo 27. Construcción de una cepa con el gen *ARO10* suprimido codificada por YDR380w.

El gen de levadura *ARO10*, que codifica la fenilpiruvato decarboxilasa (YDR380w), se suprimió utilizando el método Cre/*loxP*. Una parte del sustrato bipartito consistía en dos tercios (hacia el extremo 3') de *URA3* de *K. lactis*, un sitio *loxP* localizado entre el gen marcador y la secuencia diana correspondiente a la secuencia aguas arriba de la secuencia codificante de *ARO10*. La segunda parte del sustrato bipartito consistía en dos tercios (hacia el extremo 5') de *URA3* de *K. lactis*, un sitio *loxP* localizado entre el gen marcador y la secuencia diana correspondiente a la secuencia aguas abajo de la secuencia codificante de *ARO10*. Además, se incluyó en la transformación un plásmido que contenía el gen *HIS3*, un gen de recombinasa-Cre controlado por el promotor *GAL1*. Tras la transformación con el sustrato bipartito y la selección sobre medio que carecía de uracilo e histidina, se obtuvieron transformantes de histidina en los que la secuencia codificante de *ARO10* había sido inactivada y reemplazada por dos copias de la secuencia *loxP* como una repetición directa a cualquier lado del gen marcador *URA3* de *K. lactis*. Se seleccionó un segundo evento de recombinación, que dio lugar a la eliminación de los fragmentos sobrantes del marcador de selección, haciendo crecer la transformación seleccionada en medio YP-galactosa durante la noche y volviendo a cultivar los transformantes en el medio YPD. Esto dio lugar a una cepa, en la cual la secuencia codificante *ARO10* nativa ha sido reemplazada por un sitio *loxP*.

Para construir la parte 1 del sustrato bipartito, se amplificaron dos tercios (hacia el extremo 3') de *ura3* de *K. lactis* y el sitio *loxP* del plásmido pUG72 utilizando los cebadores 5' CCA ACA ATG ATG ATA TCT GAT C 3' (SEQ ID NO: 104) y 5' CCG CTG CTA GGC GCG CCG TGG GCG CAA TTA TAA AAC ACT G 3' (SEQ ID NO: 106). Además, la secuencia de direccionamiento homóloga aguas abajo se amplificó a partir de ADN genómico de levadura utilizando los cebadores 5-CCG CTG CTA GGC GCG CCG TGG GCG CAA TTA TAA AAC ACT G-3 (SEC ID NO: 106) y 5-GTT TCA AAT AGA ACG AGG GAG -3 (SEQ ID NO: 105). Los dos fragmentos se fusionaron entre sí mediante PCR utilizando los fragmentos de PCR como molde y los cebadores 5-CCA ACA ATG ATG ATA TCT GAT C-3 (SEC ID NO: 104) y 5- GTT TCA AAT AGA ACG AGG GAG-3 (SEQ ID NO: 105). El fragmento resultante, 3' 2/3 *K. lactis* *URA3-loxP-DOWN(ARO10)* era la parte 1 del sustrato de direccionamiento del gen bipartito.

Para construir la parte 2 del sustrato bipartito, se amplificaron dos tercios (hacia el extremo 5') de *URA3* de *K. lactis* y un sitio loxP del plásmido pUG72 utilizando los cebadores 5' GTC AGC GGC CGC ATC CCT GCT ACG CTG CAG GTC GAC AA 3' (SEQ ID NO: 107) y 5' ATA CAT TTG CCT TTT GAA AAC 3' (SEQ ID NO: 108). La secuencia diana aguas arriba de *ARO10* se amplificó a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae* utilizando los cebadores 5' GCC GTC ATA TAT TAC TTT GAG C 3' (SEQ ID NO: 109) y 5' GCA GGG ATG CGG CCG CTG ACA CAG AAG TCG CGT CAA CTT G 3' (SEQ ID NO: 110). Los dos fragmentos se fusionaron mediante PCR utilizando los fragmentos de PCR generados como moldes, utilizando los cebadores 5' GCC GTC ATA TAT TAC TTT GAG C 3' (SEQ ID NO: 109) y 5' ATA CAT TTG CCT TTT GAA AAC 3' (SEQ ID NO: 108) dando como resultado el fragmento UP(*ARO10*)-loxP-5' 2/3 *K. lactis URA3*, que constituía la parte 2 del sustrato de direccionamiento del gen bipartito.

La cepa de levadura FS09216 [MATalfa ura3-52, his3, TPI-ACC1] se transformó con los sustratos lineales UP(*ARO10*)-loxP-5' 2/3 *K. lactis URA3* y 3' 2/3 *K. lactis URA3-loxP-DOWN(ARO10)*. Los transformantes se seleccionaron y se purificaron mediante siembra en estrías en un medio que carecía de uracilo e histidina. Las cepas seleccionadas se inocularon en YP-galactosa líquida durante la noche y se cultivaron sobre placas YPD. Las colonias individuales se purificaron mediante siembra en estrías sobre placas YPD y se cultivaron en placas réplicas sobre YPG, SC-URA y SC-HIS para confirmar la pérdida de marcador y la pequeñez. La cepa resultante se denominó FS09235 y tenía el genotipo [matalfa ura3-52 his3-11 pTPI-Acc1 deltaaro10]. La correcta integración del promotor TPI1 se verificó mediante PCR de colonias.

El gen LEU2 (codificado por YCL018W) se eliminó parcialmente para permitir el uso de vectores basados en LEU2 en las cepas de levadura mutantes. La cepa parental utilizada para la delección de LEU2 fue FS09216 [Matalfa *ura3-52 his3* pTPI-Acc1]. La delección de LEU2 se realizó utilizando el método de direccionamiento del gen bipartito para delecciones de genes y *URA3* de *Kluyveromyces lactis* como marcador de selección seguido de un rescate del marcador *URA3* sobre placas de 5-FOA (ácido 5-fluoro-orótico) (Erdeniz et al., 1997). Una parte del sustrato bipartito consistió en la secuencia diana correspondiente al comienzo del gen LEU2 fusionado a dos tercios (hacia el extremo 5') de *URA3* de *K. lactis*. La segunda parte del sustrato bipartito consistió en dos tercios (hacia el extremo 3') de *URA3* de *K. lactis* fusionado a la secuencia diana aguas abajo del gen LEU2.

En detalle, el fragmento de la secuencia diana LEU2-up se construyó mediante PCR con ADN genómico de *S. cerevisiae* CEN.PK y cebador directo (LEU2-up-F) 5'-CAGAGGTGCGCTGACGCATATACCT (SEQ ID NO: 111) y el cebador inverso 5'-GCAGGGATGCGGCCGCTGACGCAAAGTTACATGGTCTTAAGTTGG. La secuencia diana de LEU2-Down se construyó mediante PCR a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae* CEN.PK y el cebador directo 5'-CCGCTGCTAGGCGCGCGT GCTCCAGATTTGCCAAAGAATAAGGTCAAC-3' (SEQ ID NO: 112) y el cebador inverso (LEU2-Down-R) 5'-TGTTACACCTAACTTTTTGTGTGGTGCC.

Se generó el fragmento *K. lactis* up (KLURA5-R de 865 pb) mediante PCR con el vector pWJ1042 como molde (Secuencia xx) y el cebador directo 5'-GTCAGCGGCCGCATCCCTGC TTCGGCTTCATGGCAATTCCCG (SEQ ID NO: 113) (dKL5') y el cebador inverso 5' GAGCAATGAACCAATAACGAAATC (SEQ ID NO: 100) (Int3'). El vector pWJ1042 es un vector lanzadera de *E. coli* y contiene el casete de expresión de *ura3* de *K. lactis* completo flanqueado por dos secuencias repetidas de ADN homólogo de 144 pb a cada lado del casete marcador para una fácil recombinación y un rescate de marcadores en 5-FOA.

Se generó el fragmento *K. lactis* down (KLURA3-R de 1246 pb) mediante PCR con el vector pWJ1042 como molde y el cebador directo (Int5') 5'-CTTGACGTTGTTGACTGATGAGC (SEC ID NO: 93) y el cebador inverso 5'-CACGGCGCG CCTAGCAGCGG TAACGCCAGGG TTTTCCAGTCAC (SEC ID NO: 114) (cKL3').

Se fusionó el fragmento de secuencia diana leu2-up con Klura5-R mediante PCR utilizando cebadores Leu2-up-F e Int3'. El fragmento de secuencia diana LEU2-Down se fusionó a KLURA3-R utilizando los cebadores Int 5' y Leu2-Down-R.

Estos fragmentos fusionados se utilizaron para transformar la levadura FS09216 utilizando el método de transformación de acetato de litio convencional. Los transformantes se hicieron crecer en placas SC-URA durante dos días a 30°C y posteriormente se sembraron en estrías en placas de 5-FOA para permitir el salto fuera y el rescate del marcador del segmento del gen que se iba a eliminar. Después de la confirmación de la delección de LEU2, se confirmó el rescate del marcador cultivando en placa la réplica sobre SC-URA y SC-LEU. La nueva cepa con la delección de LEU2 se denominó FS09236 [MATalfa ura3-52 his3 leu2 pTPI1-Acc1].

Ejemplo 29. Generación de la cepa FS09240 matalfa ura3-52, his3, leu2, pTPI-ACC1, deltaAro10

El gen de la levadura *ARO10*, que codifica la fenilpiruvato descarboxilasa, se eliminó utilizando el método Cre/loxP como se describe en el Ejemplo 27.

La cepa de levadura FS09236 [MATalfa ura3-52 his3-11 leu2 pTPI1-Acc1] se transformó con los sustratos lineales UP(*ARO10*)-loxP-5' 2/3 *K. lactis URA3* y 3' 2/3 *K. lactis URA3-loxP-DOWN(ARO10)*. Los transformantes se seleccionaron y se purificaron mediante siembra en estrías sobre medio que carecía de uracilo e histidina. Las cepas seleccionadas se inocularon en YP-galactosa líquida durante la noche y se cultivaron sobre placas YPD. Las colonias individuales se purificaron mediante siembra en estrías sobre placas YPD y se cultivaron en placa réplicas sobre YPG, SC-URA y SC-HIS para confirmar la pérdida de marcador y la pequeñez. La cepa resultante se

denominó FS09240 y tenía el genotipo [MATalfa *ura3-52 his3-11 leu2 pTPI1-Acc1 deltaaro10*]. La correcta integración del promotor TPI1 se verificó mediante PCR de colonias.

Ejemplo 30. Generación de la cepa FS09258 matalfa *ura3-52, his3, leu2, trp1, pTPI-ACC1 deltaAro10*

5 El gen TRP1 (codificado por YDR007W) se eliminó parcialmente para crear un marcador TRP1 no reversible en el mutante de levadura y para permitir la integración de los transportadores de resveratrol en el gen de TRP1 parcialmente eliminado utilizando los vectores integrativos basados en TRP1 RHO0067 y RHO0051. La cepa parental utilizada para la delección de TRP1 fue FS09240 [Matalfa *ura3-52 his3 delta-Leu2 pTPI-Acc1, delta-ARO10*]. La delección se realizó de acuerdo con el método CRE-lox bipartito utilizando el casete Leu2 de *Kluyveromyces lactis* flanqueado por las dianas LOXP (vector pUG73 Euroscarf) como marcador reutilizable para los fragmentos bipartitos.

10 Se generó el fragmento LoxP-Leu2-up de *Kluyveromyces lactis* (1.323 pb) mediante PCR del vector pUG73 utilizando cebador directo (X1F) 5'-GTCAGC GGCCGCATCCC TGCTACGCTGCAGGTCGACAA (SEQ ID NO: 115) y el cebador inverso (KLEU-R) 5'-CAC ACT ACA CAG ATT ATA CCA TG (SEQ ID NO: 116).

15 Se generó el fragmento Leu2-LoxP-down de *Kluyveromyces lactis* (1.500 pb) mediante PCR del vector pUG73 utilizando el cebador directo (KLEU-F) 5'-TTCTCTAACG ACGACGAAATCG (SEQ ID NO: 117) y el cebador inverso 5' CACGGCGCGCCTAGCAGCGG AGCCACTAGTGGATCTGATAT (SEC ID NO: 118) (X2R).

Se generó el fragmento TRP1-up mediante PCR utilizando ADN genómico de *S. cerevisiae* como molde y el cebador directo (TRP-up-F) 5' GAA GAG GAG TAG GGA ATA TTA CTG GCT (SEQ ID NO: 119) y el cebador inverso 5' GCAGGGATGCG GCCGCTGAC ACT CCA AGC TGC CTT TGT GTG CTT AAT (SEC ID NO: 120).

20 Se generó el fragmento TRP1-down mediante PCR utilizando ADN genómico de *S. cerevisiae* como molde y el cebador directo 5' CCGCTGCTAGGCGCGCCGTG CAA GAG TTC CTC GGT TTG CCA GTT ATT A (SEC ID NO: 121) y el cebador inverso (TRP-Down-R) 5' CCT GCG ATG TAT ATT TTC CTG TAC AAT CAA TC (SEQ ID NO: 122).

25 Se fusionó el fragmento TRP1-up al fragmento LoxP-Leu2-up de *Kluyveromyces lactis* mediante PCR de fusión utilizando TRP-up-F y Kleu-R como cebadores. Se fusionó el fragmento Leu2-LoxP-down de *Kluyveromyces lactis* con el fragmento TRP1-down por medio de PCR de fusión utilizando KLEU-F y TRP-DOWN-R como cebadores.

30 Se transformó FS09240 con 10 microlitros de cada uno de los dos productos de PCR fusionados (sustrato bipartito) y se seleccionó sobre placas SC-leu. Se reunieron de cinco a diez transformantes resultantes y se utilizaron para la transformación con 3 microlitros de PSH47 (recombinasa Cre bajo el promotor GAL1 en un vector URA3) sobre placas SC-Leu). Los transformantes resultantes se hicieron crecer durante la noche en YP-galactosa (20 g/l de galactosa 10 g/l de extracto de levadura y 20 g/l de peptona) para la inducción de la recombinasa Cre y el rescate del marcador. Se disolvió un microlitro del cultivo durante la noche en 1 ml de agua estéril y se cultivaron en placa 200 microlitros sobre placas de YPD-agar. Se puntuaron 40 colonias para determinar la falta de crecimiento sobre placas de agar SC-TRP, SC-leu y SC-ura mediante cultivo en placa de réplicas, lo que indicó que la delección de TRP1 y el rescate del marcador habían funcionado. La cepa resultante con delección parcial de TRP1 se confirmó mediante PCR de colonias utilizando el cebador 5'-CTG GGA GCA GAT GAC GAG TTG GT (SEC ID NO: 123) y TRP-DOWN-R. La cepa delta-TRP1 resultante tenía una delección parcial de TRP1 (donde se había eliminado una región del medio de TRP1-ORF al medio del terminador), y se denominó FS09258 [Matalfa *ura3-52 his3 delta-leu2 delta-trp1 pTPI-Acc1, delta-ARO10*].

40 Ejemplo 31. Generación de una cepa con expresión constitutiva de la ruta a resveratrol en la levadura *S. cerevisiae* Fas01529-9-28.

45 Se co-transformó la cepa FS01529 de *S. cerevisiae* (GEN.PK MATa *ura3 His3*) con RHO0028 (pESC-HIS3-TEF-PAL2-TDH3-C4H::CYB5:ATR2) y RHO009 (pESC-URA3-TEF2-4CL2-TDH3-VST1) y la cepa transformada se denominó FS01529-9-28. Los transformantes se seleccionaron en medio que carecía de uracilo e histidina y se purificaron mediante siembra en estrías en el mismo medio.

Ejemplo 32. Generación de una cepa con expresión constitutiva de la ruta a resveratrol en la levadura *S. cerevisiae* FS09258-53-32-44-51.

50 Se transformó primero la cepa FS09258 [Matalfa *ura3-52 his3 delta-leu2 delta-trp1 pTPI-Acc1, delta-ARO10*] con el plásmido RHO0051, se linealizó mediante digestión con HINDIII y se seleccionó sobre placas de agar sólido SC-trp. Después de volver a sembrar en estrías los transformantes sobre nuevas placas de agar sólido SC-trp, las células de esta placa se inocularon en YPD y se transformaron con los plásmidos RHO0053 y RHO0032 y se seleccionaron sobre placas de agar sólido SC-ura-his. A continuación, las cepas se hicieron crecer previamente en medio selectivo (medio líquido SC-ura-his) y se transformaron con el plásmido RHO0044 y se seleccionaron sobre placas de agar sólido SC-ura-his-leu. Esto dio como resultado la cepa FS09258-53-32-44-51.

55

Se generó una segunda cepa de la misma manera pero en lugar de RHO0051 se utilizó RHO0067, se linealizó por medio de digestión con HINDIII, dando como resultado la cepa FS09258-53-32-44-67.

Ejemplo 33. Cultivo en matraz oscilante/pocillo profundo y medios

5 Las cepas de levadura se hicieron crecer en matraces oscilantes de 500 ml con un volumen de trabajo de 50-100 ml o en placas de cultivo con pocillos profundos de 10 ml con 5 ml de volumen de trabajo ("Riplate BV" 850601 de HJ-Bioanalytik GmbH, Alemania) cubiertas con láminas Airpore Tape (número de catálogo 19571) (Qiagen, Maryland, USA). Las placas de cultivo con pocillos profundos y los matraces oscilantes se inocularon a 250 rpm y 30 grados.

10 A menos que se establezca lo contrario, el medio utilizado para el crecimiento y la producción de estilbenoides en el matraz oscilante o los cultivos en pocillos profundos fue un medio mineral definido (denominado medio de Delft) que consistía en i) glucosa o galactosa como fuente de carbono en general 40 g/l a menos que se establezca lo contrario ii) sulfato de amonio, (NH₄)₂SO₄, 30 g/l como fuente de nitrógeno iii) tampón de fosfato que consistía en 12 g/l KH₂PO₄ y 5 g/l de K₂HPO₄ con el medio ajustado a pH 5,5 iv) 2 g/l de MgSO₄·7H₂O y V) 1 ml de una solución de partida 1000X de vitaminas y 1 ml de una solución de partida 1000X de oligoelementos. La solución de vitaminas y la solución de oligoelementos se prepararon como se describió previamente (Verduyn et al., 1992, Boer et al., 2003).

15 Ejemplo 34. Creación de una proteína quimérica que aumenta la hidroxilación del ácido cinámico conduciendo al aumento de la producción de resveratrol

20 La cinamato-4-hidroxilasa (C4H) pertenece a la familia de proteínas de las citocromo P450 monooxigenasas (P450). La enzima es una oxidasa unida a la membrana dependiente de hemo que facilita la adición de un átomo de oxígeno mediante la escisión del di-oxígeno molecular (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). La C4H es soportada por la P450 reductasa (CPR), un donador de electrones, y utiliza el electrón para dividir el oxígeno atmosférico a radicales reactivos del oxígeno. Se cree que el complejo enzimático coopera con el citocromo b₅ que en teoría facilita la transferencia de electrones. Se ha demostrado que los P450 heterólogos en algunos casos no poseen la capacidad de aceptar la donación de electrones desde fuentes endógenas (Guengerich et al., 1993). Por lo tanto, para aprovechar de manera óptima las rutas metabólicas que contienen monooxigenasas en organismos de expresión heterólogos, se ensambla una enzima quimérica que contiene actividad hidroxilasa, citocromo B₅ y reductasa.

25 Se construyeron dos cepas que contenían plásmidos pESC que contenían la ruta del resveratrol con o sin una proteína quimérica (Tabla 3).

Tabla 3

Nombre de la cepa	Cepa parental	Genotipo
FS01529-1-2	FS01529	MATalfa ura3-52 his3 [pESC-ura-pGAL1-C4H-pGAL10-PAL2], [pESC-his-GAL1-4CL1-pGAL10-VST1]
FS01529-1-4	FS01529	MATalfa ura3-52 his3 [pESC-ura-pGAL1-C4H:CYB5:ATR2-pGAL10-PAL2] [pESC-his-GAL1-4CL1-pGAL10-VST1]

30 Las cepas se hicieron crecer en medio de Delft con glucosa al 0,2% y galactosa al 1,8%. Las cepas se cultivaron durante 71 horas alcanzando la fase estacionaria y se tomaron muestras para su extracción y posterior análisis de HPLC (Tabla 4).

Tabla 4

Cepa	DO600	mg/l de resveratrol	mg/l pinosilvina
FS01529-1-2	11,0	11,0	153,7
FS01529-1-4	10,0	45,1	92,9

35 La expresión de la proteína quimérica aumentó el título de resveratrol en 310%.

Ejemplo 35. Ruta del resveratrol en diferentes vectores

Los autores de la presente invención investigaron si habría una diferencia entre una cepa que tenía la ruta completa de resveratrol separada en dos vectores, que se transformaba con RHO009 y RHO0028 frente a una cepa que tenía la ruta completa de resveratrol en un vector tal como RHO0029 o RHO0030 y si una cepa que albergaba dos vectores, cada uno con la ruta de resveratrol completa, conduciría a títulos más altos que una cepa que tuviera solamente un vector con la ruta completa de resveratrol de un solo vector.

Por lo tanto, los autores de la presente invención construyeron las siguientes cepas:

- i) FS0916-9-28 (que tiene una copia de la ruta del resveratrol dividida en dos vectores diferentes.
- ii) FS09216-29-22 que tiene un vector de múltiples copias basado en URA3 con la ruta completa de resveratrol y un vector HIS3 vacío para eliminar la auxotrofia.
- iii) FS09216-30-20 que tiene un vector de múltiples copias basado en HIS3 con la ruta completa de resveratrol y un vector URA3 vacío para eliminar la auxotrofia.
- iv) FS09216-29-30 que tiene un vector de múltiples copias basado en URA3 con la ruta completa de resveratrol y un vector de múltiples copias basado en HIS3 con la ruta completa de resveratrol, esto es, en principio, dos copias de la ruta completa de resveratrol.

Las cepas se hicieron crecer en matraces oscilantes que contenían 100 ml de medio mineral con 40 g/l de glucosa como fuente de carbono. Después de 72 horas, se calculó el resveratrol por medio de la densidad óptica (DO 600). La Figura 10 muestra la cantidad producida de resveratrol por densidad óptica después de cultivos de 72 horas en cepas con la ruta del resveratrol en diferentes vectores.

La cantidad de resveratrol producido por biomasa fue más alta cuando estuvieron presentes dos copias de la ruta del resveratrol, es decir, en FS0916-29-30. Tener una copia de la ruta completa de resveratrol en un vector basado en HIS3 (FS09216-30-20) o en un vector basado en URA3 (FS09216-29-21) produjo resultados similares pero menores que la cepa con dos copias. Tener solo una copia de la ruta separada en dos plásmidos diferentes produjo los rendimientos más bajos de resveratrol (FS09216-9-28).

Ejemplo 36. Estabilidad de la cepa

Se construyó una cepa con una copia de la ruta del resveratrol dividida en dos vectores: FS01529-9-28. También se construyó una segunda cepa con dos vectores cada uno con la ruta de resveratrol completa en el mismo FS01529-29-30 de fondo. Las dos cepas se hicieron crecer en 100 ml de medio mineral definido con 40 g/l de glucosa en una serie de tres matraces oscilantes de 500 ml. La toma de muestras y la medición del resveratrol se realizaron a las 72 horas. Se realizó un estudio de transferencia en serie donde se inocularon 50 microlitros del matraz oscilante 1 en un matraz oscilante nuevo (matraz oscilante 2) con el mismo medio que el cultivo 1. Después de 72 horas se midieron el resveratrol y la densidad óptica y se llevó a cabo un tercer matraz oscilante de la misma manera con toma de muestras a las 72 horas. La Figura 11 muestra los títulos de resveratrol y ODF en tres matraces oscilantes en serie para la cepa FS01529-9-28:

Barras de color negro = resveratrol (mg/l), barras de color gris = densidad óptica (DO600 nm) a las 72 horas en cada matraz oscilante.

La Figura 12 muestra de un modo similar los títulos de resveratrol y DO en tres matraces oscilantes en serie para la cepa FS01529-29-30.

A partir de las Figuras 11 y 12 resulta evidente que la cepa FS01529-29-30 con dos plásmidos que tienen cada uno la ruta de resveratrol completa conduce a títulos de resveratrol más altos que la cepa con solo una copia de la ruta separada en dos vectores FS01529-9-28 como también se observó en el Ejemplo 35 en otra cepa de fondo. Sin embargo, en este experimento los autores de la presente invención también demostraron que la producción de resveratrol es más estable y se mantiene a altos niveles en transferencias de matraces oscilantes en serie en la cepa FS01529-29-30 en comparación con la cepa FS01529-9-28 donde la producción de resveratrol se reduce después de cada transferencia y casi no se forma resveratrol en el matraz oscilante 3. Es posible, pero no favorable, dividir la ruta del resveratrol en diferentes vectores ya que es muy probable que la distribución del plásmido y el número de copias cambien en toda la población y a lo largo del tiempo en cada matraz oscilante y esto ocasiona una razón desigual entre las enzimas de la ruta del resveratrol que conduce a bajos títulos de resveratrol.

Ejemplo 37. Comparación de los transportadores de resveratrol SNQ2, BcatrB y control en cultivos en pocillos profundos

La cepa 9258-29-30-44-51 que expresa el transportador SNQ2, la cepa 9258-29-30-44-67 que expresa el transportador BcatrB y la cepa de control 9240-29-30-44 se hicieron crecer durante 48 horas en placas de cultivo de pocillos profundos. La cepa de control produjo 48 mg/l de resveratrol a una DO de 5,6 y la cepa que expresaba SNQ2 produjo 61 mg/l de resveratrol a una DO de 5,7. Las cepas que expresaban BcatrB (transportador de resveratrol de *Botrytis cinerea*) produjo 56 mg/l de resveratrol a una DO de 8 después de 48 horas.

ES 2 665 258 T3

Genotipos:

9240 = Matalfa ura3-52 his3 Leu2 pTPI-Acc1, DARo10 9258 = Matalfa ura3-52 his3 Leu2 pTPI-Acc1, DARo10, deltaTRP1

Vectores insertados:

- 5 RHO0029
- RHO0030
- RHO0044
- RHO0051
- RHO0067

10 En la fermentación, las mismas cepas que en el Ejemplo 34 produjeron a las 72 horas:

9240-29-30-44 produjo 437 mg/l de resveratrol.

9258-29-30-44-51 (incluyendo la expresión en exceso de SNQ2) produjo 573 mg/l de resveratrol.

Cepa 9258-29-30-44-67 (incluyendo la expresión en exceso de BcatrB) produjo 951 mg/l de resveratrol.

Las condiciones para la fermentación y el análisis se describen a continuación antes del Ejemplo 41.

15 Conclusión: El efecto de la expresión en exceso de un transportador es muy probablemente más evidente en una fermentación de alimentación por lotes donde la concentración total de resveratrol excede los 200 mg/l, mientras que en los cultivos en matraz oscilante o en pocillos profundos los niveles de resveratrol alcanzados son menores, lo que puede no ser inhibitorio y, por lo tanto, el efecto del transportador de resveratrol queda oscurecido por este hecho.

20 Ejemplo 38. Desarrollo de un sistema vector de expresión de elevado número de copias estable utilizando una etiqueta de ubiquitinación

Se construyeron dos cepas, una que contenía un plásmido p4-ura (Ejemplo 15) y la otra que contenía un plásmido p4-ura-tag2 (Ejemplo 19) (Tabla 5).

Tabla 5

Nombre de la cepa	Cepa parental	Sistema de expresión insertado	Genes en el sistema de expresión	Etiqueta
FS01202-29	FS01202	Rho0029	pTDH3-PAL2, pTEF1-C4H::CYB4::ATR2, pTDH3-4CL2, pTEF1-VST1	Ninguna
FS01202-53	FS01202	Rho0053	pTDH3-PAL2, pTEF1-C4H::CYB4::ATR2, pTDH3-4CL2, pTEF1-VST1	Etiqueta de ubiquitinación

25 Las cepas se hicieron crecer en medio de Delft con glucosa al 2%. Las cepas se cultivaron durante 72 horas alcanzando la fase estacionaria y se tomaron muestras para su extracción y posterior análisis mediante HPLC (Tabla 6).

Tabla 6

Cepa	mg/l de resveratrol	DO ₆₀₀	Rendimiento de biomasa	Rendimiento de glucosa
FS01227-29	28,0	9,8	2,9	0,70
FS01227-53	54,8	8,3	6,6	1,37

30 De los resultados presentes en la Tabla 6, el rendimiento de biomasa aumentó en 127%, el rendimiento de glucosa en 95% y el título en 96%.

Ejemplo 39. Expresión en exceso de acetil-CoA carboxilasa (ACC1) para aumentar la producción de resveratrol

Los dos precursores de levadura clave para la producción de resveratrol que utilizan la ruta heteróloga del resveratrol que comienza con la fenilalanina amoniaco liasa son fenilalanina y malonil-CoA. Para aumentar la producción de malonil-CoA, la acetil-CoA carboxilasa (ACC1) que convierte la acetil-CoA en malonil-CoA se expresó en exceso, lo que condujo al flujo de acetil-CoA redirigido desde la acumulación de biomasa y la asimilación del ciclo de TCA hacia la producción de malonil-CoA, incrementando de ese modo la disponibilidad de MALonil-CoA para aumentar el título de resveratrol.

Se construyeron dos cepas que contenían plásmidos pESC que contenían la ruta del resveratrol. Además, una de las cepas tenía el promotor ACC1 endógeno intercambiado con el promotor glucolítico triosa fosfato isomerasa (TPI1). (Tabla 7).

Tabla 7

Nombre de la cepa	Cepa parental	Genotipo
FS01529-1-4	FS01529	MATalfa ura3-52 his3 [pESC-ura-pGAL1-C4H:CYB5:AR2-pGAL10-PAL2], [pESC-his-GALI-4CL1-pGAL10-VST1]
FS09216-1-4	FS01529	MATalfa ura3-52 his3 pTPI-ACC1 [pESC-ura-pGAL1-C4H:CYB5:AR2-pGAL10-PAL2], [pESC-his-GALI-4CL1-pGAL10-VST1]

Las cepas se hicieron crecer en medio de Delft con glucosa al 0,2% y galactosa al 1,8%. Las cepas se cultivaron durante 72 horas alcanzando la fase estacionaria y se tomaron muestras para su extracción y posterior análisis mediante HPLC (Tabla 8).

Tabla 8.

Cepa	mg/l de resveratrol
FS01529-1-5	119
FS09216-1-5	165

A partir de los resultados presentes en la Tabla 8, la expresión genómica en exceso de acc1 aumentó el título de resveratrol en 39%.

Ejemplo 40. Delección de Aro10 fenilpiruvato descarboxilasa para aumentar la producción de resveratrol con disponibilidad de fenilalanina

Se construyeron dos cepas que contenían p4 que contenía la ruta del resveratrol. Además, una de las cepas tenía ARO10 endógeno eliminado (Tabla 9).

Tabla 9

Nombre de la cepa	Cepa parental	Genotipo
FS09216-29-30	FS09216	MATalfa ura3-52 his3 pTPI-ACC1 [p4-ura-pTDH3-PAL2, pTEF1-C4H::CYB4::ATR2, pTDH3-4CL2, pTEF1-VST1], [p4-his- pTDH3-PAL2, pTEF1-C4H::CYB4::ATR2, pTDH3-4CL2, pTEF1-VST1]
FS09235-29-30	FS09216	MATalfa ura3-52 his3 pTPI-ACC1 ΔARO10 [p4-ura-pTDH3-PAL2, pTEF1-C4H::CYB4::ATR2, pTDH3-4CL2, pTEF1-VST1], [p4-his-pTDH3-PAL2, pTEF1-C4H::CYB4::ATR2, pTDH3-4CL2, pTEF1-VST1]

25

Las cepas se cultivaron en medio de Delft con glucosa al 2%. Las cepas se cultivaron durante 72 horas alcanzando la fase estacionaria y se tomaron muestras para la extracción y el posterior análisis mediante HPLC (Tabla 10).

Tabla 10

Cepa	mg/l de ácido cumárico	mg/l de resveratrol	mg/DO600 de ácido cumárico	mg/DO600 de resveratrol
FS09216-29-30	14	109	1,0	7,9
FS09235-29-30	43	113	3,2	8,5

- 5 A partir de los resultados presentados en la Tabla 10, la delección de *ARO10* conduce a un aumento en el rendimiento de biomasa de aproximadamente 10% y 220% para resveratrol y ácido cumárico, respectivamente.

Medios y condiciones de fermentación

El siguiente grupo de ejemplos describe las fermentaciones realizadas de la siguiente manera general.

Medio de crecimiento para la fermentación de alimentación por lotes

- 10 La composición del medio utilizado en la fase de lote inicial de los cultivos de alimentación por lotes se muestra en la Tabla 11. La composición del medio de alimentación se presenta en la Tabla 12, 13, 14. La fuente de nitrógeno utilizada en la fase de lote inicial del cultivo de alimentación por lotes fue la urea, mientras que, en la fase de alimentación, se utilizó hidróxido de amonio (NH_4OH , 25%) como la fuente de nitrógeno y como álcali. En la mayor parte de los cultivos, se utilizó NH_4OH (25%) como álcali en las fases tanto de lote como de alimentación. En algunos de los cultivos, el álcali utilizado en la fase del lote inicial fue KOH (2 N). Tanto para la fase de lote inicial como para la fase de alimentación, se utilizó HCl (2 N) como ácido.

Tabla 11 Composición del medio mínimo utilizado en el lote inicial de la fermentaciones de alimentación por lotes

	Concentración
Glucosa·H₂O [g/l]	110
Urea [g/l]	11,36
KH_2PO_4 [g/l]	15,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [g/l]	2,5
Solución de vitaminas [ml/l] Tabla 13	5,00
Solución de oligoelementos [ml/l] Tabla 14	5,00
Antiespumante 204 (Sigma A-8311) [μ l]	50,00

Tabla 12 Composición del medio mínimo utilizado en la alimentación de los cultivos de alimentación por lotes

	Concentración
Glucosa·H ₂ O [g/l]	550
KH_2PO_4 [g/l]	9,00

ES 2 665 258 T3

	Concentración
MgSO ₄ ·7H ₂ O [g/l]	5,10
K ₂ SO ₄ [g/l]	3,5
Na ₂ SO ₄ [g/l]	0,28
Solución de vitaminas [ml/l] Tabla 13	12,00
Solución de oligoelementos [ml/l] Tabla 14	10,00
Antiespumante 204 (Sigma A-8311) [μ/l]	50,00*
*Durante la fermentación se tuvo que añadir Antiespumante adicional a demanda cuando se producía espuma	

Tabla 13 Composición de la solución de vitaminas utilizada en la fermentaciones de alimentación por lotes

	Concentración [g/L]
Biotina	0,05
Pantotenato de calcio	1,0
Ácido nicotínico	1,0
Mioinositol	25,0
Tiamina HCL	1,0
Piridoxal HCL	0,2
Ácido para-aminobenzoico	0,2

Tabla 14 Composición de la solución de oligoelementos utilizada en la fermentación de alimentación por lotes

	Concentración [g/L]
EDTA (disódico)	15
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,5
MnCl ₂ ·2H ₂ O	1,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,3
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,5

	Concentración [g/L]
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3,0
H ₃ BO ₃	1,0
KI	0,1

Condiciones de funcionamiento de la fermentación de alimentación por lotes

Las condiciones de funcionamiento utilizadas en la fase de lote inicial y la fase de alimentación de las fermentaciones de alimentación por lotes se muestran en la Tabla 15.

5 Tabla 15 Condiciones de funcionamiento para la fase inicial del lote en las fermentaciones de alimentación por lotes

Parámetro	Punto de ajuste
Volumen de líquido (l)	0,5
Temperatura (°C)	30,0
pH	5,5
Velocidad de agitación (rpm) ¹	1200-1800
Velocidad de flujo de gas (vvm) ^{2, 3}	1,5
Velocidad de flujo de gas (l/min)	0,75
¹ ajustado automáticamente de manera que el oxígeno disuelto está por encima de 60% (ajuste 100 % para 0,75 l/min y 1200 rpm, sin células) ² vvm = l de gas/(l de líquido x min) ³ 1 vvm para la fermentación utilizando la cepa FS09263-29-44-51	

Preparación de soluciones de partida de glicerol

10 Las soluciones de partida de glicerol se prepararon utilizando cultivos en matraces oscilantes con pantallas laterales de 250 ml durante una noche (se llevaron a cabo a 30°C y se agitaron a 250 rpm). Tales cultivos se inocularon con un asa llena de células de una placa de agar. Las células se cosecharon durante la fase logarítmica tardía (DO₆₀₀ ~7-9) mientras había glucosa residual. El caldo se transfirió a tubos de centrifuga Falcon estériles de 50 ml y las células se centrifugaron durante 5 min. a aproximadamente 4.000 rpm a 4°C. Las células se volvieron a suspender en ~15 ml de solución de glicerol estéril al 15% (p/v). Se transfirió una alícuota de 1 ml de células suspendidas a crioviales y se almacenaron a -80 °C.

15 Cultivos de siembra e inóculo

20 Los cultivos de siembra se prepararon llevando a cabo cultivos secuenciales de matraces oscilantes, de manera que las células experimentaron un cierto número de generaciones antes de ser inoculadas en el biorreactor. El cultivo del matraz oscilante se llevó a cabo en un matraz oscilante de 500 ml utilizando un volumen de trabajo de 100 ml. El medio utilizado en los cultivos se describe más arriba. El matraz oscilante inicial se inoculó con un cultivo de solución de partida de glicerol hasta una DO₆₀₀ final de 0,01 o 0,001. Las células se incubaron a 30°C y 150 rpm y se recogieron cuando la DO₆₀₀ alcanzó aproximadamente 1 (que corresponde a aproximadamente 10 generaciones) y se transfirieron al siguiente matraz oscilante. El procedimiento se repitió, de modo que se llevaron a cabo un total de 4 cultivos en matraz oscilante (o aproximadamente 40 generaciones) antes de la inoculación. El cultivo en el cuarto matraz se utilizó para inocular el reactor. La DO inicial de toda la fermentación fue de aproximadamente 0,001.

25 Cuando se utilizaron las cepas FS09258-53-32B-44-51 o FS09258-29-30-44-67, la DO inicial en la fermentación fue de aproximadamente 0,05

Cultivos de alimentación por lotes en biorreactores

Los cultivos de alimentación por lotes se realizaron en biorreactores Biostat B plus (Sistemas Sartorius BBI), con un volumen de trabajo de 2 l. El volumen inicial de líquido utilizado en todos los cultivos fue de 500 ml. El volumen total de alimentación preparado fue de 1 l, de modo que el volumen de líquido en el recipiente del fermentador no excedió de 1,5 l. El biorreactor estaba equipado con dos turbinas de disco Rushton de cuatro hojas y pantallas. Se utilizó aire para hacer burbujear los biorreactores. Las concentraciones de oxígeno, dióxido de carbono y etanol en los gases de escape fueron controlados por un analizador de gases Innova 1313 con multiplexación. La temperatura, el pH, la agitación y la tasa de aireación se controlaron a lo largo de los cultivos. La temperatura se mantuvo a 30°C. El pH se mantuvo a 5,5 mediante la adición automática de KOH (2N) o NH4OH (25%), en el transcurso del lote inicial, y NH4OH (25%) y HCl (2 N), durante la fase de alimentación. La velocidad del agitador se ajustó inicialmente a 1200 rpm y la tasa de aireación a 1,5 vvm (es decir, 0,75 l/h, para un volumen de líquido de 500 ml). La tasa de aireación se estableció en 2,25 l/h, durante el procedimiento de alimentación. Cuando los niveles de oxígeno disuelto disminuyeron por debajo de 60%, la velocidad del agitador se aumentó automáticamente a valores de hasta 1.800 rpm. La formación de espuma se controló utilizando un sensor de espuma y mediante la adición automática y/o manual de un agente antiespumante (Antiespumante 204) (diluido o puro). Las muestras se retiraron en momentos seleccionados y se analizaron para determinar la masa celular, los metabolitos extracelulares y los estilbenoides.

Después de la inoculación, las fermentaciones de alimentación por lotes pasaron por una fase discontinua que duró hasta que no se midió glucosa residual durante la fermentación. Posteriormente, se utilizó un perfil de alimentación exponencial para asegurar una tasa de crecimiento específica constante reducida.

Perfiles de alimentación

Un perfil de alimentación exponencial conduce a una tasa de crecimiento específica constante y una concentración de sustrato residual (Ecuación 1).

$$F(t) = \frac{Y_{XS}\mu_0}{S_{alimentación} - S_0} X_0 V_0 e^{\mu_0 t} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

donde V_0 [l] indica el volumen de líquido al comienzo del procedimiento de alimentación por lotes; X_0 [g PS/l] y S_0 [g/l], las concentraciones de biomasa y sustrato al inicio del procedimiento de alimentación por lotes, respectivamente; $S_{alimentación}$ [g/l], la concentración de sustrato en la alimentación; Y_{XS} [g/g PS], el inverso del rendimiento de biomasa en el sustrato; y μ_0 [1/h], la tasa de crecimiento específica.

En todos los cultivos, se utilizaron perfiles de alimentación exponencial predefinidos (Tabla 16) después de la fase de lotes, sin ningún tipo de control automático de la velocidad de alimentación. La velocidad de alimentación se ajustó manualmente en el transcurso de los cultivos (a perfiles constantes), para evitar el metabolismo respiro-fermentativo. La fase de alimentación exponencial estuvo seguida de una o dos fases con alimentación reducida y constante. En la Tabla 17, se enumeran los parámetros sobre los que se cambiaron las fermentaciones de la fase de lotes a la alimentación exponencial, a la fase 1 de alimentación constante y a la fase 2 de alimentación constante.

Tabla 16 Parámetros utilizados para el cálculo de perfiles de alimentación exponenciales predefinidos en la fase de alimentación por lotes.

	S_{alimentación} [g/l]	V₀ [l]	X₀ [g PS/l]	Y_{XS} [g/g PS]	μ₀ [1/h]
FS09258-51-53-32B-44	500	0,5	17,7	0,35	0,08
FS09240-29-30-44	500	0,5	16,9	0,35	0,1
FS09258-29-30-44-51	500	0,5	15,5	0,35	0,1
FS09258-29-30-44-67	500	0,5	12,6	0,35	0,1
FS09263-29-44-51	500	0,5	13,4	0,35	0,1
FS09263-29-44-pSF057	500	0,5	15,1	0,35	0,1

Tabla 17 Parámetros aproximados al inicio de la fase de alimentación exponencial, la fase 1 de alimentación constante, la fase 2 de alimentación constante

ES 2 665 258 T3

Cepa	Inicio de	Tiempo (h)	μ (l/h) o velocidad de flujo (ml/h)	DO ₆₀₀	Et (g/L)
FS09258-51-53-32B-44	Fase de alimentación exponencial	25	0,08 l/h	30	40
	Fase 1 de alimentación constante	50	20 ml/h	110	0,15
	Fase 2 de alimentación constante	73	7,7 ml / h	190	0
FS09240-29-30-44	Fase de alimentación exponencial	43	0,1 l/h	15	12
	Fase 1 de alimentación constante	61	18 ml/h	40	0
	Fase 2 de alimentación constante	74	8,8 ml/h	110	0
FS09258-29-30-44-51	Fase de alimentación exponencial	43	0,1 l/h	22	4
	Fase 1 de alimentación constante	63	20 ml/h	186	0
	Fase 2 de alimentación constante	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
FS09263-29-44-51	Fase de alimentación exponencial	42	0,1 l/h	20	20
	Fase 1 de alimentación constante	64	21 ml/h	160	0
	Fase 2 de alimentación constante	73	10,4 ml/h	184	0
FS09263-29-44-67	Fase de alimentación exponencial	24	0,1 l/h	18	22,7
	Fase 1 de alimentación constante	75	20 ml/h	108	0
	Fase 2 de alimentación constante	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
FS09263-29-44-pSF057	Fase de alimentación exponencial	42	0,1 l/h	21.5	18
	Fase 1 de alimentación constante	63	21,3 ml/h	174	0
	Fase 2 de alimentación constante	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno

Análisis de estilbenoides

Para el análisis cuantitativo de ácido cumárico, ácido cinámico, ácido florético, trans-resveratrol, cis-resveratrol, dihidro-resveratrol y pinosilvina, las muestras se someten a separación por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un sistema de HPLC de Dionex, antes de Detección UV con matriz de diodos a $\lambda = 306$ nm. Se utiliza una columna Phenomenex (Torrance, CA, USA) Luna de 2,5 micrómetros C18 (100 X 2,00 mm) a 60°C. El método comprende, como fase móvil, un gradiente en forma de S no lineal de acetonitrilo y agua miliQ (ambos contienen 50 ppm de ácido trifluoroacético), a un flujo de 0,8 ml/min. El perfil de gradiente varía de 10% a 100% de acetonitrilo a lo largo de 5 minutos. El tiempo de elución es de aproximadamente 3,2 min para el ácido cumárico, 4,6 min para el trans-resveratrol, 6,0 min para el ácido cinámico y 7,1 min para la trans-pinosilovina. Se utiliza el siguiente procedimiento de preparación de muestras para el análisis de estilbenoides:

- Adición de etanol (99,9%) a una concentración final de 50% (v/v);
- Agitación vorticial (30 s);
- Centrifugación (5 min, velocidad 13.000);
- Análisis de sobrenadante por HPLC.

Las muestras se diluyen apropiadamente en agua destilada antes del análisis de HPLC, siempre que se requiera, de manera que las concentraciones de estilbenoides caigan dentro de los intervalos lineales definidos por los patrones.

Ejemplo 41. Fermentación de alimentación por lotes de FS09258-51-53-32B-44, FS09258-29-30-44-51, FS09240-29-30-44

El efecto de la expresión en exceso de SNQ2 sobre la producción de resveratrol se investigó en la fermentación de alimentación por lotes controlada. Se utilizó FS09240-29-30-44 como cepa de referencia y se comparó con una cepa que adicionalmente alberga una expresión en exceso de SNQ2, esto es FS09240-29-30-44-51. En un experimento posterior, se sometió a ensayo adicionalmente el efecto de la utilización de una etiqueta de ubiquitinación en uno de los plásmidos (Rho 053) y se comparó FS09258-51-53-32B-44 con FS09240-29-30-44-51. Los resultados de las tres fermentaciones de alimentación por lotes realizadas de las cepas FS09240-29-30-44, FS09258-29-30-51 y FS09258-51-53-32B-44 se pueden ver en la Figura 13.

Se encontró que la expresión en exceso permitía un aumento en los títulos de fermentación finales de aproximadamente 400 mg/L a aproximadamente 1.400 mg/L. El uso de una etiqueta de ubiquitinación en uno de los plásmidos permitía un aumento adicional y títulos más allá de 1.800 mg/L.

Ejemplo 42. Sistema de etiqueta de PUFA ilustrativo

La Delta 12 desaturasa (gen MrD12D) de *Mucor Rouxii* (Passorn *et al.*, sin publicar) (SEQ ID NO: 124), delta 6 desaturasa (gen OtD6D) de *Ostreococcus tauri* (Domergue *et al.*, 2005) (SEQ ID NO: 125), delta 6 elongasa (gen MaD6E) de *Mortiella alpine* (Tavares *et al.*, 2008) (SEQ ID NO: 126), y delta 5 desaturasa (gen PtD5D) de *Paramecium tetraurelia* (Aury *et al.*, 2006) (SEQ ID NO: 127) con codones optimizados para su expresión en *S. cerevisiae* fueron sintetizadas por GenScript Corporation (Piscataway, NJ). Los genes con codones optimizados sintéticos se suministraron insertados en el vector de *E. coli* pUC57. Los genes sintéticos se reamplificaron mediante PCR utilizando los vectores pUC57 como moldes. Después de la digestión con DPN1, los productos de la PCR se purificaron en gel de agarosa utilizando el kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen).

La Delta 12 desaturasa (gen MrD12D) de *Mucor Rouxii* fue reamplificada por PCR a partir del vector de Genscript pUG57-MrD12D utilizando el cebador directo 5-TAG AAC TAA AGG GCG GCC GCA TGG CAA CCA AGA GAA AC-3 (SEC ID NO: 128) y el cebador inverso 5-TTA ATT AAG AGC TCA GAT CTT TAG TTC TTA AAG AAG ACA ACA-3 (SEQ ID NO: 129).

La Delta 6 desaturasa (gen OtD6D) de *Ostreococcus tauri* fue reamplificada por PCR a partir del vector de Genscript pUG57-OtD6D utilizando el cebador directo 5-TAT AGG GCC CGG GCG TCG ACA TGT GTG TTG AAA CAG AAA AT-3 (SEQ ID NO: 130) y el cebador inverso 5-CGG TAC CAA GCT TAC TCG AGT TAT GCT GTT TTA CCA GAA TG-3 (SEQ ID NO: 131).

La Delta 6 elongasa (gen MaD6E) de *Mortiella alpine* fue reamplificada por PCR a partir del vector de Genscript pUG57-MaD6E utilizando el cebador directo 5-TAG AAC TAA AGG GCG GCC GCA TGG AAT CTA TTG CTC AAT TC-3 (SEC ID NO: 132) y el cebador inverso 5-TTA ATT AAG AGC TCA GAT CTT TAT TGT AAC TTT CTA GCC TTT-3 (SEQ ID NO: 133).

La Delta 5 desaturasa (gen PtD5D) de *Paramecium tetraurelia* fue reamplificada por PCR a partir del vector de Genscript pUG57-PtD5D utilizando el cebador directo 5-TAT AGG GCC CGG GCG TCG ACA TGG AAG GTA TCA TCA CTC A-3 (SEQ ID NO: 134) y el cebador inverso 5-CGG TAC CAA GCT TAC TCG AGT TAT TCC ATT TTA GCA AAA CCA-3 (SEQ ID NO: 135).

Construcciones de plásmidos

Ejemplo 43. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva del gen *MrD12D* y *OtD6D*

5 El producto de PCR *MrD12D* amplificado (Ejemplo 42) se ligó en el vector Rho0020 digerido con NotI/BglII (Ejemplo 12) utilizando tecnología InFusion, dando como resultado el vector Rho20-*MrD12D*. El producto de PCR *OtD6D* amplificado (Ejemplo 42) se ligó en un vector Rho20-*MrD12D* digerido con Sall/XhoI utilizando tecnología InFusion, dando como resultado el vector Rho20-*MrD12D-OtD6D*. Se secuenciaron dos clones diferentes de Rho20-*MrD12D-OtD6D* para verificar la secuencia del gen clonado.

Ejemplo 44. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva del gen *MaD6E* y *PtD5D*

10 El producto de PCR *MaD6E* amplificado (Ejemplo 42) se ligó en un vector Rho20 digerido con NotI/BglII (Ejemplo 12) utilizando tecnología InFusion, dando como resultado el vector Rho20-*MaD6E*. El producto de PCR *PtD5D* amplificado (Ejemplo 42) se ligó en un vector Rho20-*MaD6E* digerido con Sall/XhoI utilizando tecnología InFusion, dando como resultado el vector Rho20-*MaD6E-PtD5D*. Se secuenciaron dos clones diferentes de Rho20-*MaD6E-PtD5D* para verificar la secuencia del gen clonado.

15 Ejemplo 45. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva del gen *MrD12D*, *OtD6D*, *MaD6E* y *PtD5D*

El vector Rho20-*MrD12D-OtD6D* (Ejemplo 43) se linealizó mediante amplificación por PCR utilizando el cebador directo 5-CAG AGC AGA TTG TAC TGA GAG TG-3 y el cebador inverso 5-ATG CCG CAT AGT TAA GCC A-3. El fragmento de PCR se cortó con DpnI y se purificó en gel de agarosa utilizando el kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen).

20 El vector Rho20-*MaD6E-PtD5D* (Ejemplo 44) se utilizó como molde para la amplificación por PCR de los casetes de expresión *MaD6E-PtD5D* utilizando el cebador directo 5-TGG CTT AAC TAT GCG GCA TGA GCG ACC TCA TGC TAT ACC T-3 (SEQ ID NO: 68) y el cebador inverso 5-TCT CAG TAC AAT CTG CTC TGC TGT GGA TAA CCG TAT TAC CG-3. El fragmento de PCR amplificado que contenía el casete de expresión *MaD6E-PtD5D* se purificó en gel de agarosa utilizando el kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen).

25 El vector Rho20-*MrD12D-OtD6D* linealizado por PCR y el casete de expresión *MaD6E-PtD5D* se ligaron utilizando la tecnología InFusion, dando como resultado Rho20-*MrD12D-OtD6D-MaD6E-PtD5D* denominado p13. Se secuenciaron dos clones diferentes de p16 para verificar la secuencia del gen clonado.

Ejemplo 46. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva del gen *MrD12D*, *OtD6D*, *MaD6E* y *PtD5D* con el gen marcador *ura3* fusionado a una etiqueta de ubiquitinación

30 Se utilizó Rho20-*MrD12D-OtD6D* (Ejemplo 43) como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) eliminando la secuencia codificante de *ura3* utilizando el cebador directo 5-CTC ATT TTG TTA TTC ATT TGT AAA AAA CTG TATATATAG TAA ATG CAT GT-3 (SEQ ID NO: 76) que contenía la etiqueta de ubiquitinación y el cebador inverso 5-TCC TTA TAT GTA GCT TTC GAC AT-3 (SEQ ID NO: 77).

35 Se utilizó Rho0020 (Ejemplo 12) como molde para la amplificación por PCR de *ura3* utilizando el cebador directo 5-ATG TCG AAA GCT ACA TAT AAG GAA CGT G-3 (SEQ ID NO: 78) y el cebador inverso 5-CAA ATG AAT AAA ATG AGA CAA AGA AGA AAA CCA ATT TTT ACA AGC GT TTG CTG GCC-3 (SEQ ID NO: 79) que contenía la etiqueta de ubiquitinación.

Los dos fragmentos obtenidos por PCR se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion que dio como resultado el plásmido Rho20-*ura3-tag2-MrD12D-OtD6D*.

40 Se linealizó Rho20-*ura3-tag2-MrD12D-OtD6D* mediante amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-CAG AGC AGA TTG TAC TGA GAG TG-3 (SEQ ID NO: 70) y el cebador inverso 5-ATG CCG CAT AGT TAA GCC A-3 (SEQ ID NO: 67). El fragmento de PCR se cortó con DpnI y se purificó en gel de agarosa utilizando el kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen).

45 Se utilizó Rho20-*MaD6E-PtD5D* (Ejemplo 44) como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) de los casetes de expresión que contenían *MaD6E* y *PtD5D* utilizando el cebador directo 5-TGG CTT AAC TAT GCG GCA TGA GCG ACC TCA TGC TAT ACC T-3 (SEQ ID NO: 68) y el cebador inverso 5-TCT CAG TAC AAT CTG CTC TGC TGT GGA TAA CCG TAT TAC CG-3 (SEQ ID NO: 137). Los dos fragmentos obtenidos por PCR se ligaron utilizando la tecnología InFusion que dio como resultado el plásmido Rho20-*ura3-tag2-MrD12D-OtD6D-MaD6E-PtD5D* denominado p16. Se secuenciaron dos clones diferentes de p16 para verificar la secuencia del gen clonado.

50 Resultados

Se utilizó la cepa FS01529 como anfitrión de expresión para el plásmido p13 o p16 (véase la Tabla 18).

Nombre de la cepa	Cepa parental	Sistema de expresión insertado	Genes del sistema de expresión	Etiqueta
FS01529-p13	FS01529	P13	pTDH3-OtD6D, pTEF1-MrD12D, pTDH3-PtD5D, pTEF1-MaD6E	Ninguna
FS01529-p16	FS01529	P16	pTDH3-OtD6D, pTEF1-MrD12D, pTDH3-PtD5D, pTEF1-MaD6E	Etiqueta de ubiquitinación

Las cepas se cultivaron en una placa de 24 pocillos profundos que contenían medio de Delft con glucosa al 2%. Las cepas se cultivaron durante 72 horas alcanzando la fase estacionaria y se tomaron muestras para la extracción de lípidos y el posterior análisis GC-FID (véase la Tabla 19).

5 Tabla 19

Cepa	Ácido araquidónico como % de la composición de ácidos grasos totales
FS01529-p13	0,3
FS01529-p16	1,2

A partir de los resultados presentes en la Tabla 19, el porcentaje de ácidos grasos totales en la célula fue 4 veces mayor utilizando el plásmido con etiqueta (p16) en comparación con un plásmido sin etiqueta (p13).

Ejemplo 47. Aislamiento de los genes diana de modificación metabólica que codifican *Aro4* y *Aro7*

- 10 Se sintetizaron 3-desoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintasa (gen *Aro4*) (Luttik *et al.*, 2008) (SEQ ID NO: 138) y Corismato mutasa (gen *Aro7*) (Luttik *et al.*, 2008) (SEQ ID NO: 139) a partir de *Saccharomyces cerevisiae* con codones optimizados para la expresión en *S. cerevisiae* por GenScript Corporation (Piscataway, NJ). ARO4 cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato, D-eritrosa 4-fosfato y agua en 3-desoxi-D-arabino-hept-2-ulosonato 7-fosfato y fosfato; ARO7 cataliza la conversión de corismato en prefanato. Los genes con codones optimizados sintéticos se
- 15 suministraron insertados en el vector de *E. coli* pUC57. Los genes sintéticos se reamplificaron con PCR utilizando los vectores pUC57 como moldes. Después de la digestión con DPN1, los productos de PCR se purificaron en gel de agarosa utilizando el kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen).

Ejemplo 48. Aislamiento de STS, una resveratrol sintasa procedente de *Vitis pseudoreticulata*.

- 20 Se sintetizó resveratrol sintasa (gen STS) (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABF06883.1) (SEQ ID NO: 140) a partir de *Vitis pseudoreticulata* con codones optimizados para la expresión en *S. cerevisiae* por GenScript Corporation (Piscataway, NJ). Los genes sintéticos con codones optimizados se suministraron insertados en el vector de *E. coli* pUC57. Los genes sintéticos se reamplificaron con PCR utilizando los vectores pUC57 como moldes. Después de la digestión con DPN1, los productos de PCR se purificaron en gel de agarosa utilizando el kit de extracción de gel QiaQuick (Qiagen).

- 25 Ejemplo 49. Construcción del vector de levadura Rho0098 para expresión constitutiva de VST1 y STS que contienen el marcador *His3*.

- Se utilizó pUC57-STS como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-GGC CCG GGC GTC GAC ATG GCT TCT GTT GAA GAA ATT A-3 (SEQ ID NO: 141) y el cebador inverso 5-CCA AGC TTA CTC GAG TCA TTA ATT AGA ATC AGT ACC A-3 (SEQ ID NO: 142). Se utilizó Rho0011 como molde para la
- 30 amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-CTA AAG GGC GGC CGC ATG GCA TCC GTA GAG GAG-3 (SEQ ID NO: 143) y el cebador inverso 5-TCC ATC GAT ACT AGT TCA TTA GTT AGT GAC AGT TG-3 (SEQ ID NO: 144). Rho0022 fue digerido con *speI*, *Sall* y *XhoI*.

- Los tres fragmentos obtenidos por PCR se fusionaron utilizando el sistema de clonación InFusion (Clonotech). El plásmido resultante se cortó con *PvuII* para verificación. El plásmido se utilizó como molde para la amplificación por
- 35 PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-ATG GCA TCC GTA GAG GAG TTC-3 (SEQ ID NO: 44) y el cebador inverso 5-ATG GCT TCT GTT GAA GAA ATT A-3 (SEQ ID NO: 141). Se utilizó Rho0011 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-CTC TAC GGA TGC CAT GAA TTC TCT AGA ATC CGT CGA AAC TAA GTT CTG-3 (SEQ ID NO: 145) y el cebador inverso 5-TTC AAC AGA AGC CAT GGA TCC TCT AGA AAA CTT AGA TTA GAT TGC TAT G-3 (SEQ ID NO: 146). Los dos fragmentos obtenidos por PCR se
- 40 fusionaron utilizando InFusion Cloning System (Clonotech) dando como resultado el plásmido Rho0098 (SEQ ID NO:

178).

Se secuenciaron dos clones diferentes de Rho0098 y se verificó la secuencia del gen clonado.

Ejemplo 50. Construcción del vector de levadura p0161 para la expresión constitutiva de VST1 y STS que contienen el marcador *His3*.

- 5 Se utilizó *Rho0098* como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-GCA ATG GAT CAG TTA CGT TAT ATC TTC GAG CGT CCC AAA A-3 (SEQ ID NO: 147) y el cebador inverso 5-ATA ACG TAA CTG ATC CAT TGC TTC CTC GCT CAC TGA CTC-3 (SEQ ID NO: 148).

10 El fragmento obtenido por PCR se fusionó utilizando InFusion Cloning System (Clonotech) dando como resultado el plásmido p0161 (SEQ ID NO: 180). Se secuenciaron dos clones diferentes de p0161 y se verificó la secuencia del gen clonado.

Ejemplo 51. Construcción de un vector de levadura para la expresión constitutiva de PAL2 y C4H:CYB5:ATR2 que contienen el marcador *Ura3-tag2* p0160

- 15 Se utilizó Rho0058 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-GCA ATG GAT CAG TTA CGT TAT ATC TTC GAG CGT CCC AAA A-3 (SEQ ID NO: 147) y el cebador inverso 5-ATA ACG TAA CTG ATC CAT TGC TTC CTC GCT CAC TGA CTC-3 (SEQ ID NO: 148).

El fragmento obtenido por PCR se fusionó utilizando InFusion Cloning System (Clonotech) dando como resultado el plásmido p0160 (SEQ ID NO: 179). Se secuenciaron dos clones diferentes de p0160 y se verificó la secuencia del gen clonado.

20 Ejemplo 52. Construcción de un vector replicativo de levadura, p0202, que contiene pTEF1-C4H::CYB5::ATR2 y pCUP1-PAL2, URA3-tag2 como marcador selectivo.

- 25 Se utilizó p0160 como molde para una amplificación por PCR utilizando el cebador 5-ACG TAT TCT TTG AAA TGG CG-3 y 5-ATG GAC CAA ATT GAA GCA ATG CTA-3. El promotor del gen *CUP1*, pCUP1, se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae* CEN.PK utilizando cebadores 5-TTT CAA AGA ATA CGT TTA CCG ACA TTT GGG CGC-3 (SEQ ID NO: 149) y 5-TTC AAT TTG GTC CAT ACA GTT TGT TTT TCT TAA TAT C-3 (SEQ ID NO: 150). Los dos fragmentos mencionados anteriormente se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion dando como resultado el plásmido p0202.

Ejemplo 53. Construcción del vector de levadura Rho0021 con casetes de expresión constitutiva y el marcador *Leu2* (SEQ ID NO: 176)

- 30 Se utilizó pESC-leu (Stratagene) como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-CAG AGC AGA TTG TAC TGA GAG TG-3 (SEQ ID NO: 70) y el cebador inverso 5-ATG CCG CAT AGT TAA GCC A-3 (SEQ ID NO: 67). Se utilizó RHO0011 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-TGG CTT AAC TAT GCG GCA TGA GCG ACC TCA TGC TAT ACC T-3 (SEQ ID NO: 68) y el cebador inverso 5-TCT CAG TAC AAT CTGC TCT GCT GTG GAT AAC CGT ATT ACC G-3 (SEQ ID NO: 69).

- 35 Los dos fragmentos obtenidos por PCR se fusionaron utilizando InFusion Cloning System (Clonotech) dando como resultado el plásmido Rho0021 (SEQ ID NO: 176). Se secuenciaron dos clones diferentes de Rho0021 y se verificó la secuencia del gen clonado

Ejemplo 54. Construcción del vector Rho0039 de levadura para la expresión constitutiva de *Aro7* y *Aro4* que contienen el marcador *Leu2*

- 40 Se digirió el vector Rho0021 con la enzima de restricción *NotI* y *BglII*. El gen que codificaba *Aro4* de *S. cerevisiae* fue reamplificado por PCR a partir del vector Genscript pUC-57-Aro4 utilizando el cebador directo 5- ACT AAA GGG CGG CCG ATG TCA GAG TCT CCA ATG T-3 (SEQ ID NO: 151) y el cebador inverso 5-TAA GAG CTC AGA TCT CTA CTT CTT ATT TAC CTC TCT T-3 (SEQ ID NO: 152) con salientes homólogos al vector RHO0021 linealizado.

- 45 Los dos fragmentos se recombinaron utilizando el sistema de clonación Infusion (Clonotech). El vector resultante se denominó Rho0021-Aro4. Se secuenciaron dos clones diferentes de pESC-URA-Pal2 y se verificó la secuencia del gen clonado.

- 50 El vector Rho0021-Aro4 se digirió con la enzima de restricción *Sall* y *XhoI*. El gen que codificaba *Aro7* de *S. cerevisiae* fue reamplificado por PCR a partir del vector Genscript pUC-57-Aro7 utilizando el cebador directo 5-GGC CCG GGC GTC GAC ATG GAT TTT ACA AAG CCA GAA-3 (SEQ ID NO: 153) y el cebador inverso 5-CCA AGC TTA CTC GAG TCA TTC TTC CAA TCT TCT CAA-3 (SEQ ID NO: 154) con salientes homólogos al vector Rho0021-Aro4 linealizado.

Los dos fragmentos se recombinaron utilizando Infusion Cloning System (Clonotech). El vector resultante se

denominó Rho0039 (SEQ ID NO: 177). Se secuenciaron dos clones diferentes de pESC-URA-Pal2 para verificar la secuencia del gen clonado.

Ejemplo 55. Obtención de altos niveles de expresión de genes de interés a través de integraciones múltiples en ADN genómico de *S. cerevisiae* utilizando regiones TY-delta.

5 La obtención de altos rendimientos de producción de un producto de interés a menudo requiere herramientas de la biología molecular para la expresión génica de alto nivel. El uso de vectores replicativos, de múltiples copias y promotores fuertes a menudo se elige para desencadenar la expresión de genes de interés. Desafortunadamente, las cepas construidas sobre estos sistemas de expresión portados en el plásmido son frecuentemente propensas a la inestabilidad a través de reordenamientos del ADN, variaciones en el número de copias del plásmido o incluso pérdida de plásmidos.

10 Con el fin de lograr altos niveles de producción de resveratrol, al tiempo que se proporcionaba una cepa estable, los autores de la presente invención diseñaron un sistema de expresión basado en la integración múltiple de genes de interés en las regiones TY-delta. Las regiones TY-delta son "repeticiones terminales largas" (LTR) que se omiten después de la inserción secuencial y la escisión de un retrotransposón Ty1 o Ty2. Se identificaron un total de 331 inserciones de retrotransposones en el genoma de *S. cerevisiae*, 85% de las cuales corresponden a LTR individuales o a fragmentos de LTR (Kim et al. Transposable Elements and Genome Organization: A Comprehensive Survey of Retrotransposons Revealed by the Complete *Saccharomyces cerevisiae* Genome Sequence (Genome Research, 2009). Los retrotransposones de *S. cerevisiae* se dividen en 5 familias diferentes denominadas Ty1-Ty5 (Kim et al., 2009).

15 Con el fin de integrar específicamente una secuencia de ADN elegida de interés en regiones TY-delta mediante recombinación homóloga, se identificó una secuencia consenso TY-delta alineando numerosas secuencias de ADN TY-delta obtenidas de la Base de Datos del Genoma de *Saccharomyces* (www.yeastgenome.org). Modificando 2 nucleótidos, se añadió un sitio de restricción BglII a la secuencia consenso. La secuencia final se presenta en la Figura 14.

25 Ejemplo 56. Construcción de un vector de levadura p0179 para integración múltiple utilizando una secuencia consenso Ty-delta y el marcador *HIS5* de *Schizosaccharomyces pombe* etiquetado con *tag2*.

30 La secuencia de ADN codificante de *HIS5* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *Schizosaccharomyces pombe* (ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion®, Finnzymes) utilizando el cebador directo 5-CAA GAT AAA CGA AGG CAA AGA TGG GTA GGA GGG CTT TT-3 (SEQ ID NO: 155) y el cebador inverso 5-ATG AGA CAA AGA AGA AAA CCA ATT TTT ACA AGC CAA CAC TCC CTT CGT GCT T-3. Se utilizó pSF127 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-TCT TCT TTG TCT CAT TTT GTT ATT CAT TTG ETIQUETA TGA CAC CGA TTA TTT AAA GCT G-3 (SEQ ID NO: 157) y el cebador inverso 5-CTT TGC CTT CGT TTA TCT TG-3 (SEQ ID NO: 158). Los dos fragmentos obtenidos por PCR se fusionaron utilizando InFusion Cloning System (Clontech) dando como resultado el plásmido p0179. p0179 se verificó por medio de secuenciación.

35 Ejemplo 57. Construcción del vector de levadura p0246 para integración múltiple utilizando una secuencia consenso Ty-delta y el marcador *His3* p0246

40 Se utilizó p0179 como molde en una reacción de PCR utilizando el cebador 5-GCA ATG GCG GCC GCT TAC GTT ATC TTC CTC GCT CAC TGA CT-3 (SEQ ID NO: 159) y 5-ATA ACG TAA GCG GCC GCC ATT GCA TTG GAG ACT TGA CCA AAC CT-3 (SEQ ID NO: 160) eliminando el terminador ADH1. El fragmento obtenido mediante PCR se fusionó a sí mismo utilizando la Tecnología de clonación InFusion que dio como resultado el plásmido p0246 (SEQ ID NO: 181). Se secuenciaron dos clones diferentes de p0246 y se verificó la secuencia del gen clonado.

Ejemplo 58. Construcción del vector de levadura p0249 para integración múltiple utilizando una secuencia consenso Ty-delta y el marcador *KanMX* p0249.

45 Se utilizó p0246 como molde en una reacción de PCR utilizando el cebador 5-CTT TGC CTT CGT TTA TCT TG-3 (SEQ ID NO: 158) y 5-TGA CAC CGA TTA TTT AAA GCT GC-3 (SEQ ID NO: 161) eliminando la totalidad de la secuencia codificante de *His5-tag2*. Se utilizó p0191 como molde en una reacción de PCR utilizando el cebador 5-CAA GAT AAA CGA AGG ATG GGT AAG GAA AAG ACT CAC-3 (SEQ ID NO: 162) y 5-GCA GCT TTA AAT AAT CGG TTA GAA AAA CTC ATC GAG CAT CAA ATG-3 (SEQ ID NO: 163) eliminando toda la secuencia codificante de *His5-tag2* completa. Los dos fragmentos obtenidos por PCR se fusionaron utilizando InFusion Cloning System (Clontech) dando como resultado el plásmido p0249 (SEQ ID NO: 182). Se secuenciaron dos clones diferentes de p0249 y se verificó la secuencia del gen clonado.

Ejemplo 59. Construcción del vector de levadura p0280 para expresión constitutiva e integración de *Aro7* y *Aro4* que contienen el marcador *KanMX*.

55 Se utilizó RHO0039 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando cebador directo 5-AAT TGG AGC TCC ACC GCG GCT TCG AGC GTC CCA AAA CCT TC-3 (SEC ID NO 164) y el cebador inverso 5-GCT TGA TAT CGA ATT CGA GCG ACC TCA TGC TAT ACC TG-3 (SEQ ID NO: 165). p0249 se digirió utilizando las enzimas

de restricción *SacII* y *EcoRI*. Los dos fragmentos obtenidos por PCR y digestión con enzimas de restricción se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion que dio como resultado el plásmido p0245-pTDH3-Aro7-pTEF1-Aro4 (p0280 (SEQ ID NO: 184)). Se secuenciaron dos clones diferentes de p0280 y se verificó la secuencia del gen clonado.

- 5 Ejemplo 60. Construcción del vector de levadura p0262 para expresión constitutiva e integración de *VST1* y *STS* que contienen el marcador *KanMX*.

Se utilizó p0161 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-AAT TGG AGC TCC ACC GCG TCG TCG AGC GTC CCA AAA CCT TC-3 (SEC ID NO 164) y el cebador inverso 5-GCT TGA TAT CGA ATT CGA GCG ACC TCA TGC TAT ACC TG-3 (SEQ ID NO: 165). p0245 se digirió utilizando las enzimas de restricción *SacII* y *EcoRI*. Los dos fragmentos obtenidos por PCR y digestión con enzimas de restricción se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion, dando como resultado el plásmido p0245-pTDH3-Aro7-pTEF1-Aro4 (p0280). Se secuenciaron dos clones diferentes de p0262 (SEQ ID NO: 183) y se verificó la secuencia del gen clonado.

- 15 Ejemplo 61. Construcción de plásmidos integrativos pSF126 y pSF127, para integraciones múltiples en regiones TY-delta.

pSF126 es un vector basado en *URA3*, pSF127 se basa en *HIS3*. Estos dos plásmidos fueron ensamblados sintéticamente por Genscript.

Estos vectores no son replicativos en *S. cerevisiae* y pueden dirigirse específicamente a la inserción en regiones TY-delta por digestión utilizando *BglII* o *XhoI* (ambos sitios de restricción están presentes en la secuencia consenso LTR previamente identificada).

- 20 Ejemplo 62. Construcción del vector de levadura p0140 para integración múltiple utilizando la secuencia consenso Ty-delta, que porta el marcador *HIS3* de *Saccharomyces cerevisiae*, pTDH3-4CL2 y pTEF1-VST1.

Se utilizó Rho0011 (Ejemplo 11) como molde para la amplificación por PCR (ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion®, Finnzymes) utilizando el cebador directo 5-CTA GTG GAT CCC CCG GGT TGG AGC GAC CTC ATG CTA TAC C-3 (SEQ ID NO: 166) y el cebador inverso 5-GAA TTC CTG CAG CCC GGG CGA GCG TCC CAA AAC CTT CTC AAG-3 (SEQ ID NO: 167). pSF127 se linealizó mediante digestión utilizando endonucleasa *SmaI*. Los dos fragmentos obtenidos se fusionaron utilizando el Sistema de Clonación InFusion (Clontech) dando como resultado un vector de levadura adecuado para la integración múltiple en las regiones TY delta (Ejemplo 55), que porta el marcador *HIS3* de *Saccharomyces cerevisiae*, pTDH3-4CL2 y pTEF1-VST1. Con el fin de permitir la linealización del vector por *BglII*, permitiendo de ese modo integraciones múltiples en elementos TY-delta, el plásmido mencionado anteriormente fue, por un lado amplificado mediante PCR (ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion®, Finnzymes) utilizando el cebador directo 5-GGC GAA GAA TTG TTA ATT AAG AGC TCT GAT CTT ATC G-3 (SEQ ID NO: 168) y el cebador inverso 5-GGC GCA GCA AGT CGA CGG CGA G-3 (SEQ ID NO: 169); por otro lado, el mismo plásmido fue digerido con las endonucleasas *PacI* y *Sall*. Los dos fragmentos, después de la purificación en gel de agarosa, se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion que dio como resultado el plásmido p0140. p0140 fue verificado por secuenciación.

- 35 Ejemplo 63. Construcción del vector de levadura p0180 para integración múltiple utilizando la secuencia consenso de Ty-delta, que portaba el marcador *HIS5* de *Schizosaccharomyces pombe* etiquetado con tag2, pTDH3-4CL2 y pTEF1-VST1.

40 Se utilizó p0140 como molde para la amplificación por PCR (Herculasa II) utilizando el cebador directo 5-CTA GTG GAT CCC CCG GGT TGG AGC GAC CTC ATG CTA TAC C-3 (SEQ ID NO: 166) y el cebador inverso 5-GAA TTC CTG CAG CCC GGG CGA GCG TCC CAA AAC CTT CTC AAG-3 (SEQ ID NO: 167). p0179 se linealizó mediante digestión utilizando la endonucleasa *SmaI*. Los dos fragmentos obtenidos se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion que dio como resultado el plásmido p0180. p0180 fue verificado por secuenciación.

- 45 Ejemplo 64. Construcción del vector de levadura, p0204, para integración múltiple utilizando la secuencia consenso de Ty-delta, que porta el marcador auxótrofo *URA3* de *Saccharomyces cerevisiae*, pTEF1-C4H::CYB5::ATR2 y pCUP1-PAL2.

pSF126 fue digerido por las endonucleasas *KpnI* y *SacII*. Se utilizó p0202 como molde para amplificar por PCR (Herculasa II) el casete de expresión pTEF1-C4H::CYB5::ATR2/pCUP1-PAL2 utilizando cebador directo 5-GGG AAC AAA AGC TGG GTA CCC TGT GGA TAA CCG TAT TAC C-3 (SEQ ID NO: 170) y el cebador inverso 5-AAT TGG AGC TCC ACC GCG GGA GCG ACC TCA TGC TAT ACC-3 (SEQ ID NO: 171). Los dos fragmentos, después de la purificación en gel de agarosa, se fusionaron utilizando la Tecnología de clonación InFusion que dio como resultado el plásmido p0204.

- 55 Ejemplo 65. Generación de la cepa FS09308 Matalfa *ura3-52 his3 leu2 pTPI-ACC1, Delta-aro10, Delta-trp1, p0204* (pTEF1-C4H::CYB5::ATR2 y pCUP1-PAL2, elemento consenso TY-delta, *URA3*), p0180 (pTDH3-4CL2 y pTEF1-VST1, elemento consenso TY-delta, *HIS5*-Tag2 de *S. pombe*).

5 Se transformó la cepa FS09258 de *S. cerevisiae* (Ejemplo 30) de forma concomitante, por un lado, con el plásmido p0204 digerido por XhoI y, por otro lado, con el plásmido p0180 digerido con BglII. Los transformantes fueron seleccionados en SC-ura-his. Se inocularon 43 clones en 48 placas de pocillos profundos que contenían medio mínimo de Delft, 20 gL⁻¹ de glucosa, con un suplemento de leucina y triptófano. Adicionalmente, el último medio se complementó con CuSO₄ (0,15 mM) o no. El transformante de mejor rendimiento, denominado "C3" en la Figura 15, se denominó más tarde cepa FS09308 [Matalfa ura3-52 his3 leu2 pTPI-ACC1, Delta-aro10, Delta-trp1, p0204 (pTEF1-C4H::CYB5::ATR2 y pCUP1-PAL2, elemento consenso TY-delta, URA3), p0180 (pTDH3-4CL2 y pTEF1-VST1, elemento consenso TY-delta, HIS5-Tag2 de *S. pombe*)].

10 La producción de biomasa (DO600), ácido cumárico, ácido cinámico, pinosilvina, ácido florético y resveratrol de 7 clones diferentes que surgen de la transformación de *S. cerevisiae* FS09258 con los plásmidos linealizados p0204 y p0180 se presenta en la Figura 15. Se cultivaron los diferentes clones en medio de Delft (Ejemplo 33), 20 gL⁻¹ de glucosa, con un suplemento de leucina (60 mg.L⁻¹), triptófano (20 mg.L⁻¹) y sulfato de cobre (0,15 mM). La muestra fue tomada después de 72 horas de cultivo.

15 Ejemplo 66. Generación de la cepa FS09322 Matalfa ura3-52 his3 leu2, trp1 pTPI-Acc1, ΔaRo10, p204 (pTEF-C4H::CYB5::ATR2 pCUP1-PAL2, elemento TY, URA3), p180 (pTDH3-4CL2 pTEF1-VST1, elemento TY, HIS5-Tag2 de *S. pombe*), Rho51 (TEF1-Snq2, TRP1), p0262 (pTDH3-VST1 pTEF1-STS, elemento TY, LEU2)

20 La cepa de levadura FS09313 [Matalfa ura3-52 his3 leu2 trp1 pTPI-Acc1, ΔaRo10, p204 (pTEF-C4H::CYB5::ATR2 pCUP1-PAL2, elemento TY, URA3), p180 (pTDH3-4CL2 pTEF1-VST1, elemento TY, HIS5-Tag2 de *S. pombe*), Rho51 (TEF1-Snq2, TRP1)] se transformó con los sustratos lineales procedentes de dos reacciones de PCR utilizando p0262 como plantilla y el cebador 5- GAG GAG AAC TTC TAG TAT ATT CTG TAT ACC-3 (SEQ ID NO: 172) y el cebador 5-GAG GAT ATA GGA ATC CAC AAA AGG G-3 (SEQ ID NO: 173) para la primera reacción de PCR y el cebador 5-ATC TAT GAA TAA CAT ATA AAA CGA AAA GAG GAA TAA TC-3 (SEQ ID NO. 174) y el cebador 5-CTT ATT ACA TTA ATC ATC CTT GCA TTT CAG C-3 (SEQ ID NO: 175) para la segunda reacción de PCR. Los transformantes se seleccionaron inoculados en un medio de Delft que contenía 20 g/l de glucosa. Se escrutaron 24 colonias para aumentar la producción de resveratrol y se aisló el productor más alto.

25 La cepa resultante se denominó FS09322 y tenía el genotipo [Matalfa ura3-52 his3 leu2 trp1 pTPI-Acc1, ΔaRo10, p204 (pTEF-C4H::CYB5::ATR2 pCUP1-PAL2, elemento TY, URA3), p180 (pTDH3-4CL2) pTEF1-VST1, elemento TY, HIS5-Tag2 de *S. pombe*), Rho51 (TEF1-Snq2, TRP1), p0262 (pTDH3-VST1 pTEF1-STS, elemento TY, LEU2)]. La integración de VST1 y STS se supervisó mediante PCR y se verificó.

30 A continuación se muestra una comparación entre la cepa FS09332 y la cepa FS09258-53-32-44-51:

FS09258-53-32-44-51 (cepa anterior)	FS09322 (cepa nueva)
Delección de URA3	Delección de URA3
Delección de HIS3	Delección de HIS3
Delección de LEU2	Delección de LEU2
Delección de TRP1	Delección de TRP1
Delección de ARO 10	Delección de ARO 10
Expresión en exceso de ACC1	Expresión en exceso de ACC1
-	
-	
Plásmido pESC-URA3(etiqueta 2)-TDH3-PAL2-TEF1-C4H::CYB5::ATR2-TDH3-4CL2-TEF1-VST1 (Rho53)	Plásmido integrativo p0204 pSF126 (URA3) (pCUP1-PAL2, pTEF1-C4H::CYB5::ATR2, URA3- sin una secuencia etiqueta)
Plásmido pESC-HIS3-TDH3-PAL2-TEF1-C4H::CYB5::ATR2-TDH3-4CL2-TEF1-VST1 (Rho32)	Plásmido integrativo p0180 (pTEF1-VST, pTDH3-4CL2; Marcador: HIS5 de <i>S. pombe</i> anclado a Tag 2 de degradación de ubiquitina)

FS09258-53-32-44-51 (cepa anterior)	FS09322 (cepa nueva)
Plásmido pESC-LEU2-TDH3-PAL2-TEF1-C4H::CYB5::AR2-TDH3-4CL2-TEF1-VST1 (Rho44)	Plásmido integrativo p0262 (pTEF1-STS, pTDH3-VST1)
Transportador Plásmido Sng2	Transportador Sng2 Plásmido rho0051
Marcador Antibiótico (Ampicilina)	Marcador Antibiótico (Ampicilina)

FS09322 contiene cuatro plásmidos integrativos que contienen los genes de la ruta del resveratrol heterólogo de la planta y los genes del transportador de resveratrol y porta una delección en los genes Aro10, Ura3, His3, Leu2, Trp1 y una expresión en exceso de los genes ACC1 y SNQ2.

5 Ejemplo 67. Generación de la cepa FS09324 Matalfa ura3-52 his3 leu2 trp1 pTPI-Acc1, ΔARo10, p204 (pTEF-C4H::CYB5::ATR2 pCUP1-PAL2, elemento TY, URA3), p180 (pTDH3-4CL2 pTEF1-VST1, elemento TY, HIS5-Tag2 de *S. pombe*), Rho51 (TEF1-Sng2, TRP1), p0262 (pTDH3-VST1 pTEF1-STS, elemento TY, Leu2), p0280 (pTDH3-Aro7, pTEF1-Aro4, elemento TY, KanMX)

10 La cepa de levadura FS09322 se transformó con los sustratos lineales procedentes de dos reacciones de PCR utilizando p0280 como molde y el cebador 5-GAG GAG AAC TTC TAG TAT ATT CTG TAT ACC-3 (SEQ ID NO: 172) y el cebador 5-GAG GAT ATA GGA ATC CAC AAA AGG G-3 (SEQ ID NO: 173) para la primera reacción de PCR y el cebador 5-ATC TAT GAA TAA CAT ATA AAA CGA AAA GAG GAA TAA TC-3 (SEQ ID NO: 174) y el cebador 5-CTT ATT ACTA TTA TCA ATC CTT GCA TTT CAG C-3 (SEQ ID NO: 175) para la segunda reacción de PCR. Los transformantes se seleccionaron inoculados en un medio de Delft que contenía 20 g/l de glucosa. Se
15 escrutaron 24 colonias para aumentar la producción de resveratrol y se aisló el productor más alto.

La cepa resultante se denominó FS09324 y tenía el genotipo [Matalfa ura3-52 his3 Leu2 pTPI-Acc1, ΔARo10, deltaTRP1, p204 (pTEF-C4H: CYB5::ATR2 pCUP1-PAL2, elemento TY, URA3), p180 (pTDH3- 4CL2 pTEF1-VST1, elemento TY, HIS5-Tag2 de *S. pombe*), Rho51 (TEF1-Sng2, TRP1), p0262 (pTDH3-VST1 pTEF1-STS, elemento TY, Leu2), p0280 (pTDH3-Aro7, pTEF1-Aro4, elemento TY, KanMX)]. La integración de Aro7 y pTEF1-Aro4 se
20 supervisó mediante PCR y se verificó.

Ejemplo 68. Generación de la cepa FS09313 Matalfa ura3-52 his3 leu2 pTPI-ACC1, Delta-aro10, Delta-trp1, p0204 (pTEF1-C4H::CYB5::ATR2 y pCUP1-PAL2, elemento consenso TY-delta, URA3), p0180 (pTDH3-4CL2 y pTEF1-VST1, elemento consenso TY-delta, HIS5-Tag2 de *S. pombe*), Rho0051 (pTEF1-SNQ2, TRP1)

25 Se transformó la cepa FS09308 de *S. cerevisiae* con el plásmido Rho0051 digerido por HindIII para la integración mediante cruce simple en la secuencia de ADN codificante de trp1. La cepa resultante se denominó FS09313 [Matalfa ura3-52 his3 leu2 pTPI-ACC1, Delta-aro10, Delta-trp1, p0204 (pTEF1-C4H::CYB5::ATR2 y pCUP1-PAL2, elemento consenso TY-delta, URA3), p0180 (pTDH3-4CL2 y pTEF1-VST1, elemento consenso TY-delta, HIS5-Tag2 de *S. pombe*), Rho0051 (pTEF1-SNQ2, TRP1)].

30 Ejemplo 69. Generación de la cepa FS09326 Matalfa ura3-52 his3 leu2 pTPI-ACC1, Delta-aro10, Delta-trp1, p0204 (pTEF1-C4H::CYB5::ATR2 y pCUP1-PAL2, elemento consenso TY-delta, URA3), p0180 (pTDH3-4CL2 y pTEF1-VST1, elemento consenso TY-delta, HIS5-Tag2 de *S. pombe*), Rho0051 (pTEF1-SNQ2, TRP1), Rho0039 (pTDH3-ARO7, pTEF1-ARO4, LEU2)

35 Se transformó la cepa FS09313 de *S. cerevisiae* con el plásmido Rho0039 (pTDH3-ARO7, pTEF1-ARO4, LEU2). La cepa resultante se denominó FS09326 [Matalfa ura3-52 his3 leu2 pTPI-ACC1, Delta-aro10, Delta-trp1, p0204 (pTEF1-C4H::CYB5::ATR2 y pCUP1-PAL2, elemento consenso TY-delta, URA3), p0180 (pTDH3-4CL2 y pTEF1-VST1, elemento consenso TY-delta, HIS5-Tag2 de *S. pombe*), Rho0051 (pTEF1-SNQ2, TRP1), Rho0039 (pTDH3-ARO7, pTEF1-ARO4, LEU2)].

Ejemplo 70. Producción de resveratrol con la cepa FS09324 en comparación con FS09322 en el cultivo en placas de pocillos profundos

40 Se construyeron las dos cepas FS09322 y FS09324 (Ejemplo 66 y 67) donde FS09324 en comparación con FS09322 tenía también Aro7 y Aro4 expresados en exceso. Las cepas se cultivaron en una placa de 24 pocillos profundos con medio de Delft que contenía glucosa al 2% y CuSO₄* H₂O 0,15 mM. Las cepas se cultivaron durante 72 horas alcanzando la fase estacionaria y se tomaron muestras para su extracción y posterior análisis de HPLC (Tabla 20).

45 Tabla 20

ES 2 665 258 T3

Cepa	mg/l de resveratrol	DO ₆₀₀	Rendimiento de biomasa	Rendimiento de glucosa
FS09322	182	10,0	18,2	9,1
FS09324	291	9,0	32,2	14,6

De los resultados presentados en la Tabla 20, el rendimiento de resveratrol sobre la biomasa se incrementó en 77%, el rendimiento de resveratrol sobre glucosa en 60% y el título de resveratrol en 60%.

5 Ejemplo 71. Medios y condiciones de fermentación para la caracterización de la cepa FS09322 y FS09326 en las fermentaciones de alimentación por lotes

La fermentación por lotes de FS09322 y FS09326 se ha llevado a cabo como se describe en "*Medios y condiciones de fermentación*" más arriba con los cambios que se describen a continuación.

10 En el cultivo de FS09322 y FS09326, se utilizaron perfiles de alimentación exponencial predefinidos (Tabla 21) después de la fase de lotes, se ajustó la velocidad de alimentación en el transcurso de los cultivos para evitar el metabolismo respiro-fermentativo. En el caso de la producción de etanol, las fases de alimentación exponencial pueden estar seguidas por fases con alimentación reducida y constante. En la Tabla 22, se enumeran los parámetros sobre los que se cambiaron las fermentaciones de la fase por lotes a la alimentación exponencial, utilizando diversos medios de alimentación como se describe en la Tabla 22.

15 Durante el curso de la fermentación de FS09322, se añadieron 0,9 ml de CuSO₄ 150 mM después de 8 h, 37 h y 48,5 h, respectivamente. Durante el curso de la fermentación de FS09326 se añadieron a la fermentación 1,67 CuSO₄ 150 mM después de 43,25 h.

La fermentación utilizando la cepa FS09326 se llevó a cabo utilizando un recipiente de 5 litros con 1 L de volumen de trabajo inicial.

20 Tabla 21 Parámetros utilizados para el cálculo de perfiles de alimentación exponenciales predefinidos en la fase de alimentación por lotes utilizando FS09322 y FS09326. Se utilizaron tres medios de alimentación diferentes.

FS09322	F40	F160	F620
Sf (g/L)	41,15	172,22	594,17
V0 (L)	0,30	0,57	0,71
Vmax (L)	5,00	5,00	5,00
X0 (g PS/L)	1,50	7,67	17,88
S0 (g/L)	0,00	0,00	0,00
Ysx (g PS/g)	0,35	0,35	0,35
Yxs (g/g PS)	2,86	2,86	2,86
μ0 (1/h)	0,10	0,10	0,10
FS09326	F40	F160	F620
Sf (g/L)	40,00	153,91	620,00
V0 (L)	1,00	1,00	1,16
Vmax (L)	5,00	5,00	5,00

ES 2 665 258 T3

FS09322	F40	F160	F620
X0 (g PS/L)	2,00	1,50	9,30
S0 (g/L)	0,00	0,00	0,00
Y _{sx} (g PS/g)	0,35	0,35	0,35
Y _{xs} (g/g PS)	2,86	2,86	2,86
μ ₀ (1/h)	0,10	0,10	0,10

Tabla 22 Parámetros aproximados al inicio de la fase de alimentación exponencial, fase 1 de alimentación constante, fase 2 de alimentación constante

Cepa	Inicio de	Tiempo (h)
FS09322	Exponencial	8
	Fase de alimentación utilizando F40	
	Fase de alimentación exponencial utilizando F160	29,5
	Fase de alimentación exponencial utilizando F620, μ = 0,095 1/h	42,5
	Fase de alimentación exponencial utilizando F620, μ = 0,025 1/h	55
FS09326	Fase de alimentación exponencial utilizando F40	No utilizado
	Fase de alimentación exponencial utilizando F160	9,5
	Fase de alimentación exponencial utilizando F620, μ = 0,095 1/h	27
	Fase de alimentación exponencial utilizando F620, μ = 0,025 1/h	49

5 Ejemplo 72. Fermentación de alimentación por lotes de FS09258-51-53-32B-44, FS09326 y FS09322

Se investigó el efecto de la integración de la ruta del resveratrol y los genes de transportadores en la fermentación de alimentación por lotes controlada. Se utilizó FS09258-51-53-32B-44 como cepa de referencia y se comparó con FS09326 que tiene parte de la ruta del resveratrol integrada en el genoma, y con FS09322 que tiene todos los genes y transportadores de la ruta del resveratrol integrados en la ruta. Los resultados de las fermentaciones de alimentación por lotes de FS09258-51-53-32B-44, FS09326 y FS09322 llevadas a cabo se pueden ver en la Figura 16.

Los mapas de plásmidos para los plásmidos mencionados anteriormente son los siguientes:

Plásmido Rho0021.

Características Rho0021

Nombre	Tipo	Región
ADH1	Terminador	Complemento (2999..3163)

ES 2 665 258 T3

Nombre	Tipo	Región
CYC1	Terminador	4809..4998
pUC	Origen de replicación	5185..5852
2 mu	Origen de replicación	6994..8149
TEF1	Promotor	Complemento (3371..3771)
TDH3	Promotor	4061..4715
LEU2	ORF	Complemento (663..1757)
Origen F1	ORF	Complemento (2597..2903)
bla	ORF	Complemento (6003..6860)
Etiqueta Flag	ORF	Complemento (3315..3338)
Etiqueta c-myc	ORF	4747..4782

Plásmido Rho0039.

Características Rho0039

Nombre	Tipo	Región
CYC1	Terminador	6853..6973
ADH1	Terminador	Complemento (2999..3163)
2 um	Origen de replicación	8812..9967
pUC	Origen de replicación	7003..7670
F1	Origen de replicación	Complemento (2597..2903)
TDH3	Promotor	5138..5792
TEF	Promotor	Complemento (4448..4848)
ARO7	ORF	5824..6594
ARO4	ORF	Complemento (3314..4426)
Leu2	ORF	Complemento (668..1757)
Bla	ORF	Complemento (7818..8678)

5 Plásmido Rho0098.

Características Rho0098

ES 2 665 258 T3

Nombre	Tipo	Región
CYC1	Terminador	6076..6265
ADH1	Terminador	Complemento (1961..2125)
pUC	Origen de replicación	6452..7119
2 mu	Origen de replicación	8261..9416
STS	Origen de replicación	4862..6040
Origen F1	Origen de replicación	1555..1861
TEF1	Promotor	4449..4849
TDH3	Promotor	Complemento (3505..4159)
HIS3	ORF	504..1163
Bla	ORF	Complemento (7267..8127)
VST1	ORF	Complemento (2311..3492)

Plásmido p0160.

Nombre	Tipo	Región
ADH1	Terminador	Complemento (1933..2097)
CYC1	Terminador	9581..9770
pUCori	Origen de replicación	9913..10580
2 mu	Origen de replicación	11722..12877
TDH3	Promotor	Complemento (4413..5067)
TEF1	Promotor	5357..5758
F1	ORF	Complemento (1531..1837)
URA3-tag2	ORF	417..1268
BLA	ORF	Complemento (10728..11600)
PAL2	ORF	Complemento (2247..4400)
C4H	ORF	5770..7320
ATR2	ORF	7636..9561
CYB5	ORF	7336..7626

Plásmido p0161.

Nombre	Tipo	Región
CYC1	Terminador	5761..5950
ADH1	Terminador	
Complemento (1661..1813)		
pUCori	Origen de replicación	6092..6759
2 mu	Origen de replicación	7901..9056
TEF1	Promotor	4137..4537
TDH3	Promotor	Complemento (3193..3847)
HIS3	ORF	504..1163
Bla	ORF	Complemento (6907..7767)
VST1	ORF	Complemento (1999..3180)
STS	ORF	4550..5725

Plásmido p0246.

5 **Características p0246**

Nombre	Tipo	Región
HIS3	Terminador	19..225
pUC	Origen de replicación	1235..1902
f1ori	Origen de replicación	457..763
HIS3	Promotor	unión (3677..>3678,<3679..3993)
bla	Promotor	Complemento (2911..3041)
Tag2	ORF	4645..4677
bla	ORF	Complemento (2050..2910)
HIS5 pombe	ORF	3994..4644
loxP	Estructura misc.	226..274
MCS	Estructura misc.	971..1048

ES 2 665 258 T3

Nombre	Tipo	Región
loxP	Estructura misc.	3628..3676
Ty	Estructura misc.	3295..3627

Plásmido p0249.

Funciones p0249

Nombre	Tipo	Región
HIS3	Terminador	1623..1824
pUCori	Origen de replicación	2834..3501
flori	Origen de replicación	2056..2362
pbla	Promotor	Complemento (4510..4640)
HIS3	Promotor	501..812
bla	ORF	Complemento (3649..4509)
KanMX	ORF	813..1622
loxP	Estructura misc.	1825..1873
MCS	Estructura misc.	2570..2647
loxP	Estructura misc.	452..500
Ty	Estructura misc.	119..451

5 Plásmido p0262.

Nombre	Tipo	Región
CYC1	Terminador	Complemento (3544..3733)
LEU2	Terminador	2309..2784
ADH1	Terminador	7681..7845
f1	Origen de replicación	3016..3322
pUC	Origen de replicación	8056..8723
TEF1	Promotor	Complemento (4957..5357)
TDH3	Promotor	5647..6301
LEU2	Promotor	567..1213

ES 2 665 258 T3

Nombre	Tipo	Región
bla	Promotor	Complemento (9732..9862)
LEU2	ORF	1214..2308
PvVST	ORF	Complemento (3766..4944)
VvVST	ORF	6314..7492
bla	ORF	Complemento (8871..9731)
loxP	Estructura misc.	2785..2833
Ty	Estructura misc.	185..517
loxP	Estructura misc.	518..566

Plásmido p0280.

Características p0280

Nombre	Tipo	Región
HIS3	Terminador	1..202
ADH1	Terminador	4615..4779
CYC1	Terminador	Complemento (962..1151)
Origen f1	Origen de replicación	434..740
pUCori	Origen de replicación	4990..5657
TDH3	Promotor	Complemento (1986..2640)
TEF1	Promotor	2930..3330
bla	Promotor	Complemento (6666..6796)
HIS3	Promotor	7432..7743
Bla	ORF	Complemento (5805..6665)
KanMX	ORF	7744..8553
Aro4	ORF	3352..4464
Aro7	ORF	Complemento (1184..1954)
loxP	Estructura misc.	203..251
MCS	Estructura misc.	948..4803

Nombre	Tipo	Región
loxP	Estructura misc.	7383..7431
Ty	Estructura misc.	7050..7382

Como se observa en la Figura 17, las cepas de *S. cerevisiae* de acuerdo con la invención son capaces de producir por encima de 4.000 mg/l de resveratrol. Se pueden alcanzar niveles de más de 5.000 mg/l.

5 En esta memoria descriptiva, a menos que se indique expresamente lo contrario, la palabra 'o' se utiliza en el sentido de un operador que devuelve un valor verdadero cuando se cumplen una o ambas de las condiciones establecidas, en oposición al operador 'exclusivo o' que requiere que solamente se cumple una de las condiciones. La palabra "que comprende" se utiliza en el sentido de "que incluye" en lugar de significar "que consiste en". Ningún reconocimiento de ningún documento previo publicado en este documento debe considerarse como una admisión o
10 la fecha de este documento.

Referencias

- 5 Aury JM, Jaillon O, Duret L, Noel B, Jubin C, Porcel BM, Ségurens B, Daubin V, Anhouard V, Aiach N, Arnaiz O, Billaut A, Beisson J, Blanc I, Bouhouche K, Camara F, Duhaucourt S, Guigo R, Gogendeau D, Katinka M, Keller AM, Kissmehl R, Klotz C, Koll F, Le Mouél A, Lepère G, Malinsky S, Nowacki M, Nowak JK, Plattner H, Poulain J, Ruiz F, Serrano V, Zagulski M, Dessen P, Bétermier M, Weissenbach J, Scarpelli C, Schächter V, Sperling L, Meyer E, Cohen J, Wincker P. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature*. 9 Nov 2006;444(7116):171-8.
- 10 Andrade AC, Del Sorbo G, Van Nistelrooy JG, Waard MA. The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiology*. 2000;146:1987-97.
- Banerjee D, Lelandais G, Shukla S, Mukhopadhyay G, Jacq C, Devaux F, Prasad R. Responses of pathogenic and nonpathogenic yeast species to steroids reveal the functioning and evolution of multidrug resistance transcriptional networks. *Eukaryot Cell*. 2008;7:68-77.
- 15 Boer VM, de Winde JH, Pronk JT, Piper MD. The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. *J Biol Chem*. 2003;278:3265-74.
- 20 Chloupková M, Pickert A, Lee JY, Souza S, Trinh YT, Connelly SM, Dumont ME, Dean M, Urbatsch IL. Expression of 25 human ABC transporters in the yeast *Pichia pastoris* and characterization of the purified ABCC3 ATPase activity. *Biochemistry*. 2007;46:7992-8003.
- Cochrane FC, Davin LB, Lewis NG. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry*. 2004;65:1557-64.
- 25 Connolly MS, Sakihama Y, Phuntumart V, Jiang Y, Warren F, Mourant L, Morris PF. Heterologous expression of a pleiotropic drug resistance transporter from *Phytophthora sojae* in yeast transporter mutants. *Curr Genet*. 2005;48:356-65.
- Del Sorbo G, Andrade AC, Van Nistelrooy JG, Van Kan JA, Balzi E, De Waard MA. Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. *Mol Gen Genet*. 1997;254:417-26.
- 30 Del Sorbo G, Ruocco M, Schoonbeek HJ, Scala F, Pane C, Vinale F, De Waard MA. Cloning and functional characterization of BcatrA, a gene encoding an ABC transporter of the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycol Res*. 2008;112:737-46.
- Domergue F, Abbadi A, Zähringer U, Moreau H, Heinz E. In vivo characterization of the first acyl-CoA Delta6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*. *Biochem J*. 15 Jul 2005;389(Pt 2):483-90.
- 35 Ehlting J, Büttner D, Wang Q, Douglas CJ, Somssich IE, Kombrink E. Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J*. 1999;19:9-20.
- Erdeniz N, Mortensen UH, Rothstein R. Cloning-Free PCR-Based Allele Replacement Methods. *Genome Res*. 1997 7: 1174-1183
- Etschmann MMw, Bluemke W, Sell D, Schrader J. Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;59:1-8
- 40 Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Véronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre B, Arkin AP, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Güldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kötter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*. 2002;418:387-91.
- 45 Gietz RD, Schiestl RH. Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast*. 1991;7:253-63.
- 50

- Guengerich FP, Gillam EM, Ohmori S, Sandhu P, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M. Expression of human cytochrome P450 enzymes in yeast and bacteria and relevance to studies on catalytic specificity. *Toxicology*. 1993;82:21-37. Revisión.
- 5 Gilon T, Chomsky O, Kulka RG Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae* The EMBO Journal 1998;17:2759-2766
- Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier PH, Stocker RH, et al. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*. 1993;361:153-6.
- Hamberger B, Hahlbrock K. The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:2209-14.
- 10 Johansson B and Hahn-Hägerdal B Overproduction of pentose phosphate pathway enzymes using a new CRE-loxP expression vector for repeated genomic integration in *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast* 2002;19:225-231.
- Jungwirth H, Kuchler K. Yeast ABC transporters-- a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett*. 2006;580:1131-8.
- 15 Kunji ER, Slotboom DJ, Poolman B. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1610:97-108. Revisión.
- Mizutani M, Ohta D, Sato R. Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Arabidopsis* and its expression manner in planta. *Plant Physiol*. 1997;113:755-63.
- Mizutani M, Ohta D. Two isoforms of NADPH:cytochrome P450 reductase in *Arabidopsis thaliana*. Gene structure, heterologous expression in insect cells, and differential regulation. *Plant Physiol*. 1998;116:357-67.
- 20 Moriya H, Shimizu-Yoshida Y, Kitano H. In vivo robustness analysis of cell division cycle genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*. 2006 Jul;2(7):e111. Epub 5 Jun 2006. Erratum in: *PLoS Genet*. Dic 2006;2(12):e218.
- Muhitch MJ, McCormick SP, Alexander NJ, Hohn TM. Transgenic expression of the TRI101 or PDR5 gene increases resistance of tobacco to the phytotoxic effects of the trichothecene 4,15-diacetoxyscirpenol. *Plant Sci*. 2000;157:201-207.
- 25 Mumberg D, Muller R, Funk M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*. 1995;156:119-22.
- Nimii M et al, Functional analysis of fungal drug efflux transporters by heterologous expression in *S. cerevisiae* *Jpn. J Infect Disease* 2005;58:1-7
- 30 Pan Z, Agarwal AK, Xu T, Feng Q, Baerson SR, Duke SO, Rimando AM. Identification of molecular pathways affected by pterostilbene, a natural dimethylether analog of resveratrol. *BMC Med Genomics*. 2008;20:1-7.
- Passorn,S., Laoteng, K., Rachadawong,S., Tanticharoen, M. y Cheevadhanarak,S. Heterologous expression of *Mucor rouxii* delta(12)-desaturase gene in *Saccharomyces cerevisiae*; *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 263 (1), 47-51 (1999)
- 35 Rogers B, Decottignies A, Kolaczowski M, Carvajal E, Balzi E, Goffeau A. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2001;3:207-14.
- Schoonbeek H, Del Sorbo G, De Waard MA. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol Plant Microbe Interact*. 2001;14:562-71.
- Mol Gen Genet*. 1993 Jan; 236(2-3):214-8.
- 40 Gene SNQ2 of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases.
- Servos J, Haase E, Brendel M.
- Sikorski RS, Hieter P.
- A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*.
- 45 *Genetics*. 1989;122:19-27.
- Song WY, Sohn EJ, Martinoia E, Lee YJ, Yang YY, Jasinski M, Forestier C, Hwang I, Lee Y. Engineering tolerance

and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nat Biotechnol.* 2003;21:914-9.

Tavares, S. y Gunnarsson, N, GenBank,

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/291481146?report=genbank,

5 Trott A, West JD, Klaić L, Westerheide SD, Silverman RB, Morimoto RI, Morano KA. Activation of heat shock and antioxidant responses by the natural product celastrol: transcriptional signatures of a thiol-targeted molecule. *Mol Biol Cell.* 2008;19:1104-12.

Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast.* 1992;8:501-17.

10 Vuralhan Z, Luttik MAH, Tai SL, Boer VM, Morais MA, Schipper D, Almering MJH, Kötter P, Dickinson JR, Daran J, Pronk JT Physiological Characterization of the ARO10-Dependent, Broad-Substrate-Specificity 2-Oxo Acid Decarboxylase Activity of *Saccharomyces cerevisiae* *Applied and Environmental Microbiology* 2005: 71:3276-3284

Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story *Genome Biology* 2000;1:3003.1-3003.9

Yoon YG, Posfai G, Szybalski W, Kim SC Cre/loxP-mediated in vivo excision of large segments from yeast genome and their amplification based on the 2 mm plasmid-derived system *Gene* 1998;223:67-76

15 Zwiers LH, Stergiopoulos I, Van Nistelrooy JG, De Waard MA. ABC transporters and azole susceptibility in laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrob Agents Chemother.* Dic 2002; 46(12):3900-6.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Fluxome Sciences A/S
 <120> Producción de metabolitos
 <130> P17099WO
- 10 <150> GB1008826.8
 <151> 26-05-2010
 <160> 192
 <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial
- 20 <220>
 <223> Etiqueta de ubiquitinación
- <400> 1
 Ala Cys Lys Asn Trp Phe Ser Ser Leu Ser His Phe Val Ile His Leu
 25 1 5 10 15
- <210> 2
 <211> 35
 <212> PRT
 30 <213> artificial
- <220>
 <223> Etiqueta de ubiquitinación
- 35 <400> 2
 Ser Leu Ile Ser Leu Pro Leu Pro Thr Arg Val Lys Phe Ser Ser Leu
 1 5 10 15
- Leu Leu Ile Arg Ile Met Lys Ile Ile Thr Met Thr Phe Pro Lys Lys
 20 25 30
- Leu Arg Ser
 35
- <210> 3
 <211> 16
 40 <212> PRT
 <213> artificial
- <220>
 <223> Etiqueta de ubiquitinación
- 45 <400> 3
 Phe Tyr Tyr Pro Ile Trp Phe Ala Arg Val Leu Leu Val His Tyr Gln
 1 5 10 15
- <210> 4
 50 <211> 46
 <212> PRT
 <213> artificial
- <220>
 55 <223> Etiqueta de ubiquitinación

ES 2 665 258 T3

<400> 4
 Ser Asn Pro Phe Ser Ser Leu Phe Gly Ala Ser Leu Leu Ile Asp Ser
 1 5 10 15

Val Ser Leu Lys Ser Asn Trp Asp Thr Ser Ser Ser Ser Cys Leu Ile
 20 25 30

Ser Phe Phe Ser Ser Val Met Phe Ser Ser Thr Thr Arg Ser
 35 40 45

5 <210> 5
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Etiqueta de ubiquitinación

<400> 5
 Cys Arg Gln Arg Phe Ser Cys His Leu Thr Ala Ser Tyr Pro Gln Ser
 1 5 10 15

Thr Val Thr Pro Phe Leu Ala Phe Leu Arg Arg Asp Phe Phe Phe Leu
 20 25 30

Arg His Asn Ser Ser Ala Asp
 35

15 <210> 6
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Etiqueta de ubiquitinación

<400> 6
 Gly Ala Pro His Val Val Leu Phe Asp Phe Glu Leu Arg Ile Thr Asn
 1 5 10 15

Pro Leu Ser His Ile Gln Ser Val Ser Leu Gln Ile Thr Leu Ile Phe
 20 25 30

25 Cys Ser Leu Pro Ser Leu Ile Leu Ser Lys Phe Leu Gln Val
 35 40 45

<210> 7
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Etiqueta de ubiquitinación

35 <400> 7

ES 2 665 258 T3

Asn Thr Pro Leu Phe Ser Lys Ser Phe Ser Thr Thr Cys Gly Val Ala
 1 5 10 15

Lys Lys Thr Leu Leu Leu Ala Gln Ile Ser Ser Leu Phe Phe Leu Leu
 20 25 30

Leu Ser Ser Asn Ile Ala Val
 35

5 <210> 8
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Etiqueta de ubiquitinación

<400> 8
 Pro Thr Val Lys Asn Ser Pro Lys Ile Phe Cys Leu Ser Ser Ser Pro
 1 5 10 15

Tyr Leu Ala Phe Asn Leu Glu Tyr Leu Ser Leu Arg Ile Phe Ser Thr
 20 25 30

Leu Ser Lys Cys Ser Asn Thr Leu Leu Thr Ser Leu Ser
 35 40 45

15 <210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Etiqueta de ubiquitinación

<400> 9
 Ser Asn Gln Leu Lys Arg Leu Trp Leu Trp Leu Leu Glu Val Arg Ser
 1 5 10 15

Phe Asp Arg Thr Leu Arg Arg Pro Trp Ile His Leu Pro Ser
 20 25 30

25 <210> 10
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Etiqueta de ubiquitinación

<400> 10

ES 2 665 258 T3

atggaccaa ttgaagcaat gctatgCGGT ggtggtgaaa agaccaaggt ggccgtaacg 60
 acaaaaaactc ttgcagatcc tttgaattgg ggtctggcag ctgaccagat gaaaggtagc 120
 catctggatg aagttaagaa gatggttgag gaatacagaa gaccagtcgt aatcttaggc 180
 ggcgagacat tgacgatagg acaggtagct gctatttcga cggttggcgg ttcagtgaag 240
 gtagaacttg cagaaacaag tagagccgga gtaaggtct catcagattg ggtcatggaa 300
 agtatgaaca agggcacaga ttcctatggc gttaccacag gctttggtgc tacctctcat 360
 agaagaacta aaaatggcac tgctttgcaa acagaactga tcagattcct taacgccggt 420
 attttcggta atacaaagga aacttgccat acattacccc aatcggcaac aagagctgct 480
 atgcttgta gggtaaacac tttggtgcaa ggttactctg gaataaggtt tgaaattctt 540
 gaggccatca ctctactatt gaaccacaac atttctcctt cgttgccctt aagaggaaca 600
 ataactgcca gcggtgattt ggttcccctt tcatatatcg caggcttatt aacgggaaga 660
 cctaattcaa aggccactgg tccagacgga gaatccttaa ccgctaagga agcatttgag 720
 aaagctggta tttcaactgg tttctttgat ttgcaacca aggaaggttt agccctggtg 780
 aatggcaccg ctgtcggcag cggtatggca tccatggtgt tgtttgaagc taacgtacaa 840
 gcagttttgg ccgaagtttt gtccgcaatt tttgccgaag tcatgagtgg aaaacctgag 900
 tttactgac cttgaccca caggttaaaa catcaccag gacaaattga agcagcagct 960
 atcatggagc acattttgga cggctctagc tacatgaagt tagcccagaa ggttcatgaa 1020
 atggaccctt tgcaaaaacc caaacaagat agatatgctt taaggacatc cccacaatgg 1080
 cttggccctc aaattgaagt aattagacaa gctacaaagt ctatagaaag agagatcaac 1140
 tctgttaacg ataatccact tattgatgtg tcgaggaata aggcaatata tggaggcaat 1200
 ttccagggtg caccatagg agtcagtatg gataatacca ggcttgccat agccgcaatt 1260
 ggcaaatata tgtttgcccc attttctgaa ttggtcaatg acttctacaa taacggtttg 1320
 ccttcgaatc tgaccgcatc ttctaaccct agtcttgatt atggtttcaa aggtgctgag 1380
 atagcaatgg caagctattg ttcagagctg caatatctag ccaaccagt aacctctcat 1440
 gtacaatcag ccgaacaaca caatcaggat gtaattctt tgggcctgat ttcacaaaga 1500
 aaaacaagcg aggcggttga tacccttaaa ttaatgtcca caacattttt agtgggtata 1560
 tgccaggccg tagatttgag acacttgaa gagaatttga gacagacagt gaaaaatacc 1620
 gtatcacagg ttgcaaaaaa ggttctaact acaggtatca atggtgaatt gcacccatca 1680
 agattctgtg aaaaagattt attaaaagtt gtagatagag aacaagtatt tacttacggt 1740
 gacgatccat gtagcgctac ttatccattg atgcagagat tgagacaagt tattgtagat 1800
 cacgctttat ccaatggtga aactgagaaa aatgocggtta cttcaatatt ccaaaagata 1860
 ggtgcctttg aagaagaact gaaggcagtt ttaccaaagg aagtcgaagc tgctagagcc 1920
 gcatacggaa atggtactgc ccctatacca aatagaatca aagagtgtag gtcgtaccct 1980
 ttgtacagat tcgtagaga agagttggga accaaattac taactggtga aaaagtcggt 2040
 agcccagggtg aagaatttga caaggtattc acagctatgt gcgagggaaa gttgatagat 2100
 ccacttatgg attgcttgaa agagtgaat ggtgcaocta ttccaatctg ctaa 2154

<211> 1518
 <212> ADN
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Arabidopsis thaliana con codón optimizado

<400> 15
 atggatttgt tattgctgga aaagtcactt attgctgtat ttgtggcagt tattctagcc 60
 acggttatth cttaaattaag aggtaagaaa ctaaaactac ctctcgtgcc catccccata 120
 ccaatthtttg gtaattgggt gcaagtgggc gatgatttga atcacagaaa tttggtagac 180
 tatgctaaga agttcgggtga ccttttcttg cttagaatgg gtcaaaggaa tttggtagtg 240
 gttagctcac ctgatttgac taaggaggtc ttattaacgc aaggcgttga gtttggtccc 300
 agaactagaa atgtttgtgt tgatattttc actggtaaag gtcaagatat ggtttttaca 360
 gtttacgggtg agcactggag aaaaatgaga agaatcatga ccgtaaccatt ctttactaac 420
 aaggttgttc aacaaaatag agaagggttg gagtttgagg cagcttccgt agtggagac 480
 gtaaagaaaa atccagattc ggccacaaaag ggtatagtac taagaaaaag actacaattg 540
 atgatgtaca acaatatggt cagaattatg tttgacagaa gatttgaaag tgaagatgac 600
 cctttgttcc tgagacttaa ggctttgaat ggtgaaagat cgagattggc tcaaagtthc 660
 gaatataatt acggtgactt tattccaatc ttaagaccat ttttgagagg ctatttgaaa 720
 atttgccaag acgtcaagga taggaggatc gctcttttca agaagtactt tgtggacgag 780
 agaaagcaaa tagcttcttc caagcccaca ggctcgggaag gtttaaaatg tgcaattgat 840
 catatthttag aagctgaaca aaaagggtgaa attaacgaag ataatgtttt gtacattgta 900
 gaaaatatca atgtggctgc aatagaaaca accttatggt caatagaatg gggatttgc 960
 gaattgggtga atcaccaga aatacaatct aaactgagaa acgagctaga taccgtttta 1020
 ggtccagggtg tccaagttac agaacctgat ttgcataagt taccctactt gcaagctgtg 1080
 gttaaagaaa ccttgagatt gagaatggct attcctcttc tagttcctca tatgaaccta 1140
 catgatgcta aactggccgg ttatgatatt ccagcagaaa gtaagatttt agtaaattgca 1200
 tgggtgggttg ccaacaatcc aaacagtttg aaaaagcctg aagaattcag acctgaaaga 1260
 ttcttcgaag aggaatctca tgttgaagcc aacggaaatg acttcagata tgtacctttt 1320
 ggcgttggtca gaagatcgtg tccaggaata atactagcct taccaatatt gggatcaca 1380
 attggtagga tggttcaaaa ttttgagttg ctaccaccac cgggacaatc gaaagtcgat 1440
 acttcagaga aaggaggaca attctcattg catatthttga atcattccat tatagtcattg 1500
 10 aaaccagaa attgttaa 1518

<210> 16
 <211> 2136
 <212> ADN
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Arabidopsis thaliana con codón optimizado

20 <400> 16

ES 2 665 258 T3

atgtccagta gctcttcctc ctcaacctcg atgatcgact taatggctgc tattataaaa 60
 ggagaaccag ttatagttag tgaccctgct aacgcaagcg cttacgaatc cgttgcagcc 120
 gagttgtcaa gtatgcttat agaaaataga cagtttgcta tgattgtaac gaccagcadc 180
 gccgttttaa ttggttgcac cgtgatgttg gtgtggagga ggagcggttc gggcaattca 240
 aagagggttg aacctactaa gccattagtt atcaaaccta gagaagagga aattgacgat 300
 ggaaggaaga aagtcactat attcttcggc acccaaacag gtacagctga aggttttgct 360
 aaggctctag gagaagaagc aaaagctaga tatgaaaaga cgagattcaa aattgtcgat 420
 ctggatgact atgccgccga tgatgacgaa tacgaagaaa aattgaagaa agaagatgtc 480
 gcatttttct tccttgccac ctacggcgac ggtgaaccaa cagataatgc cgcaaggttt 540
 tacaagtggc ttactgaagg taatgacaga ggagaatggc tgaagaattt gaaatatggt 600
 gtgttcggcc ttgtaacag acagtacgag cattttaata aggtcgctaa ggtttagat 660
 gatatacttg ttgaacaagg tgctcaaagg ttagtgcagg tgggcttggg tgacgatgat 720
 caatgtattg aagatgactt tactgcttgg agagaagcct tgtggcctga attagatact 780
 atccttagag aagaaggtga cactgctgtt gctaccccct aactgcagc agtcctagaa 840
 tatagagtct caatccatga ttcagaagac gccaaattca atgatattaa catggccaac 900
 ggtaacggtt acaccgtttt tgacgcacaa catccataca aagctaattg tgctgttaaa 960
 agggaaactc acaccccaga aagtgcagag tcatgtatac atttggaatt tgatctcgct 1020
 ggtagtgggt tgacttacga aacaggtgac catgtcggag tactttgcga taatttgcac 1080
 gaaactgttg atgaagcttt gaggttattg gatatgtcac cagatactta cttctcattg 1140
 catgcagaaa aagaagcgg aactccaata tcaagctcgc ttccccctcc attcctccc 1200
 tgtaacttaa gaacagccct aactagatat gcttgtttac tgtcttctcc aaagaaaagt 1260
 gctttggttg cattggcagc ccacgcctcc gatcctaccg aagctgagag attaaagcat 1320
 ttggcttcac cagccggtaa agatgaatac agtaagtggg tagtggagag ccaaagatcg 1380
 cttttagaag tgatggctga gtttccaagt gctaaacctc ctctgggtgt attttctgct 1440
 ggtgtggccc caagattgca gcctagattt tattccatat cctcatctcc aaaaattgcc 1500
 gaaaccagaa ttcacgtgac atgtgctctg gtctacgaaa agatgccaac aggtaggatt 1560
 cacaaggtg tctgttctac ctggatgaaa aatgctgtac cctatgaaaa atccgaaaat 1620
 tgttctagtg caccaatttt cgtaagacaa tctaatttca agttaccaag cgattctaaa 1680
 gtaccatta ttatgatcgg tccaggtact ggtttggccc cattcagag cttcttgcaa 1740
 gaaagattgg ctttagtgga gagtggagtt gaattgggtc cttcagtttt attctttggt 1800
 tgtagaaca gaagaatgga ctttatctac gaagaagaat tgcagagatt tgttgaaagt 1860
 ggtgcattgg ccgaattgag tgttgcatc agcagggag gtccaaccaa agaatacgtt 1920
 caacacaaga tgatggacaa ggcttctgat atctggaata tgatttccca aggtgcttat 1980
 ttgtatgttt gtggtgacgc taaaggaatg gctagagatg ttcatagatc actgcataca 2040
 atcgcacaa aacaaggtag catggattca acaaaagcag agggctttgt aaagaatctt 2100
 cagacaagcg gtagatatct gagagatgta tggtaa 2136

ES 2 665 258 T3

<210> 17
 <211> 1686
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> *Arapidopsis thaliana* con codón optimizado

<400> 17

```

atggccccc aagaacaggc agttagcaa gtaatggaaa aacagtcaa taataacaat      60
agtgatgtca tattcaggag taagttgcct gatatatata tcccacaacca cttatctttg    120
catgattaca tatttcaaaa tatctctgag ttcgctacaa agccttgcct tatcaatggt    180
ccaactggac atgtctacac ttattcagat gttcatgtaa tatcaagaca aattgcagct    240
aattttcaca agttgggctg gaatcagaac gacgtagtta tgttgctggt acctaactgt    300
ccagagtttg ttctatcatt tcttgagct tccttcaggg gtgcaaccgc cacagcgcga    360
aatccctttt tcacccttgc tgaatatagct aagcaagcta aagctagtaa tacaagttg    420
attattactg aagctaggta tgtggataaa attaagcctt tgcaaaacga tgatggtggt    480
gtgatcgttt gcatagatga caacgagtcg gtaccaattc cagaaggctg tctgagattc    540
actgagttaa ctcaatcgac aaccgaggct agtgaagtca ttgattcagt agaaatttca    600
ccgatgatg tggtagctct tcatactca tcaggtacaa cgggtcttcc taagggtggt    660
atggtgacct ataaaggatt agttacttca gttgctcaac aagtggacgg tgaaaaccca    720
aacttatatt tcaactccga cgacgtaatt ctatgtgtcc ttccaatggt ccacatatac    780
gccttaaatt ctattatggt gtgtggttta agagtaggtg ccgcaatcct tatcatgccc    840
aaatttgaga ttaacctatt actagaattg atacagagat gtaaagttac cgtcgtcctc    900
atggttccac caatagtgtc ggctatcgct aaatcaagtg aaactgaaaa atatgatttg    960
tcatctataa gagtcgttaa gagcggagct gcaccttag gcaaggagct agaggatgct   1020
gtaaagcca agttcccaa tgctaagttg ggtcaaggtt atggcatgac cgaagccgga   1080
ccagttctag caatgtcctt aggtttcgcc aaggaaccct ttccagtaaa aagtggagca   1140
tgtggtacag tagttaggaa cgcagagatg aaaatcgttg atcccgatac tgggtgactca   1200
ctatctagaa atcaaccagg tgaatattgt attaggggac atcaaatcat gaaaggctac   1260
ttaaataatc cagctgctac agccgaaacc attgataaag atggctggtt gcatactggt   1320
gacatagggt tgatagatga tgatgacgaa ttattcattg ttgatagatt gaaggaactt   1380
atcaaatata agggctttca agttgctcca gctgaactag aagcacttct tataggacat   1440
ccagatatta ctgatgtagc tgttggtgct atgaaagaag aagcagctgg tgaggtccca   1500
gtggcttttg tggtgaaatc gaaggactcc gaactgtctg aggatgatgt aaagcaattc   1560
gttagtaaac aagtgtttt ctataaaaga attaataagg ttttcttcac cgaatctatt   1620
cccaaagccc ccagcggcaa gattttaagg aaagacttga gagcaaaact agcaaacggt   1680
ctttaa                                           1686
    
```

10

<210> 18
 <211> 1179
 <212> ADN

15

ES 2 665 258 T3

<213> Vitis vinifera

<400> 18

atggcatccg tagaggagtt cagaaatgca cagagggcaa aagggtccagc aaccatattg	60
gctattggaa cagccacccc tgatcactgt gtttatcaat ctgattacgc tgattactat	120
ttcagagtaa ctaaaagtga acatatgaca gaacttaaga aaaagtttaa tagaatttgt	180
gataaatcta tgataaagaa aagatacata catctaactg aagaaatggt agaggaacat	240
ccaaataatag gtgcataat ggcaccatct ttgaatatta gacaagaaat cataacagcc	300
gaggtaccta gactaggtag agacgcagcc ttgaaagctt taaaggaatg gggacaacca	360
aaatctaaga ttacacattt ggttttctgt acaacttccg gtgtcgaaat gccaggtgct	420
gattataaac tagcaaacct attgggatta gagacctctg ttagaagagt tatgttgtat	480
catcaagggt gttacgccgg aggtacagtg cttagaactg ctaaggattt ggcagaaaat	540
aacgccgggt ctagggtttt agtcgtctgc agtgaatca ctgtcgtaac tttcagaggt	600
ccatcagaag atgctctaga cagtttggtc ggacaagcat tgtttggcga tggatcttcc	660
gccgtaattg taggcagcga tcctgatgtg tccattgaaa gaccactatt tcaattagtt	720
tctgctgctc aaacttttat tccaaattcc gccggtgcca tagcaggaaa cttgagagaa	780
gttggtttga cttttcattt gtggcctaata gtcccaacct taatttcaga aaacatcgaa	840
aatgcttaa ctcaagcctt tgaccattg ggcataagcg actggaactc attgttttgg	900
attgctcatc caggtggtcc agcaatttta gacgcagtgg aggcaaaact aaacttagag	960
aagaaaaagt tggaaagctac aagacacggt ctatcagagt atggcaacat gagctctgcc	1020
tgcgttttat tcattctaga tgagatgagg aagaagtctt taaaggtga aaaagccaca	1080
accggagaag gtttagattg ggggtttcta tttggttctg gtctctggctt aacaattgag	1140
5 acagtgggtg tacactctgt tccaactgtc actaactaa	1179

<210> 19

<211> 1671

<212> ADN

10 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 19

ES 2 665 258 T3

atgacgacac aagatgtgat agtcaatgat cagaatgatc agaaacagtg tagtaatgac 60
gtcattttcc gatcgagatt gcctgatata tacatcccta accacctccc actccacgac 120
tacatcttcg aaaatatctc agagttcggc gctaagccat gcttgatcaa cggteccacc 180
ggcgaagtat acacctacgc cgatgtccac gtaacatctc ggaaactcgc cgccggtctt 240
cataacctcg gcgtgaagca acacgacggt gtaatgatcc tcctcccgaa ctctcctgaa 300
gtagtctca ctttccttgc cgctccttc atcggcgcaa tcaccacctc cgcgaacccg 360
ttcttcactc cggcggagat ttctaacaa gccaaagcct ccgcgggcga actcatcgtc 420
actcaatccc gttacgtcga taaaatcaag aacctccaaa acgacggcgt tttgatcgtc 480
accaccgact ccgacgccat ccccgaaaac tgcctcogtt tctccgagtt aactcagtcc 540
gaagaaccac gagtggactc aataccggag aagatttcgc cagaagacgt cgtggcgctt 600
cctttctcat ccggcacgac gggctctccc aaaggagtga tgctaacaca caaaggtcta 660
gtcacgagcg tggcgcagca agtcgacggc gagaatccga atctttactt caacagagac 720
gacgtgatcc tctgtgtctt gcctatgttc catatatacg ctctcaactc catcatgctc 780
tgtagtctca gagttgggtc cacgatcttg ataatgccta agttcgaaat cactctcttg 840
ttagagcaga tacaagggtg taaagtcaag gtggctatgg tcgtgccacc gatcgtttta 900
gctatcgcga agtcgcccga gacggagaag tatgatctga gctcggttag gatggttaag 960
tctggagcag ctctctcttg taaggagctt gaagatgcta ttagtgctaa gtttcctaac 1020
gccaagcttg gtcagggcta tgggatgaca gaagcaggtc cgggtgctagc aatgctgta 1080
gggtttgcta aagagccggt tccagtgaag tcaggagcat gtggtacggt ggtgaggaac 1140
gcogagatga agataactga tccagacaca ggagattctt tgcttaggaa caaaccggc 1200
gaaatatgca tcogtggcaa ccaaatcatg aaaggctatc tcaatgacc cttggccaac 1260
gcatcgacga tcgataaaga tggttggctt cacactggag acgtcggatt tatcgatgat 1320
gacgacgagc ttttcattgt ggatagattg aaagaactca tcaagtaca aggatttcaa 1380
gtggctccag ctgagctaga gtctctctc ataggtcatc cagaaatcaa tgatgttgc 1440
gtcgtcgcca tgaaggaaga agatgctggt gaggttctctg ttgcgtttgt ggtgagatcg 1500
aaagattcaa atatatccga agatgaaatc aagcaattcg tgtcaaaaca ggttctgttt 1560
tataagagaa tcaacaaagt gttcttact gactctattc ctaaagctcc atcaggaag 1620
atattgagga aggatctaag agcaagacta gcaaatggat taatgaacta g 1671

5 <210> 20
<211> 40
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

10 <400> 20
gcgaattctt atgacgacac aagatgtgat agtcaatgat 40

15 <210> 21
<211> 42
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 21
gactagtat cctagttcat taatcattt gctagtctg ct 42

<210> 22
 <211> 39
 <212> ADN
 5 <213> Arabidopsis thaliana

 <400> 22
 ctactaaag ggcggccgca tggaccaaat tgaagcaat 39

 10 <210> 23
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

 15 <400> 23
 taagagctca gatcttagc agattggaat aggtg 35

 <210> 24
 <211> 35
 20 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

 <400> 24
 25 gaagaagacc tcgagatgga ttgttattg ctgga 35

 <210> 25
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 30
 <400> 25
 agtagatgga gtagatggag tagatggagt agatggacaa ttctgggtt tcatga 56

 <210> 26
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 35
 <400> 26
 40 ccatctactc catctactcc atctactcca tctactagga ggagcggttc gggc 54

 <210> 27
 <211> 37
 <212> ADN
 45 <213> Arabidopsis thaliana

 <400> 27
 gctagccgcg gtaccttacc atacatctct cagatat 37
 50
 <210> 28
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 55
 <400> 28
 gaagaagacc tcgagatgga ttgttattg ctgga 35

 <210> 29
 <211> 37
 60 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

 <400> 29
 65 gctagccgcg gtaccttacc atacatctct cagatat 37

 <210> 30

<211> 39
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

5 <400> 30
 ctactaaag ggcggccgca tggaccaaat tgaagcaat 39

<210> 31
 <211> 35
 10 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 31
 15 taagagctca gatcttagc agattggaat aggtg 35

<210> 32
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

20 <400> 32
 gaagaagacc tcgagatgga tttgtattg ctgga 35

<210> 33
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

25 <400> 33
 30 acctagagca ccaccacaat ttctgggtt catgact 37

<210> 34
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

35 <400> 34
 ggtgctattc tagttggtag gaggagcggc tcgggc 36

<210> 35
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

40 <400> 35
 45 gctagccgcg gtacctacc atacatctct cagatat 37

<210> 36
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

50 <400> 36
 55 ccagctcaat cagttccagc tcttcagtt cctaaagtt acagtacc 49

<210> 37
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

60 <400> 37
 aactagaact gattgagcag ttggtgatgg ttactttgg tttcagagg 50

<210> 38
 <211> 35
 <212> ADN

65

<213> Arabidopsis thaliana
 <400> 38
 5 gaagaagacc tcgagatgga ttgttattg ctgga 35
 <210> 39
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 10 <400> 39
 gctagccgcg gtaccttacc atacatctct cagatat 37
 <210> 40
 15 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Vitis vinifera
 <400> 40
 20 ccgatccat ggcacccgta gaggagtca gaa 33
 <210> 41
 <211> 37
 <212> ADN
 25 <213> Vitis vinifera
 <400> 41
 cgctcgagtc attagttagt gacagttgga acagagt 37
 30 <210> 42
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 35 <400> 42
 ttgaaaattc gaattcatgg ccccccaaga 31
 <210> 43
 <211> 40
 40 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 43
 45 gcgaagaatt gtaattaat taaagaccgt ttgctagttt 40
 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 44
 55 atggcatccg tagaggagt c 21
 <210> 45
 <211> 37
 <212> ADN
 60 <213> Vitis vinifera
 <400> 45
 cgctcgagtc attagttagt gacagttgga acagagt 37
 65 <210> 46
 <211> 41

<212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 <400> 46
 5 gcgagctcag tttatcatta tcaatactcg ccatttcaaa g 41

 <210> 47
 <211> 46
 <212> ADN
 10 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 <400> 47
 cgtctagaat ccgtcgaaac taagtctgg tgtttaaaa ctaaaa 46

 15 <210> 48
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 20 <400> 48
 gcgagctcat agcttcaaaa tgtttctact cctttttac tctt 44

 <210> 49
 <211> 45
 25 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 <400> 49
 30 cgtctagaaa acttagatta gattgctatg ctttcttct aatga 45

 <210> 50
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 35
 <400> 50
 ttgcgattg ggcgctctc cgagctcagt ttatcattat caatactcgc 50

 <210> 51
 40 <211> 35
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 <400> 51
 45 atggatctc tagaatccgt cgaaactaag ttctg 35

 <210> 52
 <211> 41
 <212> ADN
 50 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 <400> 52
 atgaattctc tagaaaactt agattagatt gctatgctt c 41

 55 <210> 53
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 60 <400> 53
 tgataatgat aaactgagct cggaagagcg cccaatacgc aaac 44

 <210> 54
 <211> 41
 65 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

ES 2 665 258 T3

<400> 54
atgaattctc tagaaaactt agattagatt gctatgcttt c 41

5 <210> 55
<211> 35
<212> ADN
<213> Saccharomyces cerevisiae

10 <400> 55
atggatcctc tagaatccgt cgaaactaag ttctg 35

15 <210> 56
<211> 1373
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>
<223> promotor constructor

<400> 56
atgaattctc tagaaaactt agattagatt gctatgcttt ctttctaag agcaagaagt 60
aaaaaaagtt gtaatagaac aagaaaaatg aaactgaaac ttgagaaatt gaagaccgtt 120
tattaactta aatatcaatg ggaggtcatc gaaagagaaa aaaatcaaaa aaaaaatttt 180
caagaaaaag aaacgtgata aaaattttta ttgccttttt cgacgaagaa aaagaaacga 240
ggcgggtctct tttttctttt ccaaaccttt agtacgggta attaacgaca ccctagagga 300
agaaaagaggg gaaatttagt atgctgtgct tgggtgtttt gaagtggtag ggcgatgcgc 360
ggagtccgag aaaatctgga agagtaaaaa aggagtagaa acattttgaa gctatgagct 420
ccagcttttg ttcccttag tgagggttaa ttgcgcgctt ggcgtaatca tggatcatagc 480
tgtttctctg gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatagga gccggaagca 540
taaagtgtaa agcctggggg gcctaagtag tgaggtaact cacattaatt gcggtgagct 600
cactgccgcg tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac 660
gcgcggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttccga gctcagttta tcattatcaa 720
tactcgccat ttcaaagaat acgtaaataa ttaatagtag tgattttcct aactttattt 780
agtcaaaaaa ttagcctttt aattctgctg taaccctgac atgcccacaa tagggggcgg 840
gttacacaga atatataaca tcgtaggtgt ctgggtgaa agtttattcc tggcatccac 900
taaatataat ggagcccgct ttttaagctg gcatccagaa aaaaaagaa tcccagcacc 960
aaaatattgt tttcttcacc aacctcagt tcataggtcc attctcttag cgcaactaca 1020
gagaacaggg gcacaaacag gcaaaaaacg gccacaacct caatggagtg atgcaacctg 1080
cctggagtaa atgatgacac aaggcaattg acccagcat gtatctatct cattttctta 1140
caccttctat taccttctgc tctctctgat ttggaaaaag ctgaaaaaaa aggttgaac 1200
cagttccctg aaattattcc cctacttgac taataagat ataaagacgg taggtattga 1260
ttgtaattct gtaaatctat ttcttaaact tcttaaattc tacttttata gtagtcttt 1320
tttttagttt taaaacacca gaacttagtt tcgacggatt ctagaggatc cat 1373

25 <210> 57
<211> 43
<212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 57
 gcgcgccgc tctagaaac ttagattaga ttgctatgct ttc 43
 <210> 58
 10 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 58
 attcgtacgt ctagaatccg tcgaaactaa gttctg 36
 <210> 59
 20 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 59
 atgcgtaagg agaaaatacc gcatcagg 28
 30 <210> 60
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 60
 40 ctctcagtac aatctgctct gatgccg 27
 <210> 61
 <211> 27
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 61
 ctctcagtac aatctgctct gatgccg 27
 <210> 62
 <211> 45
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 60 <400> 62
 cggatatttc tccttacgca tggaaagcgc gcctcgttca gaatg 45
 <210> 63
 65 <211> 28
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 63
 tcgacggatc tatgcggtgt gaaatacc 28
 <210> 64
 10 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 64
 actctcagta caatctgctc tgatgccg 28
 <210> 65
 20 <211> 48
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 65
 30 agagcagatt gtactgagag tcatcagagc agattgtact gagagtc 48
 <210> 66
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 66
 40 cacaccgatc agatccgtcg aggatttgc cgattcggc ctattgg 47
 <210> 67
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 67
 atgccgcata gttaagcca 19
 <210> 68
 <211> 40
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 60 <400> 68
 tggcttaact atgcggcatg agcgacctca tgctatacct 40
 <210> 69
 65 <211> 41
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 69
 tctcagtaca atctgctctg ctgtggataa ccgtattacc g 41
 <210> 70
 10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 70
 cagagcagat tgtactgaga gtg 23
 20 <210> 71
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 71
 30 agagcagatt gtactgagag taagatgcaa gagttcgaat ctcttagcaa 50
 <210> 72
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 72
 40 cacaccgcat agatccgctg atcgactacg tcgtaaggcc gtttct 46
 <210> 73
 <211> 31
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 73
 aagatgcaag agttcgaatc tcttagcaac c 31
 <210> 74
 <211> 42
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 60 <400> 74
 cagagcagat tgtactgaga ggagcgacct catgctatac ct 42
 <210> 75
 65 <211> 42
 <212> ADN

ES 2 665 258 T3

<213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 75
 agattcgaac tcttgcattct tctgtggata accgtattac cg 42
 <210> 76
 10 <211> 50
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 76
 ctcattttgt tattcatttg taaaaaactg tattataagt aaatgcatgt 50
 <210> 77
 20 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 77
 30 tccttatatg tagctttcga cat 23
 <210> 78
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 78
 40 atgtcgaag ctacataaa ggaacgtg 28
 <210> 79
 <211> 60
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 79
 caaatgaata acaaaatgag acaagaaga aaaccaattt ttacaagcgt ttgctggcc 60
 <210> 80
 <211> 4506
 55 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 80

ES 2 665 258 T3

atgagcaata tcaaaagcac gcaagatagc tctcataatg ctgtcgctag aagctcaagc	60
gcttcttttg cagcttcaga agaatcattt acgggcataa cccatgacaa agatgagcag	120
agcgataccc cggcggataa actaacaaaa atgctgacag gacctgcaag agacactgcg	180
agccagatta gtgccactgt gtctgaaatg gcgccagatg tcgtatctaa agtggagtca	240
tttgacagatg cactatcccg tcatacaacg agaagcggtg cctttaatat ggattcagat	300
agtgacgatg ggttcgatgc ccatgccatc tttgaaagt ttgtaagaga cgctgatgag	360
caaggcatcc atatccgcaa ggctgggtgt accatagagg acgtaagcgc taaagggtgtg	420
gatgagagtg ccctagaagg tgctaccttt ggtaacattc tttgtttacc gttgaccatc	480
tttaaaggta ttaaggctaa gaggcatcaa aagatgagac agatcataag caatgtcaat	540
gccctggcag aagcgggtga aatgattttg gttcttgtaa ggcctgggtgc tggttgttcc	600
tcctttttaa aagtaacagc tggtgaaata gatcagtttg ccggtgggtgt ttccggtgaa	660
gtagcatatg atggtattcc ccaagaagaa atgatgaaac gatataaagc agatggtatt	720
tacaatggtg agttggatgt tcatttcctt tatttaacag ttaagcaaac tttggatttc	780
gctattgcct gcaaaacgcc tgctctcaga gtcaataacg tttccaaaaa ggaatacatt	840
gcatccagaa gagatttata tgcaaccatt ttoggtctaa ggcataccta taataccaaa	900
gttggtaacg atttcgtag aggtgtatct ggtgggtgaac gtaagcgtgt ttccattgcc	960
gaggctttgg cagccaaagg ttccatttac tgttgggata atgccactag aggtttggat	1020
gcgtctacgg ccttagaata cgcaaaagcc atccgtatta tgacaaaactt attgaaatca	1080
accgcttttg ttacaattta tcaggcaagt gaaaacattt acgaaacatt tgataaagtc	1140
actgtccttt attctggtaa gcaaatttat tttggtttga tccacgaggc aaaaccttat	1200

ES 2 665 258 T3

ttcgcaaaaa	tggttattt	gtgtcctcca	aggcaagcaa	cagctgaatt	ttaaccgcg	1260
ttgactgac	caaatggatt	ccatctgac	aagccagggt	atgaaaataa	agtaccaaga	1320
accgctgag	aattcgaaac	atattggta	aattctccag	agtttgctca	aatgaaaaaa	1380
gatatcgct	cttataaaga	gaaggccaat	accgaaaaga	ctaaagaagt	ttatgacgaa	1440
tcgatggct	aagagaaac	caaatatacg	agaaagaagt	cttattatac	agtgtcatat	1500
tgggaacaag	ttaaactgtg	taccaacgt	gggttccaaa	gaatttacgg	taacaagagt	1560
tatacagtca	tcaatgtctg	ctctgcaata	attcaatctt	ttattactgg	atcattattt	1620
tacaataccc	cttcacccac	ttccggtgct	ttttcaagag	gtgggtgtgt	gtattttgcg	1680
ctactatatt	attctttgat	gggactggcg	aatatttctt	ttgaacatag	gccaatctta	1740
caaaagcaca	agggtattc	tttgtatcat	ccttcagctg	aggcaattgg	ctccactctg	1800
gcactcttcc	ccttcagaat	gattggtttg	acctgtttct	ttatcatttt	attcttccta	1860
tctgggttgc	acagaacagc	gggatcattt	tttaccatct	atttgttctt	aaccatgtgt	1920
tcagaggcga	tcaatggttt	atttgagatg	gtttcttcag	tatgtgacac	tctttctcaa	1980
gctaactcta	tctcgggtat	tctgatgatg	tctatctcaa	tgtactctac	ctatatgac	2040
caattgcctt	cgatgcatcc	atggtttaaa	tggatatcgt	acgtactacc	tatcaggtac	2100
gccttcgagt	cgatgttaaa	tgccgaattt	cacggtaggc	atatggattg	tgctaacact	2160
ctagtaccca	gtggaggaga	ctatgataat	ttatccgatg	actacaaagt	atgtgctttt	2220
gttggttcga	aaccagggtca	gtcttatgtg	cttgggtgatg	actaccttaa	aatcaattt	2280
cagtaogttt	ataagcacac	gtggagaaac	tttggtatct	tgtgggtcct	tttactgggt	2340
tatgttgttt	tgaaagtgat	attcacagaa	tataagaggc	ctgtgaaagg	tgggtggat	2400
gctcttatct	tcaagaaagg	atcaaaaaga	tttatcgcac	atgcagatga	agaatctcca	2460
gacaatgtca	atgatataga	tgccaaagag	caattctcca	gtgaaagtag	cggcgcaaat	2520
gatgaagtat	ttgatgattt	agaagccaaa	gggtttttca	tttgggaagg	cgatgcttt	2580
actattccat	atgaaggcgg	taagagaatg	cttttgata	atgtttcagg	ttattgtatt	2640
ccaggtacca	tgacggcctt	gatgggagag	tcagggtcctg	gtaaaacaac	tttgtaaat	2700
actcttgctc	aaagaaatgt	cggtatcatt	actggtgata	tgcttgtcaa	tggacgtccc	2760
attgatgcga	gttctgaaag	gcgtacaggt	tatgtacaac	aacaggatat	acatatcgca	2820
gagttaactg	ttaggaatc	gttgcagttt	tctgctcgta	tgcgtcgccc	tcagcatttg	2880
cctgattctg	aaaaaatgga	ttatgtggaa	aaaatcatca	gagttttggg	aatggaagag	2940
tatgcggaag	cccttgttgg	tgaggttggg	tgtggtttaa	acgttgaaca	gagaaagaag	3000
ctgtctattg	gtgttgaact	agtcgccaaa	ccagacttat	tattattcct	cgatgaacct	3060
acatcagggt	tggattctca	atcttcatgg	gccattattc	aattattaag	aaagttatca	3120

ES 2 665 258 T3

```

aaagctggcc aatccattct ttgtacgac catcaacctt cagctactct gttcgaagag 3180
tttgatagat tactactttt gaggaagggt ggacaaactg tttatttcgg agatattggt 3240
aagaactctg ccaccatttt gaactacttt gaaaggaatg gggcaagaaa atgtgattct 3300
agtgaaaatc ctgctgaata tatttttagag gctattgggt cgggtgccac agcatccgtc 3360
aaagaagact ggacagaaaa atggttgaac tctgtcgagt ttgaacaaac aa-aagaaaaa 3420
gtacaggatt taataaatga tttatcgaaa caagaaacta aatccgaagt tggagacaaa 3480
ccttccaaat atgctacttc ttatgcttac cagttcagat atgttttaat cagaacctct 3540
acttcatttt ggagaagtct gaattacatc atgtcaaaga tgatgctaata gctggttgg 3600
ggctctgata ttggtttcac atttttcaat gttggtaaaa gttatgtcgg cttacaaaaa 3660
gcgatgttcg cggcattttat ctctattatc ttgtctgctc ctgcaatgaa ccaaatccaa 3720
ggacgtgcta ttgcctocag agaacttttt gaagttaggg aatoccaatc taacatgttt 3780
cactggctgc tgggtttgat cactcagtac ttgagcgaac ttccctatca tttatttttt 3840
tcgacaattt tctttgtctc atcgtatttt ccattaagaa tcttcttcga agcgtcaaga 3900
totgcggtgt actttttgaa ttaactgcatt atgttccagt tatactatgt tggctctggc 3960
ttaatgatcc tatatatgtc accgaacctt ccatccgcta atgttatctt aggtttgtgt 4020
ctgtcattta tgctttcttt ctgtgggttt acacaaactg tctcattgat gcctggcttc 4080
tggacattca tgtggaaggc ttcccatac acatattttg ttcagaatct ggtcgggaatt 4140
atgctgcaca aaaaaccagt cgtatgcaaa aagaaagaac taaactactt caaccacca 4200
aacggctcaa cgtgtggaga gtacatgaaa ccctttttgg aaaaagctac tggttacatc 4260
gaaaatcctg atgctacgtc agattgtgca tactgtattt acgaagttgg agataattat 4320
ttgacacata tcagctctaa gtatagctac ttgtggagaa attttggaa attttgatt 4380
tacattttct tcaatatcat tgctatggtt tgtgtgtatt acctottoca tghtaagaaa 4440
tcttcttcc taagccccgt atctatactc aataaaatta aaaacataag gaaaaagaag 4500
cagtaa 4506

```

5 <210> 81
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

10 <400> 81
 tcgacggatt ctagaggatc catgagcaat atcaaaagca cgcaagata 49

<210> 82
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

15 <400> 82
 atcttagcta gccggttac ctactgctt cttttcctt atgttttaa ttttattga 59

20 <210> 83
 <211> 4320
 <212> ADN
 <213> artificial

ES 2 665 258 T3

<220>

<223> Botrytis cinerea optimizada para expresión de Saccharomyces cerevisiae

<400> 83

atggcagcaa tagagccaga aggtttttct agtatcgta gaccacacga ggaacatggt	60
aatgcattaa caagagcttt gtcacatct tctgcatttt ctgatagaaa aagacaaaga	120
gcttacgatt cttcagatga agataataaa aaagagaagt ctatggctgc tgattggtca	180
ttgatgccag aattacaggc tatgcaacaa caaagtgata aagaccaggc taaaagaaga	240
gatttaggtg taacttgaa aaacttgact gttaaaggta ttggtgctga tgctgctatt	300
aatgaaaacg ttggttctca gttcaatatt ccaaagttga ttaaagaagg tagaactaaa	360
ccaccattac gtacactagt tgataactca cacggttg ttaagccagg tgaatggtg	420
ctagtttgg gtagaccagg tgcgggttg acaactttac taaagatggt ggctaact	480
agaggtggtt acgctgaagt aacaggtgat gttcattttg gttctttaa ccatactgaa	540
gctcatcaat acagaggtca aatcgtaatg aactgaag aagaattatt cttccaaca	600
ttaactggtg gtcaaacaat agactttgcc actaggatga aggttccatt ccatagacct	660
tcaaattctg gttctccaga agaatatcaa caggctaaca gagatttctt gttaaaatct	720
atgggtatth ctcatacaca tgaaacaaag gttggtaatg aatacgtaag aggtgtaagt	780
ggtggtgaaa gaaaagagt ttgattata gaaatgtag catctagagg ttctgttatg	840
tgttgggata atagtactag gggcttagat gcttctcag ctcttgacta taccaaagct	900
attagagcta tgacagatat ttttggtatg gcatctattg tgacattata ccaagccggt	960
aatggtatth ataatttgtt tgataagggt ctagtattgg atgaaggtaa acaaatttac	1020
tacggtccaa tgaagcaggc tagaccattt atggaggaac taggttcat ttgtgacgat	1080
tctgctaatt ttgctgactt cttaacaggt gtaactgttc ctactgaaag aaaaattaga	1140
gatgaatttc agaatagatt ccctagaact gccggtgaaa ttttggtgc ttataataga	1200
cactcaatta agaatagagt ggaaaaagaa tatgattatc caactactgc tatcgcaaag	1260
gaaagaaccg aagatttcag aacctcagtt caacatgaga agaatcccaa gttgggtaag	1320
gatttccat taactacttc atttatgacc caagttaaag catgtgttat tagacaatat	1380
caaattatth ggggtgacaa agctactttc attattaac agttgtcaac tttagacaaa	1440
gccttgattg ctggtagttt gttctataat gcaccagcta atgcttoagg totatttgtt	1500
aaatctggtg cattatthtt gtcattatta ttcaatgcat tgttggctat gtctgaagtt	1560
actgattctt tttctggtag accagtttta gctaagcaca aagcgtttgc atttatcac	1620

5

ES 2 665 258 T3

cctgctgctt tctgtattgc ccaaattgct gcggatatac ctgtattggt ggttcaagta 1680
 tctcattttt ctttggttat gtattttatg gttggtttaa gacaagacgc tggatgattt 1740
 ttcacttatt ggattttgat ttogcagct acaatgtgca tgactgcttt gttcagagct 1800
 gttggtgctg gtttttctac ttttgatgct gcatctaaag tttcaggttt cttagtttca 1860
 gcattgatta tgtacacagc ttatatgatt caaaaacccg atatgcatcc ttggtttgta 1920
 tggatttact ggattgatcc tctagcttac ggtttttctg ctattttggc taacgagttc 1980
 aaaggcaaa ttattccatg cgttgctaata aatctagttc caaatggtcc aggttatgct 2040
 gatttggcctt ttcaagcatg tgccgggtgtt ggtggtgctt tacctggtgc tacatcagta 2100
 actggtgaac agtattttaa ttctttgtct tactcttctt caaacatttg gagaaacttt 2160
 ggtattttgt gggctttttg ggtattattc gttgttttga cgatttatta cacctcaaac 2220
 tggctctgcca atgggtgaaa atctggcatt ctattaatac caagagaaaa agctaaaaag 2280
 aataccgcta tottgaaagc tgccaacgct ggagatgaag aatctcaagc tattgaagag 2340
 aaaagacaag ttcaatcaag accagcttct caagacacca aagttgcaga agaactgat 2400
 gatcaactaa tgagaaatac ttcggttttc acctggaaga atttaacata cactgtttaa 2460
 acaccatctg gtgatagagt gctcttagat aatgttcaag gttgggttaa gccaggtatg 2520
 ttagtgctt tgatgggttc aagtgggtgct ggaaaaacca ctttactaga tgttttgct 2580
 caaagaaaga ctgatggtac aattaaaggt tctattctag tagatggaag acctttaaat 2640
 gtttcttttc aaagatctgc tggttattgc gaacaattag atgtgcacga accattggca 2700
 acagtacgtg aagccttaga attttctgct ttattgagac aatctagaac tgttccagat 2760
 gccgaaaaat tgagatacgt tgatactatc attgatttgc tagaaatgca tgatatgaa 2820
 aatactttga ttggtaacac cggctgctggt ttatcagttg aacaaagaaa aagattgact 2880
 attggtgtag agttagttag taagcctagc attttgatat ttttgatga acctacatct 2940
 ggttagacg gacaggctgc ttttaatact gttagatttt taagaaagt agctgatgtt 3000
 ggtcaagcca ttttagttac aatccatcaa ccttcagctc aactcttgc tcaatttgat 3060
 tctctgttat tgttggttaa aggtggaaaa actgtttatt toggatgat cggtgaagat 3120
 tctaagacca ttaaagaata cttogetagg tatgatgctc cctgcctga aagttctaac 3180
 ccagcagaac atatgattga cgttgtttca ggtaccttat ctaaaggtaa ggattggaat 3240
 caagtatggt taaattctcc agagtatgaa tataccgtta aagaactaga tagaataatt 3300
 gaaactgccg cagctgctcc tccaggctact gtagatgacg gatttgaatt tgcactccc 3360
 ttatggcaac aaattaagtt agttacaaac agaatgaacg ttgctattta cagaaatact 3420
 gattatatta acaataaatt tgcctacac attggttctg cattatttaa cggtttttca 3480
 ttctggatga taaagcatag cgttgggtgt ctacaattaa ggttatttac agtatttaat 3540
 tttattttctg ttgcaccagc tgttatggcc cagttgcaac cattgttctc agaagaaga 3600

ES 2 665 258 T3

gatatttatg aaaccagaga gaaaaagagt aagatgtatt cttggtgggc ttttgetact 3660
 ggtaatggtg tatctgaatt accataactta gttatctgtg ctgtattata ctttgtttgt 3720
 tggattata cogttggttt cccatctgat tctagtaagg caggttctgt tttgttcggt 3780
 atgatttgtt atgagttcat ttatacagga atcggtcagt ttggtgctgc ctatgctcca 3840
 aacgttgttt tcgcctcttt ggtaaacca ttggttatag gtaccttggg ttcattctgc 3900
 ggagttttag taccatacgc tcaaattaca gagttctgga gatattggat gtactattta 3960
 aaccctttta attatttgat gggttctttg ttggttttta cttcatggga cactccagtt 4020
 aattgtaggg aatcagagtt tgcaattttc aaccagcta atggtacctg tggatgaat 4080
 ttgtcttctt atttgcaggg tatgggtgct gctgctaatt taattaatcc agatgctact 4140
 gaagtttga gagtttgtga atatactgtt ggaaacgatt atttgaaagg tttgaatttg 4200
 aaaacatatt cttatggttg gagggacgct ggtatttgcg ctttattcgt tttctctggt 4260
 tacggtctag tttttctatt gatgaagttg agaacaaaga aaacaaaagg tgctgaatga 4320

5 <210> 84
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Botrytis cinerea

10 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (24) .. (24)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 84
 Gln Ala Lys Arg Arg Asp Leu Gly Val Thr Trp Lys Asn Leu Thr Val
 1 5 10 15

15 Lys Gly Ile Gly Ala Asp Ala Xaa
 20

20 <210> 85
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> desconocido

<220>
 <223> encontrado en búsqueda uniprot

<400> 85
 Gln Ala Lys Arg Arg Asp Leu Gly Val Thr Trp Lys Asn Leu Thr Val
 1 5 10 15

25 Lys Gly Ile Gly Ala Asp Ala Ala
 20

30 <210> 86
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> desconocido

<400> 86

ES 2 665 258 T3

Gln Val Lys Arg Arg Asp Leu Gly Val Thr Trp Arg Asn Leu Thr Val
 1 5 10 15

Lys Gly Ile Gly Ala Asp Ala Ala
 20

5 <210> 87
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Desconocido

10 <220>
 <223> Encontrado en búsqueda uniprot

<400> 87
 Gln Val Lys Arg Arg Asp Leu Gly Val Thr Trp Lys Asn Leu Thr Val
 1 5 10 15

Lys Gly Ile Gly Ala Asp Ala Ala
 20

15 <210> 88
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> Encontrado en búsqueda uniprot

<400> 88
 Gly Ala Lys Asp Lys Lys Leu Gly Ile Thr Trp Thr Asp Leu Asp Ile
 1 5 10 15

Lys Gly Ile Gly Ala Asp Ala Ala
 20

25 <210> 89
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Botrytis cinerea

30 <400> 89
 tcgacggatt ctgaggatc catggcagca atagagccag aaggftt 47

35 <210> 90
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Botrytis cinerea

40 <400> 90
 atcttagcta gccgcgtac ctcatcagc acctttgtt ttctttgtc tc 52

45 <210> 91
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador

50 <400> 91
 ggtaccgagg ctgagtaaga tccg 24

<210> 92

<211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

5 <220>
 <223> cebador

<400> 92
 ggatcctcta gaatccgctg aaactaagtt 30

10 <210> 93
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Kluyveromyces lactis

15 <400> 93
 cttgacgttc gttcgactga tgagc 25

20 <210> 94
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Kluyveromyces lactis

25 <400> 94
 ctggaattcg atgatgtagt ttctgg 26

<210> 95
 <211> 42
 <212> ADN
 30 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 95
 ctacatcatc gaattccagc tacgtatggc catttctct tc 42

35 <210> 96
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

40 <400> 96
 tttttgatta aaattaaaaa aacttttag tttatgatg tgtttttg 49

<210> 97
 <211> 50
 45 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 97
 agtttttta attttaatca aaaaatgagc gaagaaagct tattcgagtc 50

50 <210> 98
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

55 <400> 98
 cacctaaaga cctcatggcg ttacc 25

60 <210> 99
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Kluyveromyces lactis

65 <400> 99
 cgtctgcat tggatggtg taac 24

<210> 100
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Kluyveromyces lactis*
 5
 <400> 100
 gagcaatgaa cccaataacg aaatc 25
 <210> 101
 10 <211> 44
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 101
 15 caccatccaa tgcagaccgt ttagtttat gtatgtgtt tttg 44
 <210> 102
 <211> 27
 <212> ADN
 20 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 102
 tgttctgctc tctcaatt tccttc 27
 25 <210> 103
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 30 <400> 103
 ctggaattcg atgatgtagt ttctaattt ctgcgctgtt tcg 43
 <210> 104
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> *Kluyveromyces lactis*
 <400> 104
 ccaacaatga tgatatctga tc 22
 40 <210> 105
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Kluyveromyces lactis*
 45 <400> 105
 ccgctgctag gcgcgccgtg ggcgcaatta taaaactg 40
 <210> 106
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Kluyveromyces lactis*
 50 <400> 106
 ccgctgctag gcgcgccgtg ggcgcaatta taaaactg 40
 <210> 107
 <211> 38
 <212> ADN
 60 <213> *Kluyveromyces lactis*
 <400> 107
 gtcagcggcc gcatccctgc tacgctgcag gtcgacaa 38
 65 <210> 108
 <211> 21

<212> ADN
 <213> *Kluyveromyces lactis*

 <400> 108
 5 atacattgc ctttgaaaa c 21

 <210> 109
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 <400> 109
 gccgtcatat attacttga gc 22

 15 <210> 110
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 20 <400> 110
 gcagggatgc ggccgctgac acagaagtcg cgtcaactg 40

 <210> 111
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 <400> 111
 30 cagaggtcgc ctgacgcata tacct 25

 <210> 112
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 35
 <400> 112
 ccgctgctag gcgcgccgtg ctccagattt gccaaagaat aaggtaaac 49

 <210> 113
 40 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Kluyveromyces lactis*

 <400> 113
 45 gtcagcggcc gcatccctgc ttggctca tggcaattcc cg 42

 <210> 114
 <211> 44
 <212> ADN
 50 <213> *Kluyveromyces lactis*

 <400> 114
 cacggcgcgc ctagcagcgg taacgccagg gtttcccag tcac 44

 55 <210> 115
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> *Kluyveromyces lactis*

 60 <400> 115
 gtcagcggcc gcatccctgc tacgctgcag gtcgaaa 38

 <210> 116
 <211> 23
 65 <212> ADN
 <213> *Kluyveromyces lactis*

<400> 116
 cacactacac agattatacc atg 23

5 <210> 117
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Kluyveromyces lactis

10 <400> 117
 ttctctaacg acgacgaaat cg 22

15 <210> 118
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Kluyveromyces lactis

20 <400> 118
 cacggcgcg ctagcagcgg aggccactag tggatctgat at 42

25 <210> 119
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

30 <400> 119
 gaagaggagt agggaatatt actggct 27

35 <210> 120
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

40 <400> 120
 gcagggatgc ggccgctgac actccaagct gcctttgtgt gcttaat 47

45 <210> 121
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

50 <400> 121
 ccgctgctag gcgcgccgtg caagagtcc tcggttgcc agttatta 48

55 <210> 122
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

60 <400> 122
 cctgcatgt atatttcct gtacaatcaa tc 32

65 <210> 123
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

70 <400> 123
 ctgggagcag atgacgagtt ggt 23

75 <210> 124
 <211> 1191
 <212> ADN
 <213> Mucor rouxii

80 <400> 124

ES 2 665 258 T3

atggcaacca agagaaacgt tacctccaat gctcctgctg cagaagacat cagcatcagc 60
aacaaggctg tgattgatga agccattgaa agaaactggg agatccccaa tttcaccatc 120
aaggagatcc gtgatgctat cccagctcac tgtttccgtc gtgatacctt tagatccttt 180
acacatgttc ttcattgatat tatcatcatg tccatcttgg ccattgggtgc ttcttacatt 240
gattccatcc ctaataccta tgctcgcatt gctctctggc ccttgtaactg gatcgcctcaa 300
ggatttggtg gcactgggtg ctgggtcatt ggtcatgaat gtggccatca agcattcagc 360
ccttcaaaga ctatcaataa tagcgttggg tacgttctcc acaactgcttt attagtaoct 420
tatcaactcat ggagattctc tcaacttaag catcataaag ccaactggaca catgtcaaaa 480
gatcaggctt ttgtcccctc tactcgttaag gaatacgggt tgccctcctc tgagcaagat 540
cctgaagttg atggacctca tgatgctctt gatgaagctc ccattggtgt cttgtatcgc 600
atgttcttc aatttacctt tggctggcct ctttatctct tcaccaatgt ctcaggctcaa 660
gattaccocg gttgggcttc tcatttcaac cccaagtgtg ctatctacga tgaaaaccaa 720
ttctgggatg ttatgagctc cactgctggt gtccttggca tgattggttt cttggcttac 780
tgtggtcaag tctttggctc tcttgctgtc atcaagtact atgttattcc ctatttgaat 840
gttaactttt ggttggttct gatcacttac ttgcaacaca ctgatcccaa gttgcctcat 900
taccgtgaaa atgtttgaa cttccaacgc ggtgctgctt taactggtga tcgttcttat 960
ggcttctcc tcgactactt ccatcatcac atttctgata ctcatggtgc tcaccatttc 1020
ttctccacca tgccacta ccacgctgaa gaagctactg ttcatatcaa gaaggctctt 1080
ggtaagcact accactgcga caacacacct gtcctatcgc ccttggtgaa ggtctggaag 1140
agctgtcgtt ttgttgaaga tgagggcgat gttgtcttct ttaagaacta a 1191

- <210> 125
- 5 <211> 1371
- <212> ADN
- <213> *Ostreococcus tauri*
- <400> 125

ES 2 665 258 T3

atgtgtgttg aaacagaaaa taacgatggg attcctaccg ttgaaattgc tttcgtggg 60
gaaagagaaa gagctgaagc aaatgttaag ttgtcagcag aaaagatgga acctgcagct 120
ttggcaaaga cttttgctag aagatatggt gttattgaag gtggtgaata tgatgttact 180
gattcaaac atccaggtgg tactgttatt ttctacgctt tatccaatac tggtagcagat 240
gctaccgaag cattcaagga atttcatcat agatccagaa aagctagaaa ggctttggca 300
gctttaccat ccagaccagc aaagaccgct aaagttgatg atgctgaaat gttgcaagat 360
tttgctaaat ggagaaagga attagaaaga gatggtttct ttaagccatc acctgcacat 420
gttgcatata gatttgcaag attagctgca atgtacgctt tgggtactta cttaatgtat 480
gctagatacg ttgtttcatc tgttttagtt tacgcatggt tctttggtgc aagatgtggg 540
tgggttcaac atgaaggtgg tcattcctcc ttaaccggta acatttggg ggataagaga 600
atacaagcat tcaactgcagg tttcggttta gctggttcag gtgacatgtg gaactccatg 660
catacaaac atcatgcaac tcctcaaaaa gttagacatg atatggatct ggatacaact 720
ccagctggtg ctttcttcaa caccgctggt gaagataata gaccaagagg tttctctaaa 780
tactggttaa gattgcaagc atggactttt attccagtta catccggttt ggttttattg 840
ttttggatgt ttttcttaca tccttccaag gcattaaagg gtggtaaata tgaagaatta 900
gtttggatgt tggcagctca tgttattaga acatggacca ttaaggctgt tacaggtttc 960
actgcaatgc aatcttacgg tttatttttg gctacttctt gggtttcagg ttgttacttg 1020
tttgctcatt tctccacttc tcatacacat ctggatggtg ttccagctga tgaacatttg 1080
tcttgggtta gatacgcagt tgatcatact attgatattg atccatctca aggttggggt 1140
aattggttga tgggttattt gaattgtcaa gttattcatc atttgttccc atctatgcct 1200
caattcagac aaccagaagt ttccagaaga ttcggtgctt ttgctaagaa atggaatttg 1260
aactacaaag ttatgactta cgctggtgca tggaaagcaa ctttaggtaa cttagataac 1320
gttggtaaac attattacgt tcatggtcaa cattctggtg aaacagcata a 1371

- <210> 126
- <211> 957
- <212> ADN
- <213> Mortiella alpine
- <400> 126

ES 2 665 258 T3

```

atggaatcta ttgctcaatt cttgccatca aagatgcctc aagatttggt tattgatttg      60
gctgcagcta ttggtgtag agcagctcca tatgttgatc ctttgaagc agcttagtt      120
gcacaagctg aaaagtacat cccaactatc gttcatcata ctagaggttt cttggttgca      180
gttgaatcac ctttagttag agaattgcca ttgatgaacc ctttccatgt tttgttgatc      240
gttttggtt atttggttac tgtttttggt ggtatgcaa tcatgaagaa cttcgataga      300
ttcgaagtta agacattttc tttgttccat aacttctggt tagtttctat ttcagcttat      360
atgtgtggtg gtattttgta cgaagcatac caagctaact acggtttatt cgaaaacgca      420
gctgatcata ctgcaaaagg ttttccaatg gctaagatga tctggttggt ttattttctc      480
aagatcatgg aatttggtga tacaatgatt atggttttga aaaagaataa cagacaaatt      540
tcatttttgc atgtttacca tcattcttca attttcacaa tctggtggtt ggttactttt      600
gttgcaccta atggtgaagc atattttctcc gcagctttaa acagttttat tcatgttatc      660
atgtacggtt actacttctt gtccgcatta ggttttaaac aagttagttt cgtaagttc      720
tacatcacca gatcacaat gactcaattc tgtatgatgt caatccaatc cagttgggat      780
atgtatgcaa tgaaagtttt aggtagacca ggttatccat ttttcatcac tgctttgttg      840
tggttctaca tgtggacaat gttgggttta ttctataact tctacagaaa gaatgcaaag      900
ttggctaaac aagcaaaggc tgatgcagct aaagaaaagg ctagaaagtt acaataa      957

```

<210> 127
 <211> 1542
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Paramecium tetraurelia con codón optimizado para Saccharomyces cerevisiae

10 <400> 127

ES 2 665 258 T3

atggaaggta tcatcactca attcgggtatt ttgtttttgt tggctgcttt gtttattttc 60
gatggtttgt ttaaattgggt tccattgtac gctatcatcg ctgaagttta ctctttgtat 120
ttggattctc aaaagagaac tccacaacaa aaggaattgt tgaaaaatca aaagttgact 180
tggcaagaat tgaagaaaca tgataaccaa tcttctgctt acgttgctat taaaggtaaa 240
gtttacgatg ttacttcttt cttgaaactca catccagggtg gtagagaatt tttgttggtg 300
aattgtggta gagatgctac tttggctttc caatcttacc atccattttc tgataagcca 360
gaaaagttgt tggaaaagta tttgatcgggt gacttggtga ctactgaatg gccaaacttt 420
aaaccagatt ctggtttcta caaggaatgt actgaaagag ttaagaaata cttccaatct 480
aagggtatta atccaaagac tccaactcca ggtttggtta gagctatccc attgtggact 540
tgtttctttt acactttcta tttgactttc gtttctgatt ctttgggttt gactaagaga 600
attttgatcg gtactatctt cggatatttg caagctttga acactttgca tttgatgcat 660
gatgcttctc atgggtgctgc tggtaataat gaaaaatggg ggtggttttt cggtagattg 720
actttggatt atatttctgg ttcttctatg gttgcttggc aaaatcaaca tgttggttgg 780
catcatcaat atactaatat tatgggttct gatccagata ttccacaatt gaaagaagg 840
gacgttagaa gattggttaa ggaacaaatt tggctgctca tgtacaagta ccaacattg 900
tacatgccat tttgtacgg tttgtgtctt ttgagatcaa gatactacga tgttttcgaa 960
atcttcttga aggaaactga tggccagtt aaggtaacc caatctcttt gcaggataag 1020
ttgagacaag cttcttctaa gttgttggg ttgttttggg gatactattt gccagttcaa 1080
gttttcggca tgtctcaatg tcaattctgg ttcttgttca tctacgttga gttcatcact 1140
ggttactggg tggctattaa tttccaagtt tctcatggtt ctgatgaagc tgaatttttc 1200
tacaacaaca tggataaggc tgtaaaaaat ggtactaacg aacaatggcc aattgaatgg 1260
gctgttttgc aaattaaatc ttctgttgat tactctcatg gtaactgggt catgacttat 1320
ttgtgtgggt ctttgaacta ccaagttggt catcatttgt acccagggtg ttctcaatat 1380
ttgtaccag aaatcgctcc aatcatcttg gaagtttgta agaaatacaa tttgaagtac 1440
aattgttgc caggttttaa agaagcttg aacggctcatt tcaaccattt gaaaaatag 1500
ggtaaacaaa acaagtttgt tggttttgct aaaatggaat aa 1542

5 <210> 128
<211> 38
<212> ADN
<213> Mucor Rouxii

10 <400> 128
tagaactaaa gggcgccgc atggcaacca agagaac 38

<210> 129
<211> 42
<212> ADN
<213> Mucor rouxii

15 <400> 129
ttaattaaga gtcgatct ttggttcta aagaagaca ca 42

20 <210> 130
<211> 41

<212> ADN
 <213> *Ostreococcus tauri*

 <400> 130
 5 tatagggccc gggcgtcgac atgtgtgtg aaacagaaaa t 41

 <210> 131
 <211> 41
 <212> ADN
 10 <213> *Ostreococcus tauri*

 <400> 131
 cggtaccaag ctactcgag ttatgctgtt ttaccagaat g 41

 15 <210> 132
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Mortellia alpine*

 20 <400> 132
 tagaactaaa gggcggccgc atggaatcta ttgctcaatt c 41

 <210> 133
 <211> 42
 25 <212> ADN
 <213> *mortella alpine*

 <400> 133
 30 ttaattaaga gctcagatct ttattgtaac ttctagcct tt 42

 <210> 134
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Paramecium tetraurelia*
 35
 <400> 134
 tatagggccc gggcgtcgac atggaaggta tcatcactca 40

 <210> 135
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Paramecium tetraurelia*

 <400> 135
 45 cggtaccaag ctactcgag ttattccatt ttagcaaac ca 42

 <210> 136
 <211> 40
 <212> ADN
 50 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 136
 55 tggcttaact atgcgcatg agcgacctca tgctatacct 40

 <210> 137
 <211> 41
 <212> ADN
 60 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador

 65 <400> 137

ES 2 665 258 T3

tctcagtaca atctgctctg ctgtggataa ccgtattacc g 41

<210> 138

<211> 1113

5 <212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 138

atgtcagagt ctccaatggt tgccgccaat ggtatgccta aggttaatca aggtgctgaa	60
gaagacgtga gaatactagg ctatgatcca ttagcaagtc cagcattact acaagtgcaa	120
atccccgccca ctccctacttc cttagagact gccaaaagag gtaggagaga agctattgat	180
atcattactg gtaaagatga tagagtgcta gtgatagtag gaccatgttc aattcatgat	240
ttggaagccg cccaagaata tgctttgaga ttgaaaaagt tgagcogatga attgaaagga	300
gatctgtoga taataatgag agcttacctg gaaaaaccaa gaactactgt tggttgghaa	360
ggtttaatta acgatcctga tgtaataaac accttcaata ttaacaaggg attgcaatcg	420
gctagacaac ttttoggtaa ttgaccaaac atcgggtctac ctattgggtc agaaatgta	480
gataccatca gccctcaata cctagccgat cttgttagtt toggogcaat aggcgctaga	540
acaacggagt ctcaacttca tagagaattg gcctctgggt tgtctttccc tgttggttc	600
aaaaatggta ccgacggtag tctaaatggt gctgtggatg cctgtcaagc agctgcccac	660
tctcatcatt tcatgggtgt aactttacac ggtgttgtag caatcacaac taaaaaggc	720
aacgaacatt gctttgttat attaagaggc gaaagaaag gtaccaatta tgacgctaaa	780
tccgtogctg aggcctaaggc acaattacct gctggttoga atggtttaat gattgactac	840
tctcatggca atagtaataa ggatttcaga aatcagccta aagttaacga cgttgtttgt	900
gaacaaatcg caaacgggtga aaacgcaata actggtgtca tgatcgaatc gaatatcaat	960
gaaggaaatc aaggatttcc tgctgagggc aaggcaggct tgaaatacgg tgtttccatt	1020
acagatgcct gtattggatg ggaaactact gaagatgttc ttagaaagtt ggctgctgca	1080
gtgagacaaa gaagagaggt aaataagaag tag	1113

10

<210> 139

<211> 771

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

15

<400> 139

ES 2 665 258 T3

atggatttta caaagccaga aacggtttta aacctacaaa atattagaga tgaattgggtg 60
 aggatggaag acagtattat ttttaaattc atagaagaa gccattttgc cacatgcca 120
 agtgtttacg aagctaata caactggatta gagattocaa attttaaagg ctcgtttttg 180
 gactgggcat tgagtaatct tgagatagca cattctagga tcagaagatt tgaatcccca 240
 gatgagacc cattcttccc agacaagatt caaaaatcat ttcttccttc aattaattac 300
 cctcaaatct tggcaccata tgctccagaa gtaaaactaca atgataagat aaagaaggtt 360
 tatattgaaa agataatacc cctgatatct aagagggatg gagatgacaa gaacaatfff 420
 tcatccgttg caactagaga cattgagtgt ctacaatcgt tgtctagaag aatacatfff 480
 ggtaaatfff ttgcagaggc taaatttcaa tctgatatac ctttgtacac taaattaatt 540
 aaaagtaagg atgtagaagg aattatgaaa aatataacaa attctgctgt ggaagagaaa 600
 atcttagaaa gattgactaa aaaggctgaa gtttacgggtg ttgatccaac caacgaatct 660
 ggtgaaagga ggattactcc cgaatatttg gttaaaatat ataaagaaat tgtaataccc 720
 attacaaaag aagtagaggt tgaatatcta ttgagaagat tggaagaatg a 771

<210> 140
 <211> 1179
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Vitis pseudoreticulata con codón optimizado para Saccharomyces cerevisiae

10

<400> 140
 atggcttctg ttgaagaaat tagaaatgct caaagagcta aagggtccagc tactatfff 60
 gctattggta ctgctactcc agatcattgt gtttaccat ctgattacgc tgattactac 120
 ttcagagtta ctaagtctga acatatgact gaattgaaga aaaagttcaa cagaatfff 180
 gataaatcta tgatcaagaa aagatacatc catttgactg aagaaatgtt ggaagaacat 240
 ccaaacatcg gtgcttacat ggctccatct ttgaacatca gacaagaaat catcactgct 300
 gaagttccaa agttgggtaa agaagctgct ttgaaagctt tgaaagaatg gggccaacca 360
 aatctaaaa ttactcattt ggttttctgt actacttctg gtgttgaaat gccaggtgct 420
 gattataaat tggctaattt gttgggtttg gaaacttctg ttagaagagt tatgttgtat 480
 catcaagggt gttatgctgg tggactggt ttgagaactg ctaaagattt ggctgaaaat 540
 aatgctgggt ctagagtttt ggttggtttg tctgaaatta ctgttggttac ttttagaggt 600
 ccatctgaag atgctttgga ttctttggtt ggtcaagctt tgtttggtga cggttctgct 660

ES 2 665 258 T3

	gctgttattg ttggttctga tccagatatt tctattgaaa gaccattggt tcaattgggt	720
	tctgctgctc aaacttttat tccaaattct gctggtgcta ttgctggtaa tttgagagaa	780
	gttggtttga ctttccattt gtggccaaac gttccaactt tgatctctga aaacatcgaa	840
	aactgtttga ctaaggcttt cgatccaatc ggtatctctg attggaactc tttgttttgg	900
	attgctcatc caggtgggcc agctattttg gatgctgttg aagctaaagt tggtttggat	960
	aagcaaaagt tgaaggctac tagacatata ttgtctgaat acggtaacat gtcttctgct	1020
	tgtgttttgt ttattttggg tgaatgaga aagaaatctt tgaaggaagg taaaactact	1080
	actggtgaag gtttggattg ggggtgtttt tttggttttg gtccaggttt gactattgaa	1140
	actgttgttt tgcattctgt tggtagctgat tctaattaa	1179
	<210> 141	
	<211> 37	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 141	
	ggcccgggcg tgcacatggc ttctgtgaa gaaatta	37
	<210> 142	
15	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
20	<223> cebador	
	<400> 142	
	ccaagcttac tcgagtcatt aattagaatc agtacca	37
25	<210> 143	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 143	
35	ctaaagggcg gccgcatggc atccgtagag gag	33
	<210> 144	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 144	
45	tccatcgata ctagttcatt agttagtgac agttg	35
	<210> 145	
	<211> 48	
	<212> ADN	
50	<213> artificial	

<220>
 <223> cebador

 <400> 145
 5 ctctacggat gccatgaatt ctctagaatc cgtcgaaact aagttctg 48

 <210> 146
 <211> 49
 <212> ADN
 10 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 146
 15 ttcaacagaa gccatggatc ctctagaaaa cttagattag attgctatg 49

 <210> 147
 <211> 40
 <212> ADN
 20 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador
 25
 <400> 147
 gcaatggatc agttacgta tatcttcgag cgtcccaaaa 40

 <210> 148
 <211> 39
 <212> ADN
 30 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador
 35
 <400> 148
 ataacgtaac tgatccattg cttcctcgct cactgactc 39

 <210> 149
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 40
 <400> 149
 45 ttcaaagaa tacgfttacc gacattggg cgc 33

 <210> 150
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 50
 <400> 150
 55 ttcaattgg tccatacagt ttgttttct taatac 37

 <210> 151
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 60
 <400> 151
 actaaagggc ggccgatgac agagtctcca atgt 34

 <210> 152
 <211> 37
 <212> ADN
 65

<213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 152
 5 taagagctca gatctctact tcttattac ctctctt 37
 <210> 153
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 10
 <400> 153
 ggccccggcg tcgacatgga ttttacaag ccagaa 36
 <210> 154
 15 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 154
 20 ccaagcttac tcgagtcatt cttccaatct tctcaa 36
 <210> 155
 <211> 38
 <212> ADN
 25 <213> Schizosaccharomyces pombe
 <400> 155
 caagataaac gaaggcaaag atgggtagga gggctttt 38
 <210> 156
 30 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Schizosaccharomyces pombe
 <400> 156
 35 atgagacaaa gaagaaaacc aattttaca agccaacact cccttcgtgc tt 52
 <210> 157
 <211> 55
 40 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 157
 tcttcttgt ctctattgt tattcattg tagtgacacc gattattaa agctg 55
 <210> 158
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 158
 cttgccttc gttatcttg 20
 <210> 159
 60 <211> 41
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 65 <223> cebador

<400> 159
 gcaatggcgg ccgcttacgt tatcttctc gctcactgac t 41

5 <210> 160
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 160
 ataacgtaag cggccgcat tgcattggag acttgaccaa acct 44

15 <210> 161
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 161
 25 tgacaccgat tatttaaagc tgc 23

<210> 162
 <211> 36
 <212> ADN
 30 <213> artificial

<220>
 <223> cebador

35 <400> 162
 caagataaac gaaggatggg taaggaaaag actcac 36

<210> 163
 <211> 45
 40 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador

45 <400> 163
 gcagcttaa ataatcgggt agaaaaactc atcgagcatc aaatg 45

<210> 164
 <211> 41
 50 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 55 <223> cebador

<400> 164
 aatggagct ccaccgcggc ttcgagcgtc ccaaacctt c 41

60 <210> 165
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial

65 <220>
 <223> cebador

ES 2 665 258 T3

<400> 165
 gcttgatgc gaattcgagc gacctcatgc tatacctg 38

5 <210> 166
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 166
 ctagtggatc ccccggttg gagcgacctc atgctatacc 40

15 <210> 167
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 167
 gaattcctgc agcccgggcg agcgtccaa aaccttctca ag 42

25 <210> 168
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial

30 <220>
 <223> cebador

35 <400> 168
 ggcaagaat tgtaattaa gagctctgat cttatcg 37

40 <210> 169
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial

45 <220>
 <223> cebador

<400> 169
 ggcgagcaa gtcgacggcg ag 22

50 <210> 170
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> artificial

55 <220>
 <223> cebador

<400> 170
 ggaacaaaa gctgggtacc ctgtggataa ccgtattacc 40

60 <210> 171
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> artificial

65 <220>
 <223> cebador

<400> 171
 aattggagct ccaccgctgg agcgacctca tgctatacc 39

5 <210> 172
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 172
 gaggagaact tctagtatat tctgtatacc 30

15 <210> 173
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 173
 gaggatatac gaatccacaa aaggg 25

25 <210> 174
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 174
 atctatgaat aacatataaa acgaaaagag gaataatc 38

35 <210> 175
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> artificial

40 <220>
 <223> cebador

<400> 175
 ctattacat tatcaatcct tgcattcag c 31

45 <210> 176
 <211> 8402
 <212> ADN
 <213> artificial

50 <220>
 <223> plásmido

55 <400> 176

ES 2 665 258 T3

tgcgcggttt	cggatgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacgggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatacga	ctacgtcgtta	aggccgtttc	tgacagagta	aaattcctga	gggaactttc	240
accattatgg	gaaatgcttc	aagaaggtat	tgacttaaac	tccatcaaat	ggtcagggtca	300
ttgagtgttt	tttatttggt	gtatTTTTTT	TTTTTtagag	aaaatcctcc	aatatcaaat	360
taggaatcgt	agtttcatga	ttttctgtta	cacctaaactt	tttgtgtggt	gccctcctcc	420
ttgtcaatat	taatgttaa	gtgcaattct	tttcccttat	cacggtgagc	cattagtatc	480
aatttgctta	cctgtattcc	tttactatcc	tcctTTTTTct	ccttcttgat	aatgtatgt	540
agattgcgta	tatagtttcg	tctaccctat	gaacatattc	cattttgtaa	tttctgtctc	600
tttctattat	gaatttcatt	tataaagttt	atgtacaaat	atcataaaaa	aagagaatct	660
ttttaagcaa	ggattttctt	aacttcttcg	gcgacagcat	caccgacttc	ggtggtactg	720
ttggaaccac	ctaaatcacc	agttctgata	cctgcatcca	aaacctTTTT	aactgcatct	780
tcaatggcct	taccttcttc	aggcaagttc	aatgacaatt	tcaacatcat	tgacagcagac	840
aagatagtgg	cgatagggtc	aaccttattc	tttgccaaat	ctggagcaga	accgtggcat	900
ggttcgtaca	aaccaaagtc	ggtgttcttg	tctggcaaag	aggccaagga	cgcagatggc	960

ES 2 665 258 T3

aacaaccaca aggaacctgg gataacggag gcttcacgg agatgatata accaaacatg 1020
ttgctgggtga ttataatacc atttaggtgg gttgggttct taactaggat catggcggca 1080
gaatcaatca attgatgttg aaccttcaat gtagggaatt cgttcttgat ggtttcctcc 1140
acagtttttc tccataatct tgaagaggcc aaaagattag ctttatccaa ggaccaaata 1200
ggcaatgggtg gctcatgttg tagggccatg aaagcggcca ttcttgatgat tctttgcaact 1260
tctggaacgg tgtattgttc actatcccaa ggcacaccat caccatcgtc ttcttttctc 1320
ttaccaaagt aaatacctcc cactaattct ctgacaacaa cgaagtcagt acctttagca 1380
aattgtggct tgattggaga taagtctaaa agagagtcgg atgcaaagtt acatggtctt 1440
aagtggcgt acaattgaag ttctttacgg attttttagta aaccttgctc aggtctaaaca 1500
ctaccggctac cccatttagg accaccaca gcacctaaaca aaacggcctc agccttcttg 1560
gaggcttcca ggcctcctc tggaaagtga acacctgtag catcgatagc agcaccacca 1620
attaatgat tttcgaaatc gaacttgaca ttggaacgaa catcagaaat agctttaaga 1680
accttaatgg cttcggctgt gatttcttga ccaacgtggt cacctggcaa aacgacgatc 1740
ttcttagggg cagacattag aatggtatat ccttgaaata tatatatata tattgctgaa 1800
atgtaaaagg taagaaaagt tagaaagtaa gaagattgct aaccacctat tggaaaaaac 1860
aataggctct taaataatat tgtcaacttc aagtattgtg atgcaagcat ttagtcatga 1920
acgcttctct attctatatg aaaagccggt tccggcgtc tcaccttcc tttttctccc 1980
aatttttcag ttgaaaaagg tatatgcgtc aggcgacctc tgaattaac aaaaaatttc 2040
cagtcacatga atttgattct gtgcgatagc gccctgtgt gttctogtta tgttgaggaa 2100
aaaaataatg gttgctaaga gattcgaact cttgcatctt acgatacctg agtattccca 2160
cagttaactg cggcgaagat atttcttgaa tcaggcgcct tagaccgctc ggccaaacaa 2220
ccaattactt gttgagaaat agagtataat taccctataa atataacggt tttgaacaca 2280
catgaacaag gaagtacagg acaattgatt ttgaagagaa tgtggatttt gatgtaattg 2340
ttgggattcc atttttaata aggcaataat attaggtatg tagatatact agaagttctc 2400
ctcgaccgtc gatatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgat 2460
caggaaattg taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaattttg ttaaatcagc 2520
tcatttttta accaataggc cgaatcggc aaaatccctt ataaatcaa agaataagacc 2580
gagatagggt tgagtgttg tccagtttg aacaagagtc cactattaa gaacgtggac 2640
tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaacctca 2700
ccctaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa cctaaaggg 2760
agccccgat ttagagcttg acggggaaag cggcgaaagc tggcgagaaa ggaagggaa 2820
aaagcgaaag gagcggcgc tagggcgtg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc 2880

ES 2 665 258 T3

accacacccg cgcgccttaa tgcgccgcta cagggcgcgt ccattcgcca ttcaggctgc 2940
 gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctgaattgga 3000
 gcgacctcat gctatacctg agaaagcaac ctgacctaca ggaaagagtt actcaagaat 3060
 aagaattttc gttttaaaac ctaagagtca ctttaaaatt tgtatacact tatttttttt 3120
 ataacttatt taataataaa aatcataaat cataagaaat tcgcttattt agaagtgtca 3180
 acaacgtatc taccaacgat ttgacccttt tccatctttt cgtaaatttc tggcaaggta 3240
 gacaagccga caaccttgat tggagacttg accaaacctc tggcgaagaa ttgttaatta 3300
 agagctcaga tcttatcgtc gtcacacctg taatccatcg atactagtgc ggccgccctt 3360
 tagttctaga aaacttagat tagattgcta tgctttcttt ctaatgagca agaagtaaaa 3420
 aaagttgtaa tagaacaaga aaaatgaaac tgaacttga gaaattgaag accgtttatt 3480
 aacttaaata tcaatgggag gtcacgaaa gagaaaaaaa tcaaaaaaaa aattttcaag 3540
 aaaaagaaac gtgataaaaa tttttattgc ctttttcgac gaagaaaaag aaacgaggcg 3600
 gtctcttttt tcttttccaa acctttagta cgggtaatta acgacacct agaggaagaa 3660
 agaggggaaa tttagtatgc tgtgcttggg tgttttgaag tggtaacggcg atgcgcggag 3720
 tccgagaaaa tctggaagag taaaaaagga gtagaaacat tttgaagcta tgagctccag 3780
 cttttgttcc ctttagtgag ggtaattgc gcgcttggcg taatcatggt catagctggt 3840
 tcctgtgtga aattgttacc cgctcacaat tccacacaac ataggagccg gaagcataaa 3900
 gtgtaaagcc tgggggtgct aatgagtgag gtaactcaca ttaattgctg tgcgctcact 3960
 gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc 4020
 ggggagaggg ggtttgcgta ttgggcgctc tcccgagctc agtttatcat tatcaatact 4080
 cgccatttca aagaatacgt aaataattaa tagtagtgat tttcctaact ttatttagtc 4140
 aaaaaattag ccttttaatt ctgctgtaac ccgtacatgc ccaaaataggg gggcgggtta 4200
 cacagaatat ataacatcgt aggtgtctgg gtgaacagtt tattcctggc atccactaaa 4260
 tataatggag cccgcttttt aagctggcat ccagaaaaaa aaagaatccc agcaccaaaa 4320
 tattgttttc ttcaccaacc atcagttcat aggtccatc tcttagcgca actacagaga 4380
 acaggggcac aaacaggcaa aaaacgggca caacctcaat ggagtgatgc aacctgcctg 4440
 gagtaaatga tgacacaagg caattgacct acgcatgtat ctatctcatt ttcttacacc 4500
 ttctattacc ttctgctctc tctgatttgg aaaaagctga aaaaaaggt tgaaaccagt 4560
 tccctgaaat tattcccta cttgactaat aagtatataa agacggtagg tattgattgt 4620
 aattctgtaa atctatttct taaacttctt aaattctact tttatagtta gtcttttttt 4680
 tagttttaaa acaccagaac ttagtttoga cggattctag actcactata gggcccgggc 4740
 gtcgacatgg aacagaagtt gatttccgaa gaagacctcg agtaagcttg gtaccgcggc 4800
 tagctaagat ccgctctaac cgaaaaggaa ggagttagac aacctgaagt ctaggtccct 4860

ES 2 665 258 T3

atttattttt ttatagttat gttagtatta agaacgttat ttatatttca aatttttctt 4920
 ttttttctgt acagacgcgt gtacgcatgt aacattatac tgaaaacctt gcttgagaag 4980
 gttttgggac gctcgaagat ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc 5040
 ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgcctgcg ctcggtcgtt 5100
 cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca 5160
 ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa 5220
 aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat 5280
 cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 5340
 cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc 5400
 gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt 5460
 tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgc 5520
 cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg 5580
 ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca 5640
 gagttcttga agtggtgcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc 5700
 gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttgta gctcttgatc cggcaaaaa 5760
 accaccgctg gtagcgggtg tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa 5820
 ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaaac 5880
 tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaceta gatccttita 5940
 aattaaaaat gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacctg gctcgacagt 6000
 taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcatccata 6060
 gttgctgac tccccgctg gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc 6120
 agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttacc agcaataaac 6180
 cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag 6240
 tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac 6300
 gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat gcttctatc 6360
 agctccggtt cccaacgatc aaggcaggtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg 6420
 gttagctcct tcggtcctcc gatcgttgc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc 6480
 atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct 6540
 gtgactgggt agtactcaac caagtcatc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc 6600
 tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgcctc 6660
 atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc 6720
 agttcgatgt aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc 6780

ES 2 665 258 T3

gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaaat aagggcgaca 6840
 cggaatggtt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt 6900
 tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt 6960
 ccgcgacat ttccccgaaa agtgccaact gaacgaagca tctgtgcttc atttttaga 7020
 acaaaaatgc aacgcgagag cgctaatttt tcaaacaaag aatctgagct gcatttttac 7080
 agaacagaaa tgcaacgcga aagcgctatt ttaccaacga agaactctgtg cttcattttt 7140
 gtaaaacaaa aatgcaacgc gagagcgcta atttttcaaa caaagaatct gagctgcatt 7200
 tttacagaac agaaatgcaa cgcgagagcg ctattttacc aacaaagaat ctatacttct 7260
 tttttgttct acaaaaatgc atccccgagag cgctattttt ctaacaaagc atcttagatt 7320
 actttttttc tcctttgtgc gctctataat gcagtctctt gataactttt tgcactgtag 7380
 gtccgttaag gttagaagaa ggctactttg gtgtctatatt tctcttccat aaaaaaagcc 7440
 tgactccact tcccgcgttt actgattact agcgaagctg cgggtgcatt tttcaagat 7500
 aaaggcatcc ccgattatat tctataccga tgtggattgc gcatactttg tgaacagaaa 7560
 gtgatagcgt tgatgattct tcattggcca gaaaattatg aacggtttct tctattttgt 7620
 ctctatatac tacgtatagg aatgtttac attttcgcat tgttttcgat tcaactctatg 7680
 aatagtctt actacaattt ttttgtctaa agagtaatac tagagataaa cataaaaaat 7740
 gtagaggctg agtttagatg caagttcaag gagcgaaagg tggatgggta ggttatatag 7800
 ggatatagca cagagatata tagcaaagag atacttttga gcaatgtttg tgaagcgggt 7860
 attcgcaata ttttagtagc tcgttacagt ccggtgcggt tttggttttt tgaagtgcg 7920
 tcttcagagc gcttttggtt ttcaaaagcg ctctgaagtt cctatacttt ctagagaata 7980
 ggaacttcgg aataggaact tcaaagcgtt tccgaaaacg agcgcctccg aaaatgcaac 8040
 gcgagctgcg cacatacagc tcaactgttca cgtcgcacct atatctgctg gttgctgta 8100
 tatatatata catgagaaga acggcatagt gcgtgtttat gcttaaagtc gtacttatat 8160
 gcgtctatatt atgtaggatg aaaggtagtc tagtacctcc tgtgatatta tcccattcca 8220
 tgccgggtat cgtatgcttc cttcagcact acccttttagc tgttctatat gctgccactc 8280
 ctcaattgga ttagtctcat ccttcaatgc tatcatttcc tttgatattg gatcatacta 8340
 agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagc cgtatcaoga ggcctttctg 8400
 tc 8402

<210> 177
 <211> 10220
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> vector

10

<400> 177

ES 2 665 258 T3

tgcgcggttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accatataca ctacgtcgtg aggccgtttc tgacagagta aaattcttga gggaaactttc 240
 accattatgg gaaatgcttc aagaaggat tgacttaaac tccatcaaat ggtcagggtca 300
 ttgagtgttt tttatttgtt gtattttttt ttttttagag aaaatcctcc aatatcaaat 360
 taggaatcgt agtttcatga ttttctgta cacctaactt tttgtgtggt gccctcctcc 420
 ttgtcaatat taatgttaaa gtgcaattct ttttccttat cactgtgagc cattagtatc 480
 aatttgctta cctgtattcc tttactatcc tcctttttct ccttcttgat aaatgtatgt 540
 agattgcgta tatagtttcg tctaccctat gaacatattc cattttgtaa tttcgtgtcg 600
 tttctattat gaatttcatt tataaagttt atgtacaaat atcataaaaa aagagaatct 660
 ttttaagcaa ggattttctt aacttcttcg gcgacagcat caccgacttc ggtggtactg 720
 ttggaaccac ctaaatcacc agttctgata cctgcatcca aaacctttt aactgcatct 780
 tcaatggcct taccttcttc aggcaagttc aatgacaatt tcaacatcat tgcagcagac 840
 aagatagtgg cgatagggtc aaccttattc tttggcaaat ctggagcaga accgtggcat 900
 ggttcgtaca aaccaaagtc ggtgttcttg tctggcaaag aggccaaagga cgcagatggc 960
 aacaaaccca aggaacctgg gataacggag gcttcatcgg agatgatata accaaacatg 1020
 ttgctgggtg ttataatacc atttaggtgg gttgggttct taactaggat catggcggca 1080
 gaatcaatca attgatgttg aaccttcaat gtagggaatt cgttcttgat ggttctcctc 1140
 acagtttttc tccataatct tgaagaggcc aaaagattag ctttatccaa ggaccaata 1200
 ggcaatgggt gctcatgttg tagggccatg aaagcggcca ttctgtgat tctttgact 1260
 tctggaacgg tgtattgttc actatcccaa gcgacaccat caccatcgtc ttcctttctc 1320
 ttaccaaagt aaatacctcc cactaattct ctgacaacaa cgaagtcagt acctttagca 1380
 aattgtggct tgattggaga taagtctaaa agagagtcgg atgcaaagtt acatggtctt 1440
 aagttggcgt acaattgaag ttctttacgg atttttagta aaccttggtc aggtctaaca 1500
 ctaccggtac cccatttagg accaccaca gcaacctaca aaacggcatc agccttcttg 1560
 gagccttcca gcgcctcatc tggaaagtga acacctgtag catcgatagc agcaccacca 1620
 attaaatgat tttcgaaatc gaacttgaca ttggaacgaa catcagaaat agctttaaga 1680
 acctaatag cttcggtgtg gatttcttga ccaacgtggt cacctggcaa aacgacgatc 1740
 ttcttagggg cagacattag aatggtatat ccttgaaata tatatatata tattgctgaa 1800
 atgtaaaag taagaaaagt tagaaagtaa gacgattgct aaccacctat tggaaaaaac 1860
 aataggtcct taataaatat tgtcaacttc aagtattgtg atgcaagcat ttagtcatga 1920

ES 2 665 258 T3

acgcttctct attctatatg aaaagccggt tccggcgctc tcaoctttcc tttttctccc 1980
 aatttttcag ttgaaaaag tatatgcgctc aggcgacctc tgaattaac aaaaaatttc 2040
 cagtcacoga atttgattct gtgcgatagc gccctgtgt gttctcgta tgttgaggaa 2100
 aaaaaaatg gttgctaaga gattcgaact cttgcatctt acgatacctg agtattccca 2160
 cagttaactg cggtaagat atttcttgaa tcaggcgctc tagaccgctc gcccaaacia 2220
 ccaattactt gttgagaaat agagtataat taccctataa atataacgtt tttgaacaca 2280
 catgaacaag gaagtacagg acaattgatt ttgaagagaa tgtggatttt gatgtaattg 2340
 ttgggattcc atttttaata aggcaataat attaggtatg tagatatact agaagttctc 2400
 ctgcaccgctc gatatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat 2460
 caggaaattg taaacgtaa tattttgta aaattcgcgt taaatttttg ttaaatcagc 2520
 tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc 2580
 gagatagggg tgagtgttgt tccagtttg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 2640
 tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat caggcgatg gccactacg tgaacatca 2700
 ccctaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa ccctaaaggg 2760
 agccccgat ttagagcttg acgggaaaag ccggcgaacg tggcgagaaa ggaagggaag 2820
 aaagcgaaag gagcgggccc tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc 2880
 accacacccc ccgcgcttaa tgcgcgcta caggcgcgct ccattcgcca ttcagctgc 2940
 gcaactgttg ggaaggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctgaattgga 3000
 gcgacctcat gctatacctg agaaagcaac ctgacctaca ggaaagagtt actcaagaat 3060
 aagaattttc gttttaaac ctaagagtca ctttaaaatt tgtatacact tatttttttt 3120
 ataacttatt taataataaa aatcataaat cataagaaat tcgcttattt agaagtgtca 3180
 acaacgtatc taccaacgat ttgacccttt tccatctttt cgtaaatttc tggcaaggta 3240
 gacaagccga caaccttgat tggagacttg accaaacctc tggcgaagaa ttgttaatta 3300
 agagctcaga tctctacttc ttatttaoct ctcttctttg tctcactgca gcagccaact 3360
 ttctaagaac atcttcagta gtttccatc caatacaggc atctgtaatg gaaacacogt 3420
 atttcaagcc tgccttgccc tcagcaggaa taccttgatt tccctcattg atattcgatt 3480
 cgatcatgac accagttatt gcgttttcac cgtttcgat ttgttcacaa acaacgtcgt 3540
 taacttttag ctgatttctg aaatccttat tactattgcc atgagagtag tcaatcatta 3600
 aaccattcga accagcagg tttgtgcct tagcctcagc gacggattta gcgtcataat 3660
 tggtaacctt ctttcgcct cttaataata caaagcaatg ttcggtgcct tttgtagttg 3720
 tgattgctgc aacaccgtgt aaagttacac ccatgaaatg atgagaatgg gcagctgctt 3780
 gacaggcatc cacagcaaca tttagagtac cgtcggatc atttttgag ccaacagga 3840
 aagacaaacc agaggccaat tctctatgaa gttgagactc cgttgttcta gcgcctattg 3900

ES 2 665 258 T3

cgccgaaact aacaagatcg gctaggtatt gagggctgat ggtatctaac atttctgaac 3960
 caataggtag acogatgttg gtcaaattga cgaaaagttg tctagccgat tgcaatccct 4020
 tgттаататт гааггтгтта ттааcatcag gatcgттаат тааacctttc caaccaacag 4080
 tagttcttg tttttccagg тааgctctca ttattatoga cagatctcct ttcaatcct 4140
 cgctcaactt tttcaatctc aaagcatatt cttgggoggc ttccaaatca tgaattgaac 4200
 atggtcctac tatcactagc actctatcat ctttaccagt аатgatatca atagcttctc 4260
 tcctacctct tttggcagtc tctaaggaag taggagtggc ggggatttgc acttgtagta 4320
 atgctggact tgctaатgga tcatagccta gtattctcac gtcttcttca gcacctgat 4380
 таaccttagg catacattg goggcaaaaca ttggagactc tgacatcggc cgcccttag 4440
 ttctagaaaa cttagattag attgctatgc tttctttcta atgagcaaga agtaaaaaaa 4500
 gttgтаатag aacaagaaaa atgaaactga aacttgagaa attgaagacc gtttattaac 4560
 ттааататca atgggaggtc atcgaaagag aaaaaaatca aaaaaaaat tttcaagaaa 4620
 aagaaacgtg ataaaaattt ttattgcctt tttcgacgaa gaaaaagaaa cgaggcggtc 4680
 tctttttct tttccaaacc tttagtacgg gтааттааcг acacctaga ggaagaaaga 4740
 ggggaaattt agtatgctgt gcttgggtgt tttgaagtgg таcggcgatg cgcggagtcc 4800
 gagaaaatct ggaagagtaa aaaaggagta gaaacatttt gaagctatga gctccagctt 4860
 ttgttccctt tagtgagggt таattgcgcg cttggcgtaa tcatggctcat agctgtttcc 4920
 tgtgtgaaat tgttatcgc tcacaattcc acacaacata ggagccggaa gcataaagtg 4980
 таааgсctgg ggtgcctaат gagtgaggta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc 5040
 cgctttccag togggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg 5100
 gagaggcggт ttgcgtattg ggcgctcttc cgagctcagt ttatcattat caatactcgc 5160
 catttcaaag aatacgtaaa тааттаатag tagtgatttt cctaacttta tttagtcaaa 5220
 aaattagcct ттааттctg ctgтааcccg tacatgcca ааатaggggg cgggttacac 5280
 agaatataata acatcgtagg tgtctgggtg аacagtttat tcttgcatc cactaaatat 5340
 аатggagccc gctttttaag ctggcatcca gaaaaaaaaa gaatcccagc accaaaaat 5400
 tgttttcttc accaaccatc агttcatagg tccattctct tagcgcaact acagagaaca 5460
 ggggcacaaa caggcaaaaa acgggcacaa cctcaatgga gtgatgcaac ctgcctggag 5520
 тааатgatga cacaaggcaa ttgaccacg catgtatcta tctcattttc ttacacctc 5580
 tattaccttc tgctctctct gatttgгaaа аagctgaaaa aaaaggttga аaccagttcc 5640
 ctgaaattat tcccactct gactaataag tatataaaga cggtaggtat tgattgтаат 5700
 tctgтааатc таттcttaa acttcttaaа ttctactttt atagttagtc ttttttttag 5760
 тtttaaaaca ccagaactta gtttegacgg attctagact cactataggg cccgggcgtc 5820

ES 2 665 258 T3

gacatggatt ttacaaagcc agaaacgggt ttaaacctac aaaatattag agatgaattg 5880
gtgaggatgg aagacagtat tttttttaa ttcatagaaa gaagccattt tgccacatgc 5940
ccaagtgttt acgaagctaa tcaccctgga ttagagattc caaattttaa aggctcgttt 6000
ttggactggg cattgagtaa tcttgagata gcacattcta ggatcagaag atttgaatcc 6060
ccagatgaga cccattctt cccagacaag attcaaaaat catttcttcc ttcaattaat 6120
tacctcaaa tcttggcacc atatgctcca gaagtaaact acaatgataa gataaagaag 6180
gtttatattg aaaagataat acccctgata tctaagaggg atggagatga caagaacaat 6240
tttcatccg ttgcaactag agacattgag tgtctacaat cgttgtctag aagaatacat 6300
tttgtaaat ttgttgacaga ggctaaattt caatctgata tacctttgta cactaaatta 6360
attaaagta aggatgtaga aggaattatg aaaaataaa caaattctgc tgtggaagag 6420
aaaatcttag aaagattgac taaaaaggct gaagtttacg gtgttgatcc aaccaacgaa 6480
tctggtgaaa ggaggattac tccogaatat ttggttaaaa tatataaaga aattgtaata 6540
cccattacaa aagaagtaga ggttgaatat ctattgagaa gattggaaga atgactcgag 6600
taagcttggc accgcggcta gctaagatcc gcttaaccg aaaaggaagg agttagacaa 6660
cctgaagtct aggtccctat ttatTTTTT atagttatgt tagtattaag aacgttatTT 6720
atatttcaaa ttttctttt ttttctgtac agcgcgtgt acgcatgtaa cattatactg 6780
aaaaccttgc ttgagaaggt tttgggacgc tcgaagatcc agctgcatta atgaatcggc 6840
caacgcgcgg ggagagggcg tttgcgtatt gggcgcctct ccgcttctc gctcactgac 6900
tcgctgcgct cggctcgttc gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaaa ggcggtaata 6960
cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa 7020
aaggccagga accgtaaaaa ggcgcgcttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct 7080
gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa 7140
agataccagg cgtttccccc tggagactcc ctctgctgct ctctgttcc gaccctgccg 7200
cttaccggat acctgtccgc ctttctcct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca 7260
cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa 7320
cccccgttc agcccgaccg ctgogcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg 7380
gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 7440
tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtgccta actacggcta cactagaagg 7500
acagtatttg gtatctgccc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggttagc 7560
tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgttg caagcagcag 7620
attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac 7680
gctcagtgga acgaaaactc acgtaaggg attttggcca tgagattatc aaaaaggatc 7740
ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga agttttaaT caatctaaag tatatatgag 7800

ES 2 665 258 T3

taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt 7860
 ctatttcggt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag 7920
 ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca 7980
 gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact 8040
 ttatccgctt ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca 8100
 gttaatagtt tgcccaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg 8160
 tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc 8220
 atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg 8280
 gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcaactgcata attctcttac tgtcatgcca 8340
 tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt 8400
 atgcggcgac cgagttgctc ttgccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc 8460
 agaactttaa aagtgtcat cattgaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc 8520
 ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca 8580
 tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa 8640
 aaggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat 8700
 tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa 8760
 aataaacaaa taggggttcc ggcacattt ccccgaaaag tgccacctga acgaagcatc 8820
 tgtgcttcat tttgtagaac aaaaatgcaa cgcgagagcg ctaatttttc aaacaaagaa 8880
 tctgagctgc atttttacag aacagaaatg caacgcgaaa gcgctatttt accaacgaag 8940
 aatctgtgct tcatttttgt aaaacaaaaa tgcaacgcga gagcgctaat ttttcaaca 9000
 aagaatctga gctgcatttt tacagaacag aaatgcaacg cgagagcgct attttaccaa 9060
 caaagaatct atacttcttt tttgttctac aaaaatgcat cccgagagcg ctatttttct 9120
 aacaaagcat cttagattac tttttttctc ctttgtgctc tctataatgc agtctcttga 9180
 taacttttg cactgtaggt ccgttaaggt tagaagaagg ctactttggt gtctattttc 9240
 tcttcataa aaaaagcctg actccacttc ccgcgtttac tgattactag cgaagctgctg 9300
 ggtgcatttt ttcaagataa aggcaccccc gattatattc tataccgatg tggattgctc 9360
 atactttgtg aacagaaagt gatagcgttg atgattcttc attggtcaga aaattatgaa 9420
 cggtttcttc tattttgtct ctatatacta cgtataggaa atgtttacct tttcgtattg 9480
 tttcogattc actctatgaa tagttcttac tacaattttt ttgtctaaag agtaatacta 9540
 gagataaaca taaaaaatgt agaggtcgag tttagatgca agttcaagga gcgaaaggtg 9600
 gatgggtagg ttatataggg atatagcaca gagatatata gcaaagagat acttttgagc 9660
 aatgtttgtg gaagcgggat tcgcaatatt ttagtagctc gttacagtcc ggtgcgtttt 9720

ES 2 665 258 T3

tggttttttg aaagtgcgtc ttcagagcgc ttttggtttt caaaagcgc ctgaagtcc 9780
 tatactttct agagaatagg aacttcggaa taggaacttc aaagcgtttc cgaaaacgag 9840
 cgcttccgaa aatgcaacgc gagctgcgca catacagctc actgttcacg tcgcacctat 9900
 atctgcgtgt tgctgtata tatatataca tgagaagaac ggcatagtgc gtgtttatgc 9960
 ttaaatgcgt acttatatgc gtctatztat gtaggatgaa aggtagtcta gtacctcctg 10020
 tgatattatc ccattccatg cggggtatcg tatgcttctc tcagcactac ccttttagctg 10080
 ttctatatgc tgccactcct caattggatt agtctcatcc ttcaatgcta tcatttcctt 10140
 tgatattgga tcatactaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg 10200
 tatcacgagg ccctttcgtc 10220

<210> 178
 <211> 9668
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> vector

10

<400> 178
 tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accataaatt cccgttttaa gagcttggtg agcgc tagga gtcactgccca ggtatcgttt 240
 gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt cccgcaattt tctttttcta 300
 ttactcttgg cctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa tgattttcat 360
 tttttttttt ccctagcgg atgactcttt ttttttctta gcgattggca ttatcacata 420
 atgaattata cattatataa agtaatgtga tttcttcgaa gaatatacta aaaaatgagc 480
 aggcaagata aacgaaggca aagatgacag agcagaaagc cctagtaaag cgtattacaa 540
 atgaaaccaa gattcagatt gcgatctctt taaaggggtg tcccctagcg atagagcact 600
 cgatcttccc agaaaaagag gcagaagcag tagcagaaca ggccacacaa tcgcaagtga 660
 ttaacgtcca cacaggtata gggtttctgg accatatgat acatgctctg gccaaagcatt 720
 ccggctggtc gctaactcgtt gagtgcattg gtgacttaca catagacgac catcacacca 780
 ctgaagactg cgggattgct ctcggtaag cttttaaaga ggccctactg gcgcgtggag 840
 taaaaagggt tggatcagga tttgcgcctt tggatgaggc actttccaga gcggtggtag 900
 atctttogaa caggccgtac gcagttgtcg aacttggttt gcaaaggag aaagtaggag 960
 atctctcttg cgagatgatc ccgcattttc ttgaaagctt tgcagaggct agcagaatta 1020
 ccctccacgt tgattgtctg cgaggcaaga atgatcatca ccgtagtgag agtgcgttca 1080
 aggcctcttg ggttgccata agagaagcca cctcgcctca tggtagcacc gatgttccct 1140

ES 2 665 258 T3

ccaccaaagg tgttcttatg tagtgacacc gattatthaa agctgcagca tacgatatat 1200
 atacatgtgt atatatgtat acctatgaat gtcagtaagt atgtatacga acagtatgat 1260
 actgaagatg acaaggtaat gcatcattct atacgtgtca ttctgaacga ggcgcgcttt 1320
 ccttttttct ttttgctttt tctttttttt tctcttgaac tcgacggatc tatgcggtgt 1380
 gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggaaattgta aacgtaata 1440
 ttttgthaaa attcgcgtta aatthttgtt aaatcagctc atthtttaac caataggccg 1500
 aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gataggggtg agtgthgttc 1560
 cagthtgaa caagatcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaa gggcgaaaaa 1620
 cgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt thtttggtt 1680
 cgaggtgccc taaagcacta aatcggaaacc ctaaaggag ccccgattt agagcttgac 1740
 ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaagga gggggcgcta 1800
 gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg 1860
 cgccgctaca gggcgctcg cgccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 1920
 gatcgggtcg ggcctcttcg ctattacgcc agctgaattg gagcgacctc atgctatacc 1980
 tgagaaagca acctgacctc caggaaagag ttactcaaga ataagaattt tctthttaa 2040
 acctaaagt cactthaaaa thgtatata cthththth thataactta thtaataata 2100
 aaaatcataa atcataagaa attcgttat thagaagtgt caacaacgta tctaccaacg 2160
 atthgacctc thccatctt thcgtaaatt tctggcaagg tagacaagcc gacaacctg 2220
 atthgagact tgaccaaacc tctggcgaag aatthttaat taagagctca gatcttatcg 2280
 tctctatcct tgtaatccat cgatactagt tcattagthta gtgacagtht gaacagagth 2340
 taacaccact gthtcaattg thaaagccagg accgaaacca aatagaacac cccaatctaa 2400
 accttctccg gthgtggctt thtaccctt thaaagactc thcctcatct catctagaat 2460
 gaataaaaag caggcagagc tcatgthtgc atactctgat agaacgtgth thgtagcttc 2520
 caactthth thctctaagt thagththtgc ctccactcg thtaaaattg ctggaccacc 2580
 thgatgagca atccaaaaca atgagthtcca gthcgttatg ccaatgggt caaaggctth 2640
 agthaaagat ththogatgt ththctgaaat thagththgg acatthaggc acaaatgaaa 2700
 agthaaacca actthctctca agththctgc ththgaccg gcggaattth gaataaaaag 2760
 thgagcagca gaaaactaatt gaaatagthg ththtcaatg gacacatcag gatcgtgccc 2820
 thaaattacg gcggaagatc catcgccaaa caatgcttht ccgaccaaaac thtctagagc 2880
 atctthctgat ggacctctga aagthacgac agthgattth ctgcagacga ctaaaacct 2940
 agcaccggcg ththththctg ccaaatctt agcagthctc agcactgtac ctccggcgta 3000
 acaacctthg thgatacaaca thactcttct aacagagthc thtaatccca atagththtgc 3060

ES 2 665 258 T3

tagttataa	tcagcacctg	gcatttcgac	accggaagtt	gtacagaaaa	ccaaatgtgt	3120
aatcttagat	tttggttgtc	cccattcctt	taaagctttc	aaggctgcgt	ctctacctag	3180
tctaggtacc	tcggctgtta	tgatttcttg	tctaataatc	aaagatggtg	ccatataatg	3240
acctatattt	ggatgttctc	ctaacatttc	ttcagttaga	tgatgtatc	ttttctttat	3300
catagattta	tcacaaaatc	tattaaactt	tttcttaagt	tctgtcatat	gttcactttt	3360
agttactctg	aaatagtaat	cagcgtaatc	agattgataa	acacagtgat	caggggtggc	3420
tgttccaata	gccaatatgg	ttgctggacc	ttttgccctc	tgtgcatttc	tgaactcctc	3480
tacggatgcc	atgaattctc	tagaatccgt	cgaactaag	ttctgggtgt	ttaaaactaa	3540
aaaaaagact	aactataaaa	gtagaattta	agaagtttaa	gaaatagatt	tacagaatta	3600
caatcaatac	ctaccgtctt	tatatactta	ttagtcaagt	aggggaataa	tttcagggaa	3660
ctggtttcaa	cctttttttt	cagctttttc	caaatcagag	agagcagaag	gtaatagaag	3720
gtgtaagaaa	atgagataga	tacatgcgtg	ggtcaattgc	cttgtgtcat	catttactcc	3780
aggcaggttg	catcactcca	ttgaggttgt	gcccgttttt	tgcctgtttg	tgcccctggt	3840
ctctgtagtt	gogctaagag	aatggacctt	tgaactgatg	gttgggtgaag	aaaacaatat	3900
tttggtgctg	ggattctttt	tttttctgga	tgccagctta	aaaagcgggc	tccattatat	3960
ttagtggatg	ccaggaataa	actgttcacc	cagacacctt	cgatgttata	tattctgtgt	4020
aaccgcctcc	ctattttggg	catgtacggg	ttacagcaga	attaaaaggc	taattttttg	4080
actaaataaa	gttaggaaaa	tcactactat	taattattta	ogtattcttt	gaaatggcga	4140
gtattgataa	tgataaactg	agctcgggaag	agcgcoccat	acgcaaaccg	cctctccccg	4200
cgcgttggcc	gattcattaa	tcagcctggc	acgacaggtt	tcccactggg	aaagcgggca	4260
gtgagcggca	cgcaattaat	gtgagttacc	tcactcatta	ggcaccocag	gctttacact	4320
ttatgcttcc	ggctcctatg	ttgtgtggaa	ttgtgagcgg	ataacaattt	cacacaggaa	4380
acagctatga	ccatgattac	gccaagcgcg	caattaaccc	tcactaaagg	gaacaaaagc	4440
tggagctcat	agcttcaaaa	tgtttctact	ccttttttac	tcttccagat	tttctcggac	4500
tccgcgcctc	gccgtaccac	ttcaaaacac	ccaagcacag	catactaaat	ttcccctctt	4560
tcttctctca	gggtgtcgtt	aattaccogt	actaaagggt	tggaaaagaa	aaaagagacc	4620
gcctcgtttc	tttttctctg	tcgaaaaagg	caataaaaat	ttttatcacg	tttctttttc	4680
ttgaaaattt	tttttttgat	tttttctctt	ttcogatgac	tcccattgat	atttaagtta	4740
ataaacggtc	ttcaatttct	caagtttcag	tttcaatttt	cttgttctat	tacaactttt	4800
tttacttctt	gctcattaga	aagaaagcat	agcaatctaa	tctaagtttt	ctagaggatc	4860
catggcttct	gttgaagaaa	ttagaaatgc	tcaaagagct	aaaggtccag	ctactatttt	4920
ggctattggg	actgctactc	cagatcattg	tgtttaccaa	tctgattacg	ctgattacta	4980
cttcagagtt	actaagtctg	aacatattgac	tgaattgaag	aaaaagttca	acagaatttg	5040

ES 2 665 258 T3

tgataaatct atgatcaaga aaagatacat ccatttgact gaagaaatgt tggaagaaca	5100
tccaaacatc ggtgcttaca tggctccatc tttgaacatc agacaagaaa tcatcactgc	5160
tgaagtcca aagttgggta aagaagctgc tttgaaagct ttgaaagaat ggggtcaacc	5220
aaaatctaaa attactcatt tggttttctg tactacttct ggtggtgaaa tgccaggtgc	5280
tgattataaa ttggctaatt tgttgggttt ggaaacttct gttagaagag ttatggtgta	5340
tcatcaaggt tgttatgctg gtggtactgt tttgagaact gctaaagatt tggctgaaaa	5400
taatgctggt gctagagttt tggttgtttg ttctgaaatt actggtgta cttttagagg	5460
tccatctgaa gatgcttttg attctttggt tggcaagct ttgtttggtg acggttctgc	5520
tgctgttatt gttggttctg atccagatat ttctattgaa agaccattgt ttcaattggt	5580
ttctgctgct caaactttta ttccaaattc tgctggtgct attgctggtta attgagaga	5640
agttggttg actttccatt tgtggccaaa cgttccaact ttgatctctg aaaacatcga	5700
aaactgttg actaaggctt togatccaat cggtatctct gattggaact ctttgtttg	5760
gattgctcat ccaggtggtc cagctatttt ggatgctggt gaagctaaag ttggtttgga	5820
taagcaaaag ttgaaggcta ctagacatat cttgtctgaa tacggtaca tgtcttctgc	5880
ttgtgtttg tttattttg atgaaatgag aaagaaatct ttgaaggaag gtaaaactac	5940
tactggtgaa ggttggtt ggggtgttt gtttggtttt ggtccaggtt tgactattga	6000
aactggtgtt ttgcattctg ttggtactga ttctaattaa tgactcgagt aagcttggtta	6060
ccgcggtag ctaagatccg ctctaaccga aaaggaagga gttagacaac ctgaagtcta	6120
ggtccctatt tattttttta tagttatggt agtattaaga acgttattta tatttcaaat	6180
ttttctttt tttctgtaca gacgcgtgta cgcattgtaac attatactga aaacctgct	6240
tgagaagggt ttgggacgct cgaagatcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgctg	6300
gagagcggt ttgcgtattg ggcgctctc cgttccctc ctcactgact cgctgcgctc	6360
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaaag gcggtatac ggttatccac	6420
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	6480
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgtttt ccataggctc cgtccctctg acgagcatca	6540
caaaaatcga cgtcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc	6600
gtttccctt ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgcctc ttaccggata	6660
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgcttct catagctcac gctgtaggta	6720
tctcagttcg gtgtaggtcg ttctctcaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca	6780
gcccagccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaaccctg taagacacga	6840
cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtta caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg	6900
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg	6960

ES 2 665 258 T3

tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	7020
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	7080
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa	7140
cgaaaactca cgtaagga ttttggtcag gagattatca aaaaggatct tcacctagat	7200
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc	7260
tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc	7320
atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc	7380
tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc	7440
aataaaccag ccagccgaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc	7500
catccagtct attaattggt gcgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt	7560
gcgcaacggt gttgccattg ctacagggat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc	7620
ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccc tgttgtgcaa	7680
aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgcaga agtaagttgg ccgcagtgtt	7740
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg	7800
cTTTTctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc	7860
gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa	7920
agtgtcatc attgaaaaac gttcttcggy gcgaaaaactc tcaaggatct taccgctgtt	7980
gagatccagt togatgtaac cactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt	8040
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa agggaataag	8100
ggcgacacgg aatggtgaa tactcactact cttccttttt caatattatt gaagcattta	8160
tcagggttat tgtctcatga gcgatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat	8220
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgaa cgaagcatct gtgcttcatt	8280
ttgtagaaca aaaatgcaac gcgagagcgc taatttttca aacaaagaat ctgagctgca	8340
tttttacaga acagaaatgc aacgcgaaag cgtatttta ccaacgaaga atctgtgctt	8400
catttttgta aaacaaaaat gcaacgcgag agcgttaatt tttcaacaa agaatctgag	8460
ctgcattttt acagaacaga aatgcaacgc gagagcgcta ttttaccac aaagaatcta	8520
tacttctttt ttgttctaca aaaaatgcac ccgagagcgc tatttttcta acaaagcatc	8580
ttagattact tttttctcc tttgtgcgct ctataatgca gtctcttgat aactttttgc	8640
actgtaggtc cgttaagggt agaagaagc tactttggtg tctattttct cttccataaa	8700
aaaagcctga ctccacttcc cgcgtttact gattactagc gaagctgcgg gtgcattttt	8760
tcaagataaa ggcaccccg attatattct ataccgatgt ggattgcgca tactttgtga	8820
acagaagtg atagcgttga tgattcttca ttggtcagaa aattatgaac gttttcttct	8880
atTTgtctc tatatactac gtataggaaa tgtttacatt ttcgtattgt tttcgattca	8940

ES 2 665 258 T3

ctctatgaat agttcttact acaatTTTTT tgtctaaaga gtaatactag agataaacat 9000
 aaaaaatgta gaggtcgagt ttagatgcaa gttcaaggag cgaaaggtagg atgggtaggt 9060
 tatatagggga tatagcacag agatatatag caaagagata cttttgagca atgtttgtgg 9120
 aagcgggtatt cgcaatattt tagtagctcg ttacagtccg gtgcgttttt ggTTTTTTga 9180
 aagtgcgtct tcagagcgct tttggTTTTc aaaagcgctc tgaagttcct atactttcta 9240
 gagaatagga acttcggaat aggaacttca aagcgtttcc gaaaacgagc gcttccgaaa 9300
 atgcaacgcg agctgcgcac atacagctca ctgttcacgt cgcacctata tctgcgtggt 9360
 gcctgtatat atatatacat gagaagaacg gcatagtgcg tgtttatgct taaatgcgta 9420
 cttatatgcg tctatttatg taggatgaaa ggtagtctag tacctcctgt gatattatcc 9480
 cattccatgc ggggtatcgt atgcttcctt cagcactacc ctttagctgt tctatatgct 9540
 gccactcctc aattggatta gtctcatcct tcaatgctat catttccttt gatattggat 9600
 catctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc 9660
 ctttcgtc 9668

<210> 179
 <211> 13130
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> vector

10

<400> 179
 tcgCGCGTtt cggTgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccG gagacggTca 60
 cagctTgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccG tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accataccac agcttttcaa ttcaattcat cttttttttt ttattctttt ttttgatttc 240
 ggtttctttg aaatTTTTTt gattcggtaa tctccgaaca gaaggaagaa cgaaggaagg 300
 agcacagact tagattggtat tatatacgca tatgtagtgt tgaagaaaca tgaaattgcc 360
 cagtattcctt aaccCaactg cacagaacaa aaacctgcag gaaacgaaga taaatcatgt 420
 cgaaagctac atataaggaa cgtgctgcta ctcatcctag tcctgttgct gccagctat 480
 ttaatatcat gcacgaaaag caaacaact tgtgtgcttc attggatggt cgtaccacca 540
 aggaattact ggagttagtt gaagcattag gtcccaaat ttgtttacta aaaacacatg 600
 tggatatcctt gactgatttt tccatggagg gcacagttaa gccgctaaag gcattatccg 660
 ccaagtacaa ttttttactc ttcgaagaca gaaaatttgc tgacattggt aatacagtca 720
 aattgcagta ctctgcgggt gtatacagaa tagcagaatg ggcagacatt acgaatgcac 780
 acggtgtggt gggcccaggT attgTtagcg gtttgaagca ggcggcagaa gaagtaacaa 840

ES 2 665 258 T3

aggaacctag aggccttttg atggttagcag aattgtcatg caagggctcc ctatctactg 900
 gagaatatac taagggtact gttgacattg cgaagagcga caaagatttt gttatcggtc 960
 ttattgctca aagagacatg ggtggaagag atgaaggta cgattggttg attatgacac 1020
 ccggtgtggg tttagatgac aaggagacg cattgggtca acagtataga accgtggatg 1080
 atgtggtctc tacaggatct gacattatta ttggtggaag aggactatth gcaaaggaa 1140
 gggatgctaa ggtagagggt gaacgttaca gaaaagcagg ctggaagca ttttgagaa 1200
 gatgcccga gcaaacgct tgtaaaaatt ggthttcttc tttgtctcat tttgttattc 1260
 atttgtaaaa aactgtatta taagtaaatg catgtatact aaactcacia attagagctt 1320
 caatttaatt atatcagta ttaccctatg cgggtgtaaa taccgcacag atgcgtaagg 1380
 agaaaatacc gcatcaggaa attgtaaacg ttaatattht gttaaaattc gcgttaaatt 1440
 tttgttaaat cagctcattt ttaaccaat aggcgaaat cggcaaaatc ccttataaat 1500
 caaaagaata gaccgagata gggttgagtg ttgthccagt ttggaacaag agtccactat 1560
 taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc gaaaaacgt ctatcagggc gatggcccac 1620
 tacgtgaacc atcaccctaa tcaagthttt tggggctgag gtgcccgtaaa gcaactaaatc 1680
 ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg aacgtggcga 1740
 gaaaggaag gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt gtagcggta 1800
 cgtgctcgt aaccaccaca cccgccgcg ttaatgcgcc gctacagggc gcgtccattc 1860
 gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcggtg cgggcctctt cgtattacg 1920
 ccagctgaat tggagcgacc tcatgctata cctgagaag caacctgacc tacaggaaag 1980
 agttactcaa gaataagaat tttcgtthta aaacctaa gaactthta aatttgata 2040
 cacttattth tttataact tatttaataa taaaaatcat aaatcataag aaattcgctt 2100
 atttagaagt gtcaacaacg tatctacca cgatttgacc cthttccatc tthttcgtaa 2160
 tthttggcaa ggtagacaag ccgacaacct tgattggaga cttgaccaa cctctggcga 2220
 agaattgtha attaagagct cagatcttag cagattgga taggtgcacc attccactct 2280
 ttcaagcaat ccataagtgg atctatcaac thtccctcgc acatagctgt gaatacctg 2340
 tcaaattctt cacctgggct aacgacttht tcaccagtha gtaatttgg tcccaactct 2400
 tctctaacga atctgtacaa agggtagcgc ctacactctt tgattctatt tggtagagg 2460
 gcagtaccat thccgtatgc ggctctagca gcttcgactt cthttggtaa aactgccttc 2520
 agthctctt caaaggcacc tatctthttg aatattgaag taacggcatt thtctcagtt 2580
 tcaccattgg ataaagcgtg atctacaata acttgctca atctctgcat caatggataa 2640
 gtagcgtac atggatcgtc aacgtaagta aatcttgtt ctctatctac aactthtaat 2700
 aaatcttht cacagaatct tgatgggtgc aatcaccat tgatacctgt agttagaacc 2760
 thttthgcaa cctgtgatac ggtatthttc actgtctgtc tcaaattctc thccaagtgt 2820

ES 2 665 258 T3

ctcaaacta cggcctggca tatacccact aaaaatggtg tggacattaa ttttaaggata 2880
 tcaacggcct cgcttgthtt tcttgatgaa atcaggccca aagaattaac atcctgattg 2940
 tgttgttcgg ctgattgtac atgagaggtt actggggttg ctagatattg cagctctgaa 3000
 caatagcttg ccattgctat ctccagcacct ttgaaacat aatcaagact agggttagaa 3060
 gatgcggtca gattcgaagg caaacggtta ttgtagaagt cattgaccaa ttcagaaaat 3120
 tgggcaaaca ttaatttgcc aattgcggct atggcaagcc tggattatc catactgact 3180
 cctatgggtg taccctggaa attgcctcca tgtattgcct tattcctcga cacatcaata 3240
 agtggattat cgtaacaga gttgatctct ctttctatag actttgtagc ttgtctaatt 3300
 acttcaattt gagggccaag ccattgtggg gatgtcctta aagcatatct atcttgtttg 3360
 ggtttttgca aagggtccat ttcattgaacc ttctgggcta acttcatgta gctagagccg 3420
 tccaaaatgt gctccatgat agctgctgct tcaatttctc ctgggtgatg ttttaacctg 3480
 tgggtcaagt gatcagtaaa ctccaggttt cactcatga ctccggcaaa aattgcggac 3540
 aaaacttogg ccaaaactgc ttgtacgtta gcttcaaaca acaccatgga tgccataccg 3600
 ctgccgacag cgggtgccatt caccagggtt aaaccttctt tggggtgcaa atcaaagaaa 3660
 ccagttgaaa taccagcttt ctcaaagtct tccttagcgg ttaaggattc tccgtctgga 3720
 ccagtgccct ttgaattagg tcttcccggt aataagcctg cgatatatga aaggggaacc 3780
 aatcacccgc tggcagttat tgttctctt aagggaacg aaggagaaat gttgtggttc 3840
 aatagtgaag tgatggcctc aagaatttca aaccttattc cagagtaacc ttgcaacaaa 3900
 gtgttcaacc taacaagcat agcagctctt gttgccgatt ggggtaagt atggcaagtt 3960
 tcctttgtat taccgaaaat accggcggtta aggaatctga tcagttctgt ttgcaaagca 4020
 gtgccatttt tagttcttct atgagaggtg gcaccaaagc ctgtggtaac gccataggaa 4080
 tctgtgccct tgttcatact ttccatgacc caatctgatg aagcctaac tccggctcta 4140
 cttgtttctg caagttctac ctccactgaa ccgccaacgg tcgaaatagc agctacctgt 4200
 cctatcgtca atgtctcggc gcctagattt acgactggtc ttctgtatto ctcaaccatc 4260
 ttcttaactt catccagatg gctaccttct atctggctag ctgccagacc ccaattcaaa 4320
 ggatctgcaa gagtttttgt cgttacggcc accttggctt tttcaccacc accgcatagc 4380
 attgctcaa tttggtccat tttgtatcta gaatccgtcg aaactaagtt ctggtgtttt 4440
 aaaactaaaa aaaagactaa ctataaaagt agaatttaag aagtttaaga aatagattta 4500
 cagaattaca atcaatacct accgtcttta tatacttatt agtcaagtag ggaataaatt 4560
 tcagggaaact ggtttcaacc tttttttcca gctttttcca aatcagagag agcagaaggt 4620
 aatagaaggt gtaagaaaat gagatagata catgctggg tcaattgcct tgtgtcatca 4680
 tttactccag gcaggttgca tcactccatt gaggtgtgc ccgttttttg cctgtttgtg 4740

ES 2 665 258 T3

cccctgttct ctgtagttgc gctaagagaa tggacctatg aactgatggt tggatgaagaa 4800
 aacaatattt tggtagctggg attctttttt tttctggatg ccagcttaaa aagcgggctc 4860
 cattatattt agtggatgcc aggaataaac tgttcaccca gacacctacg atgttatata 4920
 ttctgtgtaa cccgccccct attttgggca tgtacgggtt acagcagaat taaaaggcta 4980
 attttttgac taaataaagt taggaaaatc actactatta attatttacg tattctttga 5040
 aatggcgagt attgataatg ataaactgag ctccgaagag cgcaccaatac gcaaaccgcc 5100
 tctccccgag cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa 5160
 agcgggcagt gagcgcaacg caattaatgt gagttacctc actcattagg caccocaggc 5220
 tttacacttt atgcttccgg ctctatgtt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca 5280
 cacaggaaac agctatgacc atgattaocg caagcgcgca attaacctc actaaaggga 5340
 acaaaagctg gagctcatag cttcaaatg tttctactcc tttttactc ttccagattt 5400
 tctcggactc cgcgcatcgc cgtaccactt caaaaacccc aagcacagca tactaaattt 5460
 cccctcttcc ttcctctagg gtgtcgttaa ttaccogtac taaaggtttg gaaaagaaaa 5520
 aagagaccgc ctctgttctt tttcttctc gaaaaaggca ataaaaattt ttatcacggt 5580
 tctttttctt gaaaattttt tttttgattt tttctcttt cgatgacctc ccattgatat 5640
 ttaagttaat aaacggtctt caattttcca agtttcagtt tcatttttct tgttctatta 5700
 caactttttt tacttcttgc tcattagaaa gaaagcatag caatctaate taagttttct 5760
 agatacaaaa tggaacagaa gttgatttcc gaagaagacc tcgagatgga tttgttattg 5820
 ctggaaaagt cacttattgc tgtatttgtg gcagttatcc tagccacggt tatttctaaa 5880
 ttaagaggta agaaactaaa actacctctt ggtcccatcc ccataccaat ttttggtaat 5940
 tggttgcaag tgggcgatga tttgaatcac agaaatttgg tagactatgc taagaagttc 6000
 ggtgaccttt tcttgcttag aatgggtcaa aggaatttgg tagtggttag ctccacctgat 6060
 ttgactaagg aggtcttatt aacgcaaggc gttgagtttg gctccagaac tagaaatggt 6120
 gtgtttgata ttttcactgg taaaggtaa gatatggttt ttacagttta cggtgagcac 6180
 tggagaaaaa tgagaagaat catgaccgta ccattcttta ctaacaaggt tgttcaacaa 6240
 aatagagaag gttgggagtt tgaggcagct tccgtagtgg aagacgtaa gaaaaatcca 6300
 gattcggcca caaagggtat agtactaaga aaaagactac aattgatgat gtacaacaat 6360
 atgttcagaa ttatgtttga cagaagattt gaaagtgaag atgacctttt gttctgaga 6420
 cttaggctt tgaatggtga aagatcgaga ttggctcaaa gtttcgaata taattacggt 6480
 gactttatcc caatcttaag accatttttg agaggctatt tgaaaatttg ccaagacgtc 6540
 aaggatagga ggatcgctct tttcaagaag tactttgtgg acgagagaaa gcaaatagct 6600
 tcttccaagc ccacaggttc ggaaggttta aatgtgcaa ttgatcatat tttagaagct 6660
 gaacaaaaag gtgaaattaa cgaagataat gttttgtaca ttgtagaaaa tatcaatgtg 6720

ES 2 665 258 T3

gctgcaatag aaacaacctt atggtcaata gaatgggta ttgctgaatt ggtgaatcac 6780
ccagaaatac aatctaaact gagaaacgag ctagataccg ttttaggtcc aggtgtccaa 6840
gttacagaac ctgatttgca taagttacc tacttgcaag ctgtggtaa agaaaccttg 6900
agattgagaa tggtattcc tcttctagtt cctcatatga acctacatga tgctaaactg 6960
gccggttatg atattccagc agaaagtaag attttagtaa atgcatggtg gttggccaac 7020
aatccaaaca gttggaataa gcctgaagaa ttcagacctg aaagattctt cgaagaggaa 7080
tctcatggtg aagccaacgg aaatgacttc agatatgtac cttttggcgt tggcagaaga 7140
tcgtgtccag gaataaact agccttacca atattgggta tcacaattgg taggatggtt 7200
caaaattttg agttgctacc accaccgga caatcgaaag tcgatacttc agagaaagga 7260
ggacaattct cattgcata tttgaatcat tccattatag tcatgaaacc cagaaattgt 7320
ggtggtgctc taggtcctaa agtttacagt taccaagaag ttgccgaaca caatggccca 7380
gaaaatttct ggattatcat cgatgacaaa gtttacgatg tttctcaatt caaagatgaa 7440
catccagggtg gtgatgaaat tataatggat ttgggtggtc aagatgctac agaaagcttt 7500
gtcgatatcg gtcattctga cgaagcattg agactactga aaggtttata cattggtgac 7560
gttgacaaga ccagtgagcg cgtttctgtg gaaaaggat ctacctctga aaaccaagt 7620
aaagtgcta ttctagtgg taggaggagc ggttcgggca attcaaagag ggttgaacca 7680
ctaaagccat tagttatcaa acctagagaa gaggaattg acgatggaag gaagaaagtc 7740
actatattct tcggcaccca aacaggtaca gctgaagggt ttgctaaggc tctaggagaa 7800
gaagcaaaaag ctagatatga aaagacgaga ttcaaaattg tcgatctgga tgactatgcc 7860
gccgatgatg acgaatacga agaaaaattg aagaaagaag atgtgcatt tttcttcctt 7920
gccacctacg gcgacggtga accaacagat aatgccgcaa ggttttacia gtggtttact 7980
gaagtaatg acagaggaga atggctgaag aatttgaat atggtgtgtt cggccttgg 8040
aacagacagt acgagcattt taataaggtc gctaagggtg tagatgatat acttgttgaa 8100
caaggtgctc aaaggttagt gcaggtggc ttgggtgacg atgatcaatg tattgaagat 8160
gactttactg cttggagaga agccttgtgg cctgaattag atactatcct tagagaagaa 8220
ggtgacactg ctgttgctac cccctacact gcagcagtc tagaatatag agtctcaatc 8280
catgattcag aagacgcaa attcaatgat attaacatgg ccaacggtaa cggttacacc 8340
gtttttgacg cacaacatcc atacaaagct aatggtgctg ttaaaagga acttcacacc 8400
ccagaaagtg acaggtcatg tatacattg gaatttgata tcgctggtag tggtttgact 8460
tacgaaaacg gtgaccatgt cggagtactt tgcgataatt tgcagaaac tgttgatgaa 8520
gctttgaggt tattggatat gtcaccagat acttacttct cattgcatgc agaaaaagaa 8580
gacggaactc caatatcaag ctcgcttccc cctccattcc ctccctgtaa cttagaaca 8640

ES 2 665 258 T3

gccctaacta gatatgcttg tttactgtct tctccaaaga aaagtgcttt ggttgcattg 8700
 gcagcccacg catccgatcc taccgaagct gagagattaa agcatttggc ttcaccagcc 8760
 ggtaaagatg aatacagtaa gtgggtagtg gagagccaaa gatcgctttt agaagtgatg 8820
 gctgagtttc caagtgctaa acctcctctg ggtgtatttt tcgctggtgt ggccccaaga 8880
 ttgcagccta gattttattc catatcctca tctccaaaaa ttgccgaaac cagaattcac 8940
 gtgacatgtg ctctggtcta cgaaaagatg ccaaacaggta ggattcaciaa ggggtgtctgt 9000
 tctacctgga tgaaaaatgc tgtaccctat gaaaaatccg aaaattgttc tagtgcacca 9060
 attttcgtaa gacaatctaa tttcaagtta ccaagcgatt cttaaagtacc cattattatg 9120
 atcgggccag gtactggttt ggccccattc agaggttctt tgcaagaaag attggcttta 9180
 gtggagagtg gaggttgaatt gggtccttca gttttattct ttggttgtag aacagaaga 9240
 atggacttta tctacgaaga agaattgcag agatttgttg aaagtgggtc attggccgaa 9300
 ttgagtgtg cattcagcag ggaaggtcca accaaagaat acgttcaaca caagatgatg 9360
 gacaaggctt ctgatatctg gaatatgatt tcccaagggtg cttatattgta tgtttgtggt 9420
 gacgctaaag gaatggctag agatgttcat agatcactgc atacaatcgc acaagaacaa 9480
 ggtagcatgg attcaacaaa agcagagggc tttgtaaaga atcttcagac aagcggtaga 9540
 tatctgagag atgtatggta aggtaccgcg gctagctaag atccgctcta accgaaaagg 9600
 aaggagttag acaacctgaa gtctaggtcc ctatttattt ttttatagtt atgttagtat 9660
 taagaacgtt atttatattt caaatttttc ttttttttct gtacagacgc gtgtacgcat 9720
 gtaacattat actgaaaacc ttgcttgaga aggttttggg acgctcgaag atgcaatgga 9780
 tcagttacgt tatcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga 9840
 gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 9900
 ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 9960
 ctggcgtttt tccataggct ccgccccctc gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt 10020
 cagaggtggc gaaacctgac aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaaagctcc 10080
 ctctgctgct ctctgttcc gaccctgcog cttaacggat acctgtccgc ctttctcct 10140
 tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 10200
 gttcctccca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta 10260
 tccggttaact atcgtcttga gtccaacctg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 10320
 gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 10380
 tgggtgccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 10440
 ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt 10500
 agcggtggtt tttttggttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa 10560
 gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg 10620

ES 2 665 258 T3

attttggca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaa ttaaaaatga 10680
 agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta 10740
 atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgctgactc 10800
 cccgtogtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg 10860
 ataccgagag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga 10920
 agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgct ccatccagtc tattaattgt 10980
 tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcccaacgt tgttgccatt 11040
 gctacaggca togtggtgtc acgctcgtcg tttggatagg cttcattcag ctccggttcc 11100
 caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc 11160
 ggtcctccga togttgcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca 11220
 gcactgcata attctcttac tgcatgcca tcogtaagat gctttctgt gactggtgag 11280
 tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcccgcac cgagttgctc ttgccggcg 11340
 tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaacttta aagtgtcat cattggaaaa 11400
 cgttcttogg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa 11460
 cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga 11520
 gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aaggaataa gggcgacacg gaaatgttga 11580
 atactcatac tcttctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg 11640
 agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt 11700
 cccgaaaag tgccacctga acgaagcctc tgtgcttcat tttgtagaac aaaaatgcaa 11760
 cgcgagagcg ctaatttttc aaacaagaa tctgagctgc atttttacag aacagaaatg 11820
 caacgcgaaa gcgctatttt accaacgaag aatctgtgct tcatttttgt aaaacaaaaa 11880
 tgcaacgca gagcgctaat tttcaaaca aagaatctga gctgcatttt tacagaacag 11940
 aatgcaacg cgagagcgtc attttaccac caaagaatct atacttcttt ttgttctac 12000
 aaaaatgcat cccgagagcg ctatttttct acaaaagcat cttagattac ttttttctc 12060
 ctttgtgccc tctataatgc agtctcttga taactttttg cactgtaggt ccgttaaggt 12120
 tagaagaagg ctactttggc gtctattttc tcttcataa aaaaagcctg actccacttc 12180
 ccgcgtttac tgattactag cgaagctgag ggtgcatttt ttcaagataa aggcacccc 12240
 gattatattc tataccgatg tggattgccc atactttgtg aacagaaagt gatagcgttg 12300
 atgattcttc attggtcaga aaattatgaa cggtttcttc tattttgtct ctatatacta 12360
 cgtataggaa atgtttacat tttcgtattg ttttcgattc actctatgaa tagttcttac 12420
 tacaattttt ttgtctaaag agtaatacta gagataaaca taaaaaatgt agaggctcag 12480
 tttagatgca agttcaagga gcgaaagggt gatgggtagg ttatataggg atatagcaca 12540

ES 2 665 258 T3

gagatatata gcaaagagat acttttgagc aatgtttgtg gaagcgggat tcgcaatatt 12600
 ttagtagctc gttacagtcc ggtgcgtttt tggttttttg aaagtgcgtc ttcagagcgc 12660
 ttttggtttt caaaagcgcct ctgaagtcc tatactttct agagaatagg aacttcggaa 12720
 taggaacttc aaagcgtttc cgaaaacgag cgcttccgaa aatgcaacgc gagctgcgca 12780
 catacagctc actgttcacg tcgcacctat atctgcgtgt tgctgtata tatatatata 12840
 tgagaagaac ggcatagtgc gtgtttatgc ttaaagcgt acttatatgc gtctatttat 12900
 gtaggatgaa aggtagtcta gtacctcctg tgatattatc ccattccatg cggggtatcg 12960
 tatgcttctc tcagcactac ccttttagctg ttctatatgc tgccactcct caattggatt 13020
 agtctcatcc ttaaatgcta tcatttcctt tgatattgga tcatactaag aaaccattat 13080
 tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc 13130

<210> 180
 <211> 9308
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> plásmido

10

<400> 180
 tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggta 60
 cagottgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg oggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accataaatt cccgttttaa gagcttgggtg agcgcctagga gtcactgcca ggtatcgttt 240
 gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt ccgcaattt tctttttcta 300
 ttactcttgg cctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa tgattttcat 360
 tttttttttt cccctagcgg atgactcttt ttttttotta gcgattggca ttatcacata 420
 atgaattata cattatataa agtaatgtga tttcttcgaa gaatatacta aaaaatgagc 480
 aggcaagata aacgaaggca aagatgacag agcagaaagc cctagtaaag cgtattacaa 540
 atgaaaccaa gattcagatt gcgatctctt taaaggggtg tcccctagcg atagagcact 600
 cgatcttccc agaaaaagag gcagaagcag tagcagaaca ggccacacaa tcgcaagtga 660
 ttaacgtoca cacaggtata gggtttctgg accatatgat acatgctctg gccaaagcatt 720
 cgggctggtc gctaactggt gagtgcattg gtgacttaca catagacgac catcacacca 780
 ctgaagactg cgggattgct ctcggtaag cttttaaaga ggccctactg gcgcgtggag 840
 taaaaaggtt tggatcagga tttgcgcctt tggatgaggg actttccaga gcgggtgtag 900
 atctttcga caggccgtac gcagttgtcg aacttggttt gcaaagggag aaagtaggag 960
 atctctcttg cgagatgac ccgcattttc ttgaaagcct tcagaggct agcagaatta 1020
 ccctccacgt tgattgtctg cgaggcaaga atgatcatca ccgtagtgag agtgcgttca 1080

ES 2 665 258 T3

aggcctcttgc ggttgccata agagaagcca cctcgcccaa tggtagcaac gatgttccct 1140
 ccaccaaagg tgttcttatg tagtgacacc gattatntaa agctgcagca tacgatatat 1200
 atacatgtgt atatatgtat acctatgaat gtcagtaagt atgtatacga acagtatgat 1260
 actgaagatg acaaggtaat gcatcattct atacgtgtca ttctgaacga ggcgcgcttt 1320
 ccttttttct ttttgctttt tctttttttt tctcttgaac tcgacggatc tatgcggtgt 1380
 gaaataccgc acagatgctg aaggagaaaa taccgcatca ggaaattgta aacgttaata 1440
 ttttgntaaa attcgcgcta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg 1500
 aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttgttc 1560
 cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa ggcgcaaaaa 1620
 ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc gctatacctg agaaagcaac 1680
 ctgaactaca ggaaagagtt actcaagaat aagaattttc gttttaaaac ctaagagtca 1740
 ctttaaaatt tgtatacact tatttttttt ataacttatt taataataaa aatcataaat 1800
 cataagaaat tcgcttattt agaagtgtca acaacgtatc taccaacgat ttgacccttt 1860
 tccatctttt cgtaaatttc tggcaaggta gacaagccga caacctgat tggagacttg 1920
 accaaaacctc tggcgaagaa ttgttaatta agagctcaga tcttatcgtc gtcacacctg 1980
 taatccatcg atactagttc attagttagt gacagttgga acagagtgtg acaccactgt 2040
 ctcaattggt aagccaggac cgaaaccaaa tagaacacc ccaatctaac cttctccggt 2100
 tgtggctttt tcacccttta aagacttctt cctcatctca tctagaatga ataaaacgca 2160
 ggcagagctc atgttgccat actctgatag aacgtgtctt gtagcttcca actttttctt 2220
 ctctaagttt agttttgcct ccactcgcgc taaaattgct ggaccacctg gatgagcaat 2280
 ccaaaaacaat gagttccagt cgcttatgcc caatgggtca aaggcttgag ttaagcattt 2340
 ttgatggtt tctgaaatta aggttgggac attaggccac aatgaaaag tcaaaccaac 2400
 ttctctcaag tttctgcta tggcaccggc ggaatttga ataaaagttt gagcagcaga 2460
 aactaattga aatagtgtc tttcaatgga cacatcagga tcgctgccta caattacggc 2520
 ggaagatcca tcgccaaca atgcttgtcc gaccaaactg tctagagcat cttctgatgg 2580
 acctctgaaa gttacgacag tgatttcaact gcagacgact aaaaccctag cacggcgctt 2640
 atttctgcc aatcccttag cagttctaag cactgtacct ccggcgtaac aaccttgatg 2700
 atacaacata actcttctaa cagaggtctc taatcccaat aggtttgcta gttataatc 2760
 agcaacctggc atttcgacac cgggaagttg acagaaaacc aatgtgtaa tottagattt 2820
 tggttgtccc cattccttta aagctttcaa ggctgcgtct ctacctagtc taggtacctc 2880
 ggctgttatg atttcttgtc taatattcaa agatgggtcc atatatgcac ctatatttgg 2940
 atgttctct aacatttctt cagttagatg tatgtatctt ttctttatca tagatttatc 3000

ES 2 665 258 T3

acaaaattcta ttaaactttt tottaagttc tgtcatatgt tcaacttttag ttactctgaa 3060
 atagtaatca gcgtaatcag attgataaac acagtgatca ggggtggctg ttccaatagc 3120
 caatatgggt gctggacctt ttgccctctg tgcatttctg aactcctcta cggatgccat 3180
 gaattctcta gaatccgtcg aaactaagtt ctggtgtttt aaaactaaaa aaaagactaa 3240
 ctataaaagt agaatttaag aagtttaaga aatagattta cagaattaca atcaatacct 3300
 accgtcttta tatacttatt agtcaagtag ggaataaatt tcaggaact ggtttcaacc 3360
 ttttttttca gctttttcca aatcagagag agcagaaggt aatagaaggt gtaagaaat 3420
 gagatagata catgcgtggg tcaattgcct tgtgtcatca tttactccag gcaggttgca 3480
 tcactccatt gaggttgctc ccgttttttg cctgtttgtg cccctgttct ctgtagttgc 3540
 gctaagagaa tggacctatg aactgatggt tgggtgaaga aacaatattt tgggtctggg 3600
 attctttttt tttctggatg ccagcttaaa aagcgggctc cattatattt agtggatgcc 3660
 aggaataaac tgttcaccca gacacctag atgttatata ttctgtgtaa cccgccccct 3720
 attttgggca tgtacgggtt acagcagaat taaaaggcta attttttgac taaataaagt 3780
 taggaaaatc actactatta attatttagc tattctttga aatggcgagt attgataatg 3840
 ataaactgag ctcggaagag cgcaccaatac gcaaaccgcc tctccccgag cgttgccga 3900
 ttcattaatg cagctggcac gacaggttc ccgactggaa agcgggcagt gagcgaacg 3960
 caattaatgt gagttacctc actcattagg caccacaggc tttacacttt atgcttccgg 4020
 ctccatggtt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac agctatgacc 4080
 atgattacgc caagcgcgca attaacctc actaaagga acaaaagctg gagctcatag 4140
 cttcaaaatg tttctactcc ttttttactc ttccagattt tctcggactc cgcgcatcgc 4200
 cgtaccactt caaaacacc aagcacagca tactaaattt cccctcttcc ttcctctag 4260
 gtgtcgttaa ttaccctgac taaaggttg gaaaagaaaa aagagaccgc ctcgtttctt 4320
 tttctctgc gaaaaggca ataaaaattt ttatcacggt tctttttctt gaaaattttt 4380
 tttttgattt ttttctctt cgatgacctc ccattgatat ttaagttaat aaacggctct 4440
 caatttctca agtttcagtt tcatttttct tgttctatta caactttttt tacttcttgc 4500
 tcattagaaa gaaagcatag caatctaatac taagttttct agaggatcca tggcttctgt 4560
 tgaagaaatt agaatgctc aaagagctaa aggtccagct actattttgg ctattggtac 4620
 tgctactcca gatcattgtg tttaccaatc tgattacgct gattactact tcagagttac 4680
 taagtctgaa catatgactg aattgaagaa aaagttcaac agaatttgtg ataaatctat 4740
 gatcaagaaa agatacatcc atttgactga agaaatggtg gaagaacatc caaacatcgg 4800
 tgcttacatg gctccatctt tgaacatcag acaagaaatc atcactgctg aagttccaaa 4860
 gttgggtaaa gaagctgctt tgaagcttt gaaagaatgg ggtcaaccaa aatctaaaat 4920
 tactcatttg gttttctgta ctacttctgg tgttgaatg ccaggtgctg attataaatt 4980

ES 2 665 258 T3

ggctaatttg ttgggtttgg aaacttctgt tagaagagtt atgttgatc atcaaggttg 5040
 ttatgctggt ggtactgttt tgagaactgc taaagatttg gctgaaaata atgctggtgc 5100
 tagagttttg gttgtttgtt ctgaaattac tgttgttact tttagaggtc catctgaaga 5160
 tgctttggat tctttggtg gtcaagcttt gtttggtgac ggttctgctg ctgttattgt 5220
 tggttctgat ccagatattt ctattgaaag accattgttt caattggttt ctgctgctca 5280
 aacttttatt ccaaattctg ctggtgctat tgctggtaat ttgagagaag ttggtttgac 5340
 tttccatttg tggccaaacg ttccaacttt gatctctgaa aacatcgaaa actgtttgac 5400
 taaggctttc gatccaatcg gtatctctga ttggaactct ttgttttggg ttgctcatcc 5460
 aggtgggtcca gctattttgg atgctgttga agctaaagtt ggtttggata agcaaaagtt 5520
 gaaggctact agacatatct tgtctgaata cggtaacatg tcttctgctt gtgttttgtt 5580
 tattttggat gaaatgagaa agaaatcttt gaaggaaggt aaaactacta ctggtgaagg 5640
 tttggattgg ggtgttttgt ttggttttgg tccaggtttg actattgaaa ctgttgtttt 5700
 gcattctgtt ggtactgatt ctaattaact cgagtaagct tggtagcgcg gctagctaag 5760
 atccgctcta accgaaaagg aaggagttag acaacctgaa gtctaggtcc ctatttattt 5820
 ttttatagtt atgttagtat taagaacggt atttatattt caaatttttc tttttttct 5880
 gtacagacgc gtgtacgcat gtaacattat actgaaaacc ttgcttgaga aggttttggg 5940
 acgctcgaag atataacgta actgatccat tgcttctctg ctcaactgact cgctgcgctc 6000
 ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcgtaatac ggttatccac 6060
 agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 6120
 ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca 6180
 caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc 6240
 gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata 6300
 cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta 6360
 tctcagttcg gtgtaggtog ttogctccaa gctgggctgt gtgcaogaac cccccgtca 6420
 gccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga 6480
 ctatcgcga ctggcagcag ccaactgtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg 6540
 tgctacagag ttcttgaagt gttggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg 6600
 tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg 6660
 caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgttgc aagcagcaga ttacgcgcag 6720
 aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctaog ggtctgacg ctcaagtggaa 6780
 cgaaaactca cgttaagga ttttggctat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 6840
 ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc 6900

ES 2 665 258 T3

tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc 6960
 atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 7020
 tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc 7080
 aataaaccag ccagccgaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc 7140
 catccagtct attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 7200
 gcgcaacggt gttgccattg ctacaggeat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc 7260
 ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa 7320
 aaaagcgggt agctccttcg gtccctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtggt 7380
 atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg 7440
 cttttctgtg actgggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgta tgccgcgacc 7500
 gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa 7560
 agtgcctatc attggaaaaa gttcttcggg gcgaaaaactc tcaaggatct taccgctggt 7620
 gagatccagt tcgatgtaac ccaactcgtc acccaactga tottcagcat ottttacttt 7680
 caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag 7740
 ggcgacacgg aatggtgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta 7800
 tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 7860
 aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgaa cgaagcatct gtgcttcatt 7920
 ttgtagaaca aaaatgcaac gcgagagcgc taatttttca aacaaagaat ctgagctgca 7980
 tttttacaga acagaaatgc aacgcgaaag cgctatttta ccaacgaaga atctgtgctt 8040
 cttttttgta aaacaaaaat gcaacgcgag agcgcctaatt tttcaaaca agaatctgag 8100
 ctgcatTTTT acagaacaga aatgcaacgc gagagcgcta ttttaccac aaagaatcta 8160
 tacttctttt ttgttctaca aaaatgcac cgcgagcgc tatttttcta acaaagcatc 8220
 ttagattact tttttctcc ttgtgctcgt ctataatgca gtctcttgat aactttttgc 8280
 actgtaggtc cgttaaggtt agaagaaggc tactttggtg tctattttct cttccataaa 8340
 aaaagcctga ctccacttcc ccggtttact gattactagc gaagctgagg gtgcattttt 8400
 tcaagataaa ggcaccccg attatattct ataccgatgt ggattgcca tactttgtga 8460
 acagaaagtg atagcgttga tgattctca ttggtcagaa aattatgaac ggtttcttct 8520
 atttgtctc tatatactac gtatagaaa tgtttacatt ttcgtattgt tttcgattca 8580
 ctctatgaat agttcttact acaatttttt tgtctaaaga gtaatactag agataaacat 8640
 aaaaaatgta gaggtcagat ttagatgcaa gttcaaggag cgaaagggtg atgggtaggt 8700
 tatatagga tatagcacag agatatatag caaagagata cttttgagca atgtttgtg 8760
 aagcggatt cgcaatattt tagtagctc ttacagtcg gtgcgttttt ggttttttga 8820
 aagtgcgtct tcagagcgtt ttgggttttc aaaagcgcctc tgaagttcct atactttcta 8880

ES 2 665 258 T3

gagaatagga acttcggaat aggaacttca aagcgtttcc gaaaacgagc gcttcgaaa 8940
atgcaacgcg agctgcgcac atacagctca ctgttcacgt cgcacctata tctgctggt 9000
gcctgtatat atatatacat gagaagaacg gcatagtgcg tgtttatgct taaatgcgta 9060
cttatatgcg tctatttatg taggatgaaa ggtagtctag tacctcctgt gatattatcc 9120
cattccatgc ggggtatcgt atgcttcctt cagcactacc ctttagctgt tctatatgct 9180
gccactcctc aattggatta gtctcatcct tcaatgctat catttccttt gatattggat 9240
catctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgtat tcacgaggcc 9300
ctttcgtc 9308

<210> 181
<211> 4677
<212> ADN
<213> artificial

5

<220>
<223> plásmido

10

<400> 181
tttgttattc atttgtagtg acaccgatta tttaaagctg cagcatacga tatatatata 60
tgtgtatata tgtataccta tgaatgtcag taagtatgta tacgaacagt atgatactga 120
agatgacaag gtaatgcatc attctatacg tgtcattctg aacgaggcgc gctttccttt 180
tttctttttg ctttttcttt ttttttctct tgaactogac ggatcaacco ttaataatac 240
ttcgtataat gtatgctata cgaagttatt aggttgcggt gtgaaatacc gcacagatgc 300
gtaaggagaa aatacogcat caggaaattg taagcgtaa tattttgtta aaattcogct 360
taaatttttg ttaaatacagc tcatttttta accaataggc cgaatacggc aaaatccctt 420
ataaatcaaa agaatagacc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc 480
cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg 540
gccactacg tgaaccatca ccctaataca gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac 600
taaatooggaa ccctaaaggg agccccogat ttagagcttg acgggggaaag cgggcgaaag 660
tgggcgagaaa ggaaggggaag aaagcgaaaag gagcgggccc tagggcgctg gcaagtgtag 720
cggtcacgct gcgcgtaacc accacaccog ccgcgcttaa tgcgccccta cagggcgctg 780
ccattcogcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga tccgtgcggg cctcttcgct 840
attacgccag ctggcgaaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg 900
gttttcccag tcacgacggt gtaaaacgac ggccagtga tttgtaatac actcactata 960
gggogaattg gagctccacc gcgggtggcgg ccgctctaga actagtggat cccccgggct 1020
gcaggaattc gatatcaagc ttatcgatac cgtcgagcaa ttcttcgcca gaggtttggt 1080
caagtctcca atgcaatggc ggcgccttac gttatcttcc tcgctcactg actcgtctgc 1140

ES 2 665 258 T3

ctcggtcggt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc 1200
cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag 1260
gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt ttccatagg ctcgccccc ctgacgagca 1320
tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaaccog acaggactat aaagatacca 1380
ggcgttcccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg 1440
atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcggtt tctcaatgct cacgctgtag 1500
gtatctcagt tcgggtgtag tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt 1560
tcagcccagc cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca 1620
cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg 1680
cgggtctaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt 1740
tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc 1800
cggcaaaaaa accaccgctg gtagcgggtg ttttttgggt tgcaagcagc agattacgcg 1860
cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggctctg acgctcagtg 1920
gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta 1980
gatcctttta aattaaat gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg 2040
gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttgg 2100
ttcatccata gttgcctgac tgcccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc 2160
atctggcccc agtgcctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatac 2220
agcaataaac cagccagccg gaagggccga ggcgagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc 2280
ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag 2340
tttgccgaac gttggtgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat 2400
ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg 2460
aaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgttgc agaagtaagt tggccgcagt 2520
gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag 2580
atgcttttct gtgactggtg agtactaac caagtcatto tgagaatagt gtatgcggcg 2640
accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc ggcaccata gcagaacttt 2700
aaaagtgctc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tottaccgct 2760
gttgagatcc agttcgtatg aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac 2820
tttaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgcgcaa aaaaggaat 2880
aaggcgcaca cggaaatggt gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat 2940
ttatcaggtt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca 3000
aataggggtt ccgcgccatc ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat 3060
tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg taccagagg ccctttcgtc tcgcgcggtt 3120

ES 2 665 258 T3

cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca cagcttgtct 3180
 gtaagcggat gcogggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg 3240
 tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatgttgg 3300
 aataaaaatc aactatcatc tattaactag tatttacatt actagtatat tatcatatac 3360
 ggtgttagaa gatgacataa atgatgagaa acagtcactc aaattagtgg aagctgaaat 3420
 gcaaggattg ataatgtaat aagatctatg aataacatat aaaacgaaaa gaggaataat 3480
 cataatatta tatgtagaaa tatagattcc cttttgtgga ttcctataac ctcgaggaga 3540
 acttctagta tattctgtat acctaattt atagccttta tcaacaatgg aatcccaaca 3600
 attatctcaa aattcaccta tttctcaaac ccttaataata acttcgtata atgtatgcta 3660
 tacgaagtta ttaggtaatt cccgttttaa gagcttggg agcgcctagga gtcactgcca 3720
 ggtatcgttt gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt cccgcaattt 3780
 tctttttcta ttactcttgg cctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa 3840
 tgattttcat tttttttttt ccctagcgg atgactcttt ttttttctta gcgattggca 3900
 ttatcacata atgaattata cattatataa agtaatgtga tttcttcgaa gaatatacta 3960
 aaaaatgagc aggcaagata aacgaaggca aagatgggta ggagggcttt tgtagaaaga 4020
 aatacgaacg aaacgaaaat cagcgttgc atcgccttgg acaaagctcc cttacctgaa 4080
 gagtcgaatt ttattgatga acttataact tccaagcatg caaaccaaaa gggagaacaa 4140
 gtaatccaag tagacacggg aattggattc ctggatcaca tgtatcatgc actggctaaa 4200
 catgcaggct ggagcttacg actttactca agaggtgatt taatcatcga tgatcatcac 4260
 actgcagaag atactgctat tgcacttggg attgcattca agcaggctat gggtaacttt 4320
 gcogggctta aaagatttgg acatgcttat tgtccacttg acgaagccct ttctagaagc 4380
 gtagttgact tgtcgggacg gccctatgct gttatcgatt tgggattaaa gcgtgaaaag 4440
 gttggggaat tgtcctgtga aatgatccct cacttactat attccttttc ggtagcagct 4500
 ggaattactt tgcattgtac ctgcttataat ggtagtaatg accatcatcg tgctgaaagc 4560
 gcttttaaat ctctggctgt tgccatgccc gcggctacta gtcttactgg aagttctgaa 4620
 gtccaagca cgaagggagt gttggcttgt aaaaattggg tttcttcttt gtctcat 4677

<210> 182
 <211> 4775
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> plásmido

10

<400> 182
 ccgattattt aaagctgcag catacgatat atatacatgt gtatatatgt atacctatga 60

ES 2 665 258 T3

atgtcagtaa gtatgtatac gaacagtatg atactgaaga tgacaaggta atgcatcatt 120
ctatacgtgt cattctgaac gaggcgcgct ttcctttttt ctttttgctt tttctttttt 180
tttctcttga actcgacgga tcaaccctta atataacttc gtataatgta tgctatacga 240
agttattagg ttgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 300
gaaattgtaa gcgttaatat tttgttaaaa ttgcggttaa atttttgtta aatcagctca 360
ttttttaacc aataggccga aatcgcaaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag 420
atagggttga gtgttgttcc agtttggaac aagagtccac tattaagaa cgtggactcc 480
aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcacc 540
taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaacc taaagggagc 600
ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa 660
gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc 720
acaccgcgcg cgcttaatgc gccgctacag ggcgctcca ttcgccattc aggctgcgca 780
actgttggga agggcgatcg gtgcgggctt cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg 840
gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt tcccagtca cgacgttcta 900
aaacgaoggc cagtgaattg taatacgact cactataggg cgaattggag ctocaccgcg 960
gtggcgggccg ctctagaact agtggatccc ccgggctgca ggaattcgat atcaagetta 1020
tcgataaccg cgagcaattc ttcgccagag gtttgggtcaa gtctccaatg caatggcggc 1080
cgcttacggt atcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag 1140
cggtatcagc tcaactcaaag gcggttaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag 1200
gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgctgc 1260
tggcgttttt ccataggctc ggccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc 1320
agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gttccccctt ggaagctccc 1380
tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt 1440
cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg 1500
ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccgttca gccgaocgc tggccttat 1560
ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccggt taagacacga cttatcgcca ctggcagcag 1620
ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt 1680
ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc 1740
cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta 1800
gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag 1860
atcctttgat cttttctacg gggctgacg ctcagtgaa cgaaaactca cgtaagga 1920
ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa 1980
gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa 2040

ES 2 665 258 T3

tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactgc 2100
 ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga 2160
 taccgcgaga cccacgctca cgggtccag atttatcagc aataaaccag ccagccgaa 2220
 gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt 2280
 gccgggaagc tagagtaagt agttcgcag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg 2340
 ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc 2400
 aacgatcaag gcgagttaca tgatccccc tgttgtgaaa aaaagcgggt agctccttcg 2460
 gtccctccgat cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag 2520
 cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt 2580
 actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcgccgct 2640
 caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa agtgctcatc attggaaaac 2700
 gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac 2760
 ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag 2820
 caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa 2880
 tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga 2940
 gcggatacat atttgaatgt atttgaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc 3000
 cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa 3060
 ataggcgtat caccaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct 3120
 gacacatgca gctcccgagg acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac 3180
 aagcccgta gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg 3240
 catcagagca gattgtactg agagtgcacc atgttggaat aaaaatcaac tatcatctat 3300
 taactagtat ttacattact agtatattat catatacggg gttagaagat gacataaatg 3360
 atgagaaaca gtcactaaa ttagtggaag ctgaaatgca aggattgata atgtaataag 3420
 atctatgaat aacatataaa acgaaaagag gaataatcat aatattatat gtagaaatat 3480
 agattccctt ttgtggattc ctatctctc gaggagaact tctagtatat tctgtatacc 3540
 taatattata gcctttatca acaatggaat cccaacaatt atctcaaaa tcacctattt 3600
 ctcaaacctt taatataact tcgtataatg tatgctatac gaagttatta ggtaattccc 3660
 gttttaagag cttggtgagc gctaggagtc actgccagggt atcgtttgaa caccgatta 3720
 gtcaggggaag tcataacaca gtcctttccc gcaattttct ttttctatta ctcttggcct 3780
 cctctagtac actctatatt tttttatgcc tcggtaatga ttttcatttt ttttttccc 3840
 ctacgggatg actctttttt tttcttagcg attggcatta tcacataatg aattatacat 3900
 tatataaagt aatgtgattt cttcgaagaa tatactaaaa aatgagcagg caagataaac 3960

ES 2 665 258 T3

gaaggatggg taaggaaaag actcacgttt cgaggccgcg attaaattcc aacatggatg 4020
ctgatttata tgggtataaa tgggctcgcg ataatgtcgg gcaatcaggt gcgacaatct 4080
atcgattgta tgggaagccc gatgcgccag agttgtttct gaaacatggc aaaggtagcg 4140
ttgccaatga tgttacagat gagatggtca gactaaactg gctgacggaa tttatgcctc 4200
ttccgaccat caagcatttt atccgtactc ctgatgatgc atggttactc accactgcga 4260
tccccggcaa aacagcattc caggtattag aagaatatcc tgattcaggt gaaaatattg 4320
ttgatgcgct ggcagtgttc ctgcgccggt tgcattcgat tctgtttgt aattgtcctt 4380
ttaacagcga tcgcgtattt cgtctcgctc aggcgcaatc acgaatgaat aacggtttgg 4440
ttgatgcgag tgattttgat gacgagcgta atggctggcc tgttgaacaa gtctggaag 4500
aatgcataa gcttttgcca ttctcaccgg attcagtcgt cactcatggt gatttctcac 4560
ttgataacct tatttttgac gaggggaaat taataggttg tattgatgtt ggacgagtcg 4620
gaatcgcaga ccgataccag gatccttgcca tcctatggaa ctgcctcggg gagttttctc 4680
cttcattaca gaaacggcct tttcaaaaat atggtattga taatcctgat atgaataaat 4740
tgcagtttca tttgatgctc gatgagtttt tctaa 4775

<210> 183
<211> 9931
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> plásmido

<400> 183
tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatgttgg aataaaaatc aactatcatc tattaactag tatttacatt actagtatat 240
tatcatatac ggtgttagaa gatgacataa atgatgagaa acagtcactc aaattagtgg 300
aagctgaaat gcaaggattg ataatgtaat aagatctatg aataacatat aaaacgaaaa 360
gaggaataat cataatatta tatgtagaaa tatagattcc cttttgtgga ttcctatatac 420
ctcgaggaga acttctagta tattctgtat acctaataatt atagccttta tcaacaatgg 480
aatcccaaca attatctcaa aattcaccta tttctcaaac ccttaataata acttcgtata 540
atgtatgcta tacgaagtta ttaggtcgag gagaacttct agtatatcta catacctaat 600
attattgcct tatttaaaaat ggaatcccaa caattacatc aaaatccaca ttctcttcaa 660
aatcaattgt cctgtacttc cttgttcatg tgtgttcaaa aacgttatat ttataggata 720
attatactct atttctcaac aagtaattgg ttgtttggcc gagcgggtcta aggcgcctga 780
ttcaagaaat atcttgaccg cagttaactg tgggaatact caggtatcgt aagatgcaag 840

ES 2 665 258 T3

agttcgaatc tcttagcaac cattatTTTT ttcctcaaca taacgagaac acacaggggc 900
 gctatcgcac agaatcaaat tcgatgactg gaaatTTTT gttaatttca gaggtcgcct 960
 gacgcatata cctTTTTcaa ctgaaaaatt gggagaaaaa ggaaaggtga gagcgccgga 1020
 accggctttt catatagaat agagaagcgt tcacgactaa atgcttgcat cacaatactt 1080
 gaagttgaca atattattta aggacctatt gttttttcca ataggtgggtt agcaatcgtc 1140
 ttacttttcta actttttotta ccttttacat ttcagcaata tatatatata tatttcaagg 1200
 atataccatt ctaatgtctg cccctaagaa gatcgtcgtt ttgccaggtg accacgttgg 1260
 tcaagaaatc acagccgaag ccattaaggt tcttaagct atttctgatg ttcgttccaa 1320
 tgtcaagttc gatttcgaaa atcatttaat tgggtgtgct gctatcgatg ctacaggtgt 1380
 tccacttcca gatgagggcg tggaagcctc caagaaggct gatgccgttt tgttaggtgc 1440
 tgtgggtggt cctaaatggg gtactggtag tgttagacct gaacaaggtt tactaaaaat 1500
 ccgtaaagaa cttcaattgt acgccaaact aagaccatgt aactttgcat ccgactctct 1560
 tttagactta tctccaatca agccacaatt tgctaaaggt actgacttctg ttgttgcag 1620
 agaattagtg ggaggtatth actttggtaa gagaaaggaa gacgatggtg atggtgtcgc 1680
 ttgggatagt gaacaataca ccgttccaga agtgcaaaga atcacaagaa tggccgcttt 1740
 catggcccta caacatgagc caccattgcc tatttggctc ttggataaag ctaatctttt 1800
 ggcctcttca agattatgga gaaaaactgt ggaggaaacc atcaagaacg aatttcctac 1860
 attgaaggth caacatcaat tgattgatc tgcgccatg atcctagtta agaaccctaac 1920
 ccacctaaat ggtattataa tcaccagcaa catgtttggt gatatcatct ccgatgaagc 1980
 ctccgttatc ccaggttctt tgggtttggt gccatctcgg tcttggcct ctttgccaga 2040
 caagaacacc gcatttgggt tgtacgaacc atgccaggt tctgctccag atttgceaaa 2100
 gaataaggth gacctatctg ccactatctt gtctgtgca atgatgttga aattgtcatt 2160
 gaacttgcct gaagaaggta aggccattga agatgcagtt aaaaaggttt tggatgcagg 2220
 tatcagaact ggtgatthtag gtggttccaa cagtaccacc gaagtcggtg atgctgtcgc 2280
 cgaagaagth aagaaaatcc ttgcttaaaa agattctctt tttttatgat atttgtacat 2340
 aaactttata aatgaaatc ataatagaaa cgacacgaaa ttacaaaatg gaatatgttc 2400
 ataggttaga cgaaactata tacgcaatct acatacattt atcaagaagg agaaaaagga 2460
 ggatagtaaa ggaatacagg taagcaaatt gatactaatg gctcaacgtg ataaggaaaa 2520
 agaattgcac ttttaacatta atattgacaa ggaggagggc accacacaaa aagttaggtg 2580
 taacagaaaa tcttgaaact acgattccta atttgatatt ggaggattht ctctaaaaaa 2640
 aaaaaaatac aacaaataaa aaacactcaa tgacctgacc atttgatgga gtttaagtca 2700
 ataccttctt gaagcatttc ccataatggt gaaagttccc tcaagaatth tactctgtca 2760

ES 2 665 258 T3

gaaacggcct tacgacgtag tcgaaaccct taatataact togtataatg tatgctatac 2820
 gaagttatta ggttgcggtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc 2880
 aggaaattgt aagcgttaat attttgtaa aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct 2940
 cattttttaa ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg 3000
 agatagggtt gagtgttgtt ccagtttga acaagagtcc actattaaag aacgtggact 3060
 ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac 3120
 cctaatacaag ttttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaagga 3180
 gcccccgatt tagagcttga cggggaaaagc cggcgaaact ggcgagaaaag gaaggaaga 3240
 aagcgaaagg agcgggagcct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca 3300
 ccacaccgcg cgcgcttaat gcgccgctac agggcgcgct cattcgccat tcaggctgcg 3360
 caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 3420
 gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cagcagcttg 3480
 taaaaagcag gccagtgat tgtaatacga ctactatag ggcgaattgg agctccaccg 3540
 cggttcgag cgtcccaaaa ccttctcaag caaggttttc agtataatgt tacatgcgta 3600
 cacgctctg tacagaaaaa aaagaaaaat ttgaaatata aataacgttc ttaataactaa 3660
 cataactata aaaaaataaa tagggaccta gacttcaggt tgtctaactc cttccttttc 3720
 ggttagagcg gatccttagct agccgcggta ccaagcttac tcgagttaat tagaatcagt 3780
 accaacagaa tgcaaaaaca cagtttcaat agtcaaactc ggaccaaaac caaacaaaac 3840
 accccaatcc aaaccttcac cagtagtagt tttaccttc ttcaaagatt tctttctcat 3900
 ttcatccaaa ataaacaaaa cacaagcaga agacatgta ccgtattcag acaagatatg 3960
 tctagtagcc ttcaactttt gcttatccaa accaacttta gcttcaacag catccaaaat 4020
 agctggacca cctggatgag caatccaaaa caaagagttc caatcagaga taccgattgg 4080
 atcgaagcc ttagtcaaac agttttcgat gttttcagag atcaaagttg gaacgtttgg 4140
 ccacaaatgg aaagtcaaac caacttctct caaattacca gcaatagcac cagcagaatt 4200
 tggaataaaa gtttgagcag cagaaaccaa ttgaaacaat ggtctttcaa tagaaatato 4260
 tggatcagaa ccaacaataa cagcagcaga accgtcacca aacaaagctt gaccaaccaa 4320
 agaatccaaa gcatcttcag atggacctct aaaagtaaca acagtaattt cagaacaaac 4380
 aaccaaaact ctagcaccag cattattttc agccaaatct ttagcagttc tcaaacagct 4440
 accaccagca taacaacctt gatgatacaa cataactctt ctaacagaag tttccaaacc 4500
 caacaaatta gccaatat aatcagcacc tggcatttca acaccagaag tagtacagaa 4560
 aaccaaatga gtaattttag attttggtg accccattct ttcaaagctt tcaaagcagc 4620
 ttctttacc aactttgaa cttcagcagt gatgatttct tgtctgatgt tcaaagatgg 4680
 agccatgtaa gcaccgatgt ttggatgttc ttccaacatt tcttcagtca aatggatgta 4740

ES 2 665 258 T3

tcttttcttg atcatagatt tatcacaat tctgttgaac tttttcttca attcagtcac	4800
atgttcagac ttagtaactc tgaagtagta atcagcgtaa tcagattggt aaacacaatg	4860
atctggagta gcagtaccaa tagccaaaat agtagctgga ccttttagctc tttgagcatt	4920
tctaatttct tcaacagaag ccatggatcc tctagaaaac ttagattaga ttgctatgct	4980
ttctttctaa tgagcaagaa gtaaaaaaag ttgtaataga acaagaaaaa tgaaactgaa	5040
acttgagaaa ttgaagaccg tttattaact taaatatcaa tgggaggtca togaaagaga	5100
aaaaaatcaa aaaaaaatt ttcaagaaaa agaaacgtga taaaaatfff tattgccttt	5160
ttcgacgaag aaaaagaaac gaggcggctc cttttttctt ttccaaacct ttagtacggg	5220
taattaacga caccctagag gaagaagag gggaaattta gtatgctgtg cttgggtgtt	5280
ttgaagtggc acggcgatgc gcgagtcgg agaaaatctg gaagagtaaa aaaggagtag	5340
aaacattttg aagctatgag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc	5400
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct caccaattcca	5460
cacaacatag gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatag agtgaggtaa	5520
ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtctgtccag	5580
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc	5640
gagctcagtt tatcattatc aatactcgcc atttcaaaga atacgtaaat aattaatagt	5700
agtgattttc ctaactttat ttagtcaaaa aattagcctt ttaattctgc tgtaaccogt	5760
acatgcccaa aatagggggc gggttacaca gaatatataa catcgtaggt gtctgggtga	5820
acagtttatt octggcatcc actaaatata atggagcccg ctttttaagc tggcatccag	5880
aaaaaaaaag aatcccagca ccaaaatatt gttttcttca ccaacctca gttcataggt	5940
ccattctctt agcgcaacta cagagaacag gggcacaac aggcacaaaa cgggcacaac	6000
ctcaatggag tgatgcaacc tgcctggagt aatgatgac acaaggcaat tgaccacgc	6060
atgtatctat ctcatthct tacacctctt attacctctt gctctctctg atttgaaaa	6120
agctgaaaaa aaaggttgaa accagttccc tgaaattatt cccctacttg actaataagt	6180
atataaagac ggtaggtatt gattgtaatt ctgtaaatct atttcttaa cttcttaaat	6240
tctactttta tagttagtct tttttttagt tttaaaacac cagaacttag tttogacgga	6300
ttctagagaa ttcattggcat ccgtagagga gttcagaaat gcacagaggg caaaaggctc	6360
agcaaccata ttggctattg gaacagccac cctgatcac tgtgtttatc aatctgatta	6420
cgctgattac tatttcagag taactaaaag tgaacatatg acagaactta agaaaaagt	6480
taatagaatt tgtgataaat ctatgataaa gaaaagatac atacatctaa ctgaagaaat	6540
gtagaggaa catccaaata taggtgcata tatggcacca tctttgaata ttagacaaga	6600
aatcataaca gccgaggtac ctgactaggt tagagacgca gccttgaaag ctttaaagga	6660

ES 2 665 258 T3

atggggacaa ccaaaatcta agattacaca tttggtttct tgtacaactt ccggtgtcga 6720
aatgccaggt gctgattata aactagcaaa cctattggga ttagagacct ctgttagaag 6780
agttatgttg tatcatcaag gttgttacgc cggaggtaca gtgcttagaa ctgctaagga 6840
tttggcagaa aataacgccg gtgctagggg tttagtcgtc tgcagtgaaa tcaactgtcg 6900
aactttcaga ggtccatcag aagatgctct agacagtttg gtcggacaag cattgtttgg 6960
cgatggatct tccgccgtaa ttgtaggcag cgatcctgat gtgtccattg aaagaccact 7020
atttcaatta gtttctgctg ctcaaaacttt tattccaaat tccgccgggtg ccatagcagg 7080
aaacttgaga gaagttgggt tgacttttca tttgtggcct aatgtcccaa ccttaatttc 7140
agaaaacatc gaaaaatgct taactcaagc ctttgaccca ttgggcataa gcgactggaa 7200
ctcattgttt tggattgctc atccaggtgg tccagcaatt ttagacgcag tggaggcaaa 7260
actaaactta gagaagaaaa agttggaagc tacaagacac gttctatcag agtatggcaa 7320
catgagctct gcctgcgttt tattcattct agatgagatg aggaagaagt ctttaaaggg 7380
tgaaaaagcc acaaccggag aaggtttaga ttgggggtgt ctatttggtt tccgtcctgg 7440
cttaacaatt gagacagtgg tgttacactc tgttccaact gtcactaact aatgaactag 7500
tatcgatgga ttacaaggat gacgacgata agatctgagc tcttaattaa caattcttcg 7560
ccagagggtt ggtcaagtct ccaatcaagg ttgtoggctt gtctaacttg ccagaaattt 7620
acgaaaagat ggaaaagggt caaatcgttg gtagatacgt tgttgacact tctaaataag 7680
cgaatttctt atgatttatg atttttatta ttaataaagt tataaaaaaa ataagtgtat 7740
acaaatttta aagtgactct taggttttaa aacgaaaatt cttattcttg agtaactott 7800
tcctgtaggt caggttgctt tctcaggtat agcatgaggt cgctcgaatt cgatatcaag 7860
cttatcgata ccgtcgagca attcttcgcc agaggtttgg tcaagtctcc aatgcaatgg 7920
cggccgctta cgttatcttc ctogctcact gactogctgc gctcggctgt tgggctgogg 7980
cgagcgggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 8040
gcaggaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccggc 8100
ttgctggcgt ttttccatag gctcggcccc cctgacgagc atcacaaaaa togacgctca 8160
agtcagaggt ggcgaaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgttccc ccctggaagc 8220
tcctcgtgct gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc gcctttctc 8280
ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag 8340
gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc 8400
ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggttaagc acgacttatc gccactggca 8460
gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg 8520
aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg 8580
aagccagtta ccttcgaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaca aaccacgct 8640

ES 2 665 258 T3

ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 8700
 gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa 8760
 gggatthttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 8820
 tgaagthtta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc 8880
 ttaatcagtg aggcaacctat ctacagcgtc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga 8940
 ctgccctctg ttagataaac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgcctga 9000
 atgataccgc gagaccacg ctacccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc 9060
 ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat 9120
 tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagthaata gtttgccgaa cgttggtgcc 9180
 attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggtg tggcttcatt cagctccggt 9240
 tcccaacgat caaggcaggt tacatgatcc cccatggtgt gaaaaaaagc ggttagctcc 9300
 ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg 9360
 gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt 9420
 gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg 9480
 gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgtc catcattgga 9540
 aaagcttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg 9600
 taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg 9660
 tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaaggga taagggcgac acggaaatgt 9720
 tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc 9780
 atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca 9840
 tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat 9900
 aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt c 9931

<210> 184
 <211> 8553
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> plásmido

10

<400> 184
 ccgattatth aaagctgcag catacगतat atatacatgt gtatatatgt atacctatga 60
 atgtcagtaa gtatgtatac gaacagtatg atactgaaga tgacaaggta atgcatcatt 120
 ctatacgtgt cattctgaac gagggcgcgt ttcctttttt ctttttgctt tttctttttt 180
 tttctcttga actcgacgga tcaaccctta atataacttc gtataatgta tgctatacga 240
 agttattagg ttgcgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaaat accgcatcag 300

ES 2 665 258 T3

gaaattgtaa gcgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta aatcagctca 360
 ttttttaacc aatagggcga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag 420
 atagggttga gtgttggtcc agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc 480
 aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcaccc 540
 taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaacc taaagggagc 600
 ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa 660
 gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc 720
 acaccgccc cgcttaatgc gccgctacag ggcgcgtcca ttcgccattc aggtgctgca 780
 actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgtatt acgccagctg gcgaaagggg 840
 gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtoa cgacgttgta 900
 aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg cgaattggag ctccaccgcg 960
 gcttcgagcg tcccaaaaacc ttctcaagca aggttttcag tataatgta catgctgaca 1020
 cgcgtctgta cagaaaaaaa agaaaaattt gaaatataaa taacgttctt aatactaaca 1080
 taactataaa aaaataaata gggacctaga cttcaggttg totaactcct tccttttcgg 1140
 ttagagcgga tcttagctag ccgcggtacc aagcttactc gagtcattct tccaatcttc 1200
 tcaatagata ttcaacctct acttcttttg taatgggtat tacaattctt ttatatattt 1260
 taaccaaaata ttcgggagta atcctccttt caccagattc gttggttggg tcaacaccgt 1320
 aaacttcagc ctttttagtc aatctttcta agattttctc ttccacagca gaatttgta 1380
 tatttttcat aattccttct acatccttac ttttaattaa tttagtgtac aaaggtatat 1440
 cagattgaaa tttagcctct gcaacaaatt taccaaatg tattcttcta gacaacgatt 1500
 gtagacactc aatgtctcta gttgcaacgg atgaaaaatt gttcttgtca tctccatccc 1560
 tcttagatat caggggtatt atcttttcaa tataaacctt ctttatctta tcattgtagt 1620
 ttacttctgg agcatatggt gccaaagattt gagggtaatt aattgaagga agaaatgatt 1680
 tttgaatctt gtctgggaag aatgggtct catctgggga ttcaaactt ctgatcctag 1740
 aatgtgctat ctcaagatta ctcaatgcc agtccaaaa cgagccttta aaatttgga 1800
 tctetaatcc aggggtgatta gcttcgtaaa cacttgggca tgtggcaaaa tggcttcttt 1860
 ctatgaattt aaaaataata ctgtcttcca tcctcaccaa ttcactcteta atattttgta 1920
 ggtttaaac cgtttctggc tttgtaaaat ccatgtcgac gcccgggccc tatagtgagt 1980
 ctagaatccg tcgaaactaa gttctgggtgt tttaaaacta aaaaaagac taactataaa 2040
 agtagaattt aagaagtta agaaatagat ttacagaatt acaatcaata cctaccgtct 2100
 ttatatactt attagtcaag taggggaata atttcagga actggtttca acotttttt 2160
 tcagcttttt ccaaatcaga gagagcagaa ggtaatagaa ggtgtaagaa aatgagatag 2220
 atacatgctg ggtcaattg ccttgtgtca tcatttactc caggcagggt gcacactcc 2280

ES 2 665 258 T3

attgaggttg tgcccgtttt ttgcctgttt gtgcccctgt tctctgtagt tgcgctaaga 2340
 gaatggacct atgaactgat ggttggtgaa gaaaacaata ttttggtgct gggattcttt 2400
 tttttctgg atgccagctt aaaaagcggg ctccattata tttagtggat gccaggaata 2460
 aactgttcac ccagacacct acgatgttat atattctgtg taaccocgcc cctattttgg 2520
 gcatgtacgg gttacagcag aattaaaagg ctaatttttt gactaaataa agttaggaaa 2580
 atcactacta ttaattatth acgtattctt tgaatggcg agtattgata atgataaact 2640
 gagctcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta 2700
 atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa 2760
 tgtgagttac ctcaactcatt aggcaaccca ggetttacac tttatgcttc cggctcctat 2820
 gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta 2880
 cgccaagcgc gcaattaacc ctcaactaaag ggaacaaaag ctggagctca tagcttcaaa 2940
 atgtttctac tcttttttta ctctccaga ttttctcgga ctccgcgcat cgccgtacca 3000
 cttcaaaaaca cccaagcaca gcatactaaa tttcccctct ttcttctctt aggggtgctgt 3060
 taattaoccg tactaaaggt ttgaaaaga aaaaagagac cgcctogttt cttttcttc 3120
 gtcgaaaaag gcaataaaaa tttttatcac gtttcttttt cttgaaaatt tttttttga 3180
 tttttttctc tttcgatgac ctcccattga tatttaagtt aataaacggg cttcaatttc 3240
 tcaagtttca gtttcatttt tcttgttcta ttacaacttt ttttacttct tgctcattag 3300
 aaagaaagca tagcaatcta atctaagttt tctagaacta aagggcggcc gatgtcagag 3360
 tctccaatgt ttgocgcaa tggatgcct aagggttaatc aaggtgctga agaagacgtg 3420
 agaatactag gctatgatcc attagcaagt ccagcattac tacaagtgca aatccccgcc 3480
 actcctactt ccttagagac tgccaaaaga ggtaggagag aagctattga tatcattact 3540
 ggtaaagatg atagagtgct agtgatagta ggacatggt caattcatga tttggaagcc 3600
 gcccaagaat atgctttgag attgaaaaag ttgagcgatg aattgaaagg agatctgtcg 3660
 ataataatga gagcttacct ggaaaaacca agaactactg ttggttgaa aggtttaatt 3720
 aacgatocctg atgttaataa caccttcaat attaacaagg gattgcaatc ggctagacaa 3780
 cttttcgtca atttgaccaa catcggctca cctattgggt cagaaatggt agataccatc 3840
 agccctcaat acctagccga tcttgttagt ttcggcgcaa taggcgctag aacaacggag 3900
 tctcaacttc atagagaatt ggccctcggg ttgtctttcc ctggtggctt caaaaatggg 3960
 accgacggta ctctaaatgt tgctgtggat gcctgtcaag cagctgccca ttctcatcat 4020
 ttcatgggtg taactttaca cgggtttgca gcaatcacia ctacaaaagg caacgaacat 4080
 tgctttgtta tattaagagg cggaaagaaa ggtaccaatt atgacgctaa atccgtcgtc 4140
 gaggctaagg caccaattacc tgctggttcg aatggtttaa tgattgacta ctctcatggc 4200

ES 2 665 258 T3

aatagtaata aggatttcag aaatcagcct aaagttaacg acgttgtttg tgaacaaatc 4260
gcaaacgggtg aaaacgcaat aactgggtgc atgatcgaat cgaatatcaa tgaaggaaat 4320
caaggtattc ctgctgaggg caaggcaggc ttgaaatacg gtgtttccat tacagatgcc 4380
tgtattggat gggaaactac tgaagatggt cttagaaagt tggctgctgc agtgagacia 4440
agaagagagg taaataagaa gtagagatct gagctcttaa ttaacaattc ttcgccagag 4500
gtttggtcaa gtctccaatc aaggttgctg gcttgctctac cttgccagaa atttacgaaa 4560
agatggaaaa gggtaaaatc gttggtagat acgttggtga cacttctaaa taagcgaatt 4620
tcttatgatt tatgattttt attattaaat aagttataaa aaaaataagt gtatacaaat 4680
tttaaagtga ctcttaggtt ttaaaacgaa aattcttatt cttgagtaac tctttcctgt 4740
aggtcaggtt gctttctcag gtatagcatg aggtcgcctg aattcgatat caagcttacc 4800
gataccgtcg agcaattctt cgccagaggt ttggccaagt ctccaatgca atggcggccg 4860
cttacgttat ctctctcgtc cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg 4920
gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga 4980
aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg 5040
gcgtttttcc ataggtcgg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag 5100
aggtggcgaa acccgacagc actataaaga taccagggct tccccctgg aagctcctc 5160
gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgctt tctcccttcg 5220
ggaagcgtgg cgctttctca atgctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt 5280
cgctccaagc tgggtgtgt gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg cgcttatcc 5340
ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc 5400
actggtaaac ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg 5460
tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttgta tctgcgctct gctgaagcca 5520
gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc 5580
ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgdcagaa aaaaaggatc tcaagaagat 5640
cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcagc ttaagggatt 5700
ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt 5760
tttaaataca tctaaagtat atatgagtaa acttggctcg acagttacca atgcttaatc 5820
agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactgccc 5880
gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gcccagtgcc tgcaatgata 5940
ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaag 6000
gccgagcgca gaagtggctc tgcaacttta tccgctcca tccagtctat taattggtgc 6060
cgggaagcta gagtaagtag ttccgaggtt aatagtttgc gcaacggtgt tgccattgct 6120
acaggcatcg tgggtgcacg ctgctcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa 6180

ES 2 665 258 T3

cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgaaaaa aagcggttag ctcttcgggt	6240
cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggg tatggcagca	6300
ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac	6360
tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca	6420
atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt	6480
tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct	6540
actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca	6600
aaaacaggaa ggcaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata	6660
ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttacc agggttattg tctcatgagc	6720
ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc	6780
cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat	6840
aggcgtatca cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcggtg atgacggtga aaacctctga	6900
cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa	6960
gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgcccga	7020
tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat gttggaataa aaatcaacta tcatctatta	7080
actagtattt acattactag tatattatca tatacgggtg tagaagatga cataaatgat	7140
gagaaacagt catctaaatt agtggaaagct gaaatgcaag gattgataat gtaataagat	7200
ctatgaataa catataaac gaaaagagga ataatcataa tattatatgt agaaatatag	7260
attccctttt gtggattcct atatoctcga ggagaacttc tagtatattc tgtataocta	7320
atattatagc ctttatcaac aatggaatcc caacaattat ctcaaaattc acctatttct	7380
caaaccctta atataacttc gtataatgta tgctatacga agttattagg taattcccgt	7440
tttaagagct tggtagcgc taggagtcac tgccaggtat cgtttgaaca cggcattagt	7500
cagggaagtc ataacacagt cctttcccgc aattttcttt ttctattact cttggcctcc	7560
tctagtacac tctatatttt tttatgcctc ggtaatgatt ttcatttttt tttttcccct	7620
agcggatgac tctttttttt tcttagcgat tggcattatc acataatgaa ttatacatta	7680
tataaagtaa tgtgatttct tcgaagaata tactaaaaaa tgagcaggca agataaacga	7740
aggatgggta aggaaaagac tcacgtttcg aggcccgcat taaattccaa catggatgct	7800
gatttatatg ggtataaatg ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc gacaatctat	7860
cgattgtatg ggaagccga tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt	7920
gccaatgatg ttacagatga gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt	7980
ccgaccatca agcattttat ccgtactcct gatgatgcat ggttactcac cactgcgac	8040
cccggcaaaa cagcattcca ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga aaatattggt	8100

ES 2 665 258 T3

	gatgcgctgg cagtgttcct gcgccggttg cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt	8160
	aacagcgate gcgtatttcg tctcgctcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt	8220
	gatgcgagtg attttgatga cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa	8280
	atgcataagc ttttgccatt ctcaccgat tccagtcgtca ctcattggtga tttctcactt	8340
	gataacotta tttttgacga ggggaaatta ataggttgta ttgatgttgg acgagtcgga	8400
	atcgagacc gataccagga tcttgccatc ctatggaact gcctcgggtga gttttctcct	8460
	tcattacaga aacggctttt tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg	8520
	cagtttcatt tgatgctcga tgagtttttc taa	8553
	<210> 185	
	<211> 333	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia delta TY	
10	<400> 185	
	tgttggaata aaaatcaact atcatctatt aactagtatt tacattacta gtatattatc	60
	atatacgggtg ttagaagatg acataaatga tgagaaacag tcatctaaat tagtggaagc	120
	tgaaatgcaa ggattgataa tgtaataaga tctatgaata acatataaaa cgaaaagagg	180
	aataatcata atatttatg tagaaatata gattcccttt tgtggattcc tatatcctcg	240
	aggagaactt ctagtatatt ctgtatacct aatattatag cctttatcaa caatggaatc	300
	ccaacaatta tctcaaaatt cacctatttc tca	333
	<210> 186	
15	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Botrytis cinerea	
	<400> 186	
	Met Pro Glu Leu	
20	1	
	<210> 187	
	<211> 4	
	<212> PRT	
25	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Transportador ABC	
30	<400> 187	
	Met Pro Glu Ile	
	1	
	<210> 188	
	<211> 4	
35	<212> PRT	
	<213> Desconocido	
	<400> 188	
	Thr Glu Glu Leu	
40	1	
	<210> 189	

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Botrytis cinerea

5 <400> 189
 Gln Ala Met Gln Gln Gln Ser Asp Lys Asp
 1 5 10

<210> 190
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Transportador ABC

15 <400> 190
 Gln Ala Met Arg Glu Gln Gly Glu Lys Asp
 1 5 10

20 <210> 191
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

25 <220>
 <223> Transportador ABC

<400> 191
 Gln Ala Ile Arg Asn Gln Glu Glu Lys Asp
 1 5 10

30 <210> 192
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

35 <220>
 <223> Transportador ABC

<400> 192
 Lys Gln Thr Gln Gln Gln Asn Glu Asn Asp
 1 5 10

40

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo recombinante que produce y excreta al medio de cultivo un estilbenoide como producto metabolito cuando se cultiva en condiciones de producción de estilbenoide, cuyo microorganismo tiene genes que codifican enzimas que constituyen una ruta metabólica para la producción de dicho estilbenoide y un transportador ABC que transporta dicho estilbenoide fuera de dicho microorganismo a dicho medio de cultivo, en donde dicho transportador es exógeno a dicho microorganismo o dicho gen que codifica dicho transportador es endógeno y está presente en un número de copias mayor que en el microorganismo nativo y/o está bajo el control de un promotor más fuerte de modo que dicho gen endógeno se exprese a un nivel más alto que el nivel de expresión nativo,
- 5 en donde dicho microorganismo tiene genes que codifican las enzimas:
- 10 - fenilalanina amoniaco liasa, 4-cumarato-CoA ligasa y estilbeno sintasa; y/o
- fenilalanina amoniaco liasa, cinamato 4-hidroxilasa, 4-cumarato-CoA ligasa y estilbeno sintasa; y/o
- tirosina amoniaco liasa, 4-cumarato-CoA ligasa y estilbeno sintasa; y/o
- tirosina amoniaco liasa, cinamato 4-hidroxilasa, 4-cumarato-CoA ligasa y estilbeno sintasa.
- 15 2. Un microorganismo como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho transportador ABC es el producto de expresión del gen *SNQ2* de *Saccharomyces cerevisiae* o es el producto de expresión del gen *BcatrB* de *Botrytis cinerea*.
3. Un microorganismo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el estilbenoide producido es resveratrol.
- 20 4. Un microorganismo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.
5. Un microorganismo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde un gen que expresa dicho transportador está bajo el control de un promotor que proporciona expresión constitutiva o es endógeno y está presente en un número de copias superior al del microorganismo nativo.
- 25 6. Un microorganismo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los genes *Aro4* y/o *Aro7* se expresan en exceso.
7. Un microorganismo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gen *ACC1* se expresa en exceso.
- 30 8. Un microorganismo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el genoma del microorganismo produce un fenotipo auxótrofo cuyo fenotipo auxótrofo es compensado por al menos un producto de expresión de un plásmido de múltiples copias autorreplicante o plásmido integrativo presente en dicho microorganismo, cuyo plásmido también expresa una o más enzimas que participan en una ruta metabólica que produce dicho estilbenoide, y en donde al menos uno de dichos productos de expresión del plásmido está genéticamente modificado para incluir una secuencia de etiqueta de ubiquitinación.
- 35 9. Un microorganismo como se reivindica en la reivindicación 8, en donde dicha secuencia de etiqueta de ubiquitinación es una prolongación C-terminal de dicho producto de expresión que tiene una de las siguientes secuencias:
- ACKNWFSSLSHFVIHL
- SLISLPLPTRVKFSSLLLIRIMKIIITMTFPKKLRS
- FYYPIWFARVLLVHYQ
- SNPFSSLFGASLLIDSVSLKSNWDTSSSSCLISFFSSVMFSSTTRS
- CRQRFSCHLTASYPQSTVTPFLAFLRRDFFFLRHNSAD
- GAPHVVLDFDFELRITNPLSHIQSVSLQITLIFCSLPSLILSKFLQV
- NTPLFSKSFSTTCGVAKKTLLLAQISSLFFLLLSSNIAV
- PTVKNSPKIFCLSSSPYLAFNLEYLSLRIFSTLSKCSNTLLTSL
- SNQLKRLWLWLLVRSFDRTLRRPWIIHLPS
- SISFVIRSHASIRMGASNDFHKLKLYFTKCLTSVILSKFLIHLLLRSTPRV
10. Un microorganismo como se reivindica en la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde dicho producto de

expresión que porta la secuencia de etiqueta de ubiquitinación es el producto de expresión del gen. *ura3*, *his3*, *trp1*, *leu2*, *lys2*, o *met15*.

- 5 11. Un microorganismo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la expresión en el microorganismo de una enzima que participa en el catabolismo de la fenilalanina por la ruta de Ehrlich se reduce en comparación con su nivel de expresión nativo.
12. Un microorganismo como se reivindica en la reivindicación 11, en donde dicha enzima es una fenilpiruvato descarboxilasa.
13. Un microorganismo como se reivindica en la reivindicación 11 o 12, en donde un gen que expresa dicha enzima se elimina o se desactiva funcionalmente.
- 10 14. Un microorganismo como se reivindica en las reivindicaciones 11 a 13, en donde dicha enzima es *Aro10*.
- 15 15. Una biomasa seca de un microorganismo recombinante como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
16. Un alimento para animales que comprende un microorganismo recombinante como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o una biomasa seca como se reivindica en la reivindicación 14.

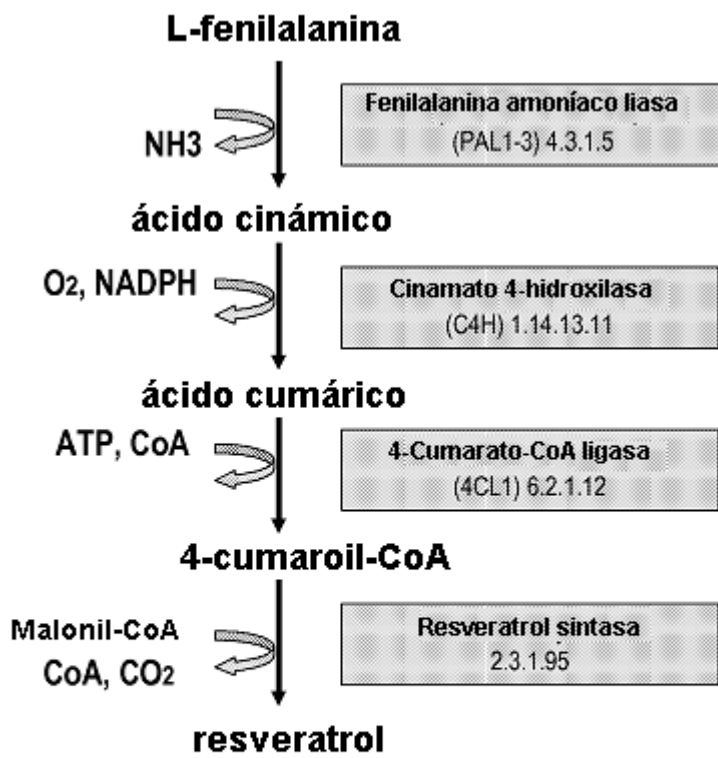


Figura 1

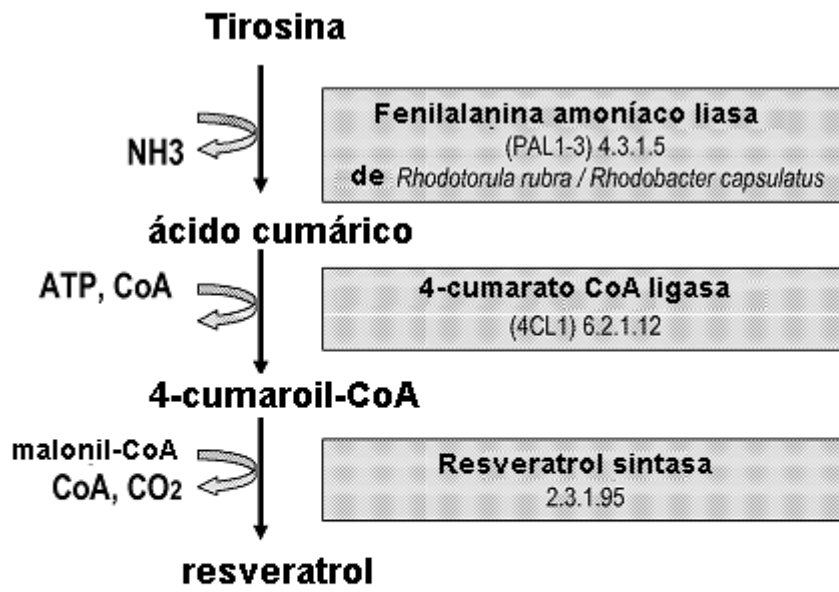


Figura 2

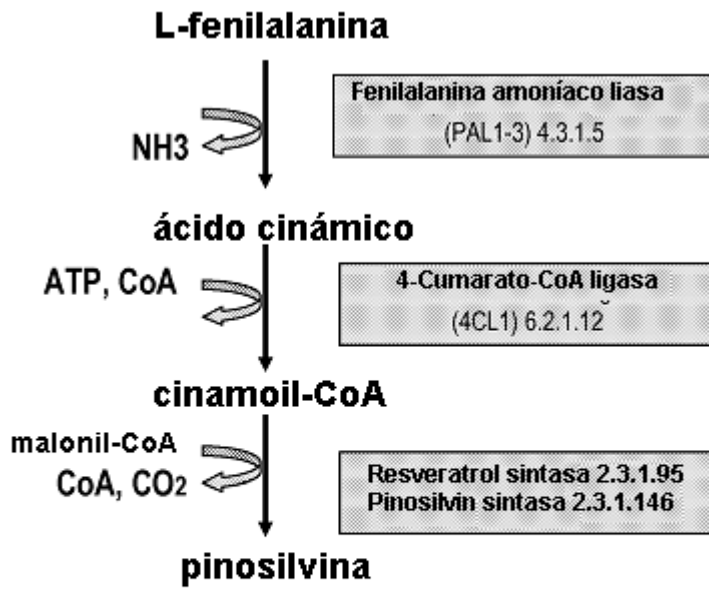


Figura 3

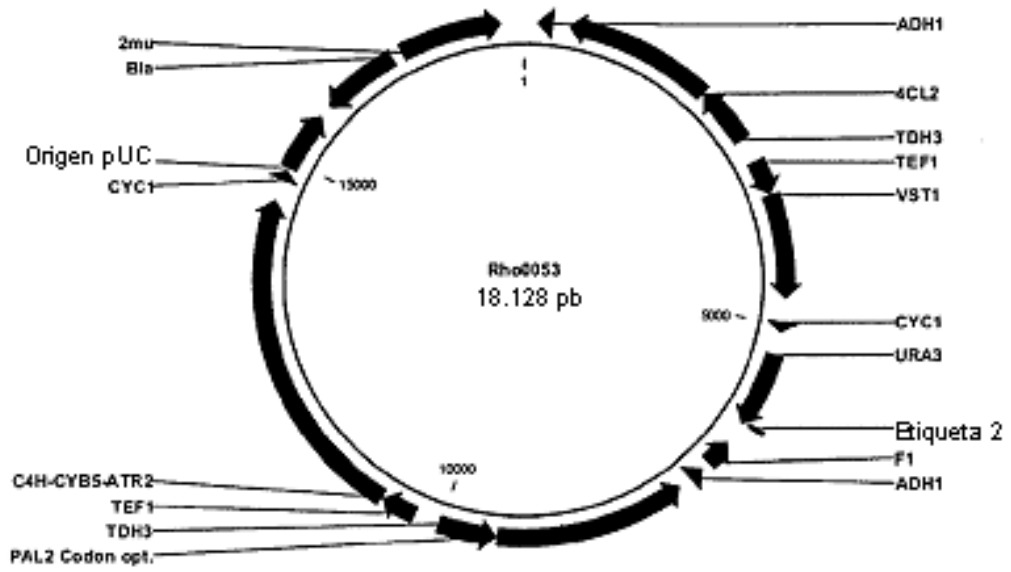


Figura 4

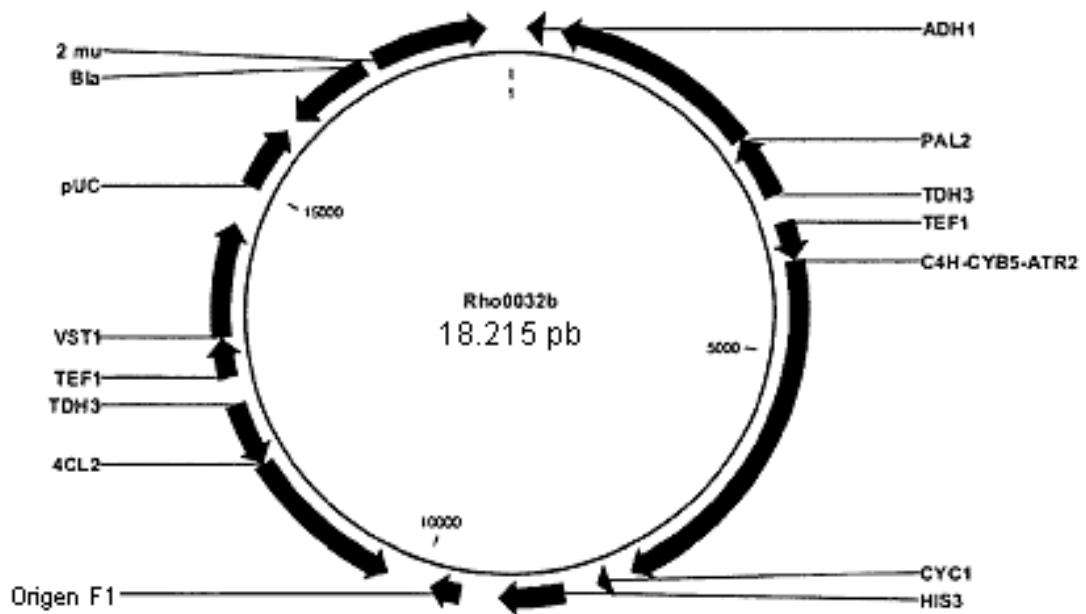


Figura 5

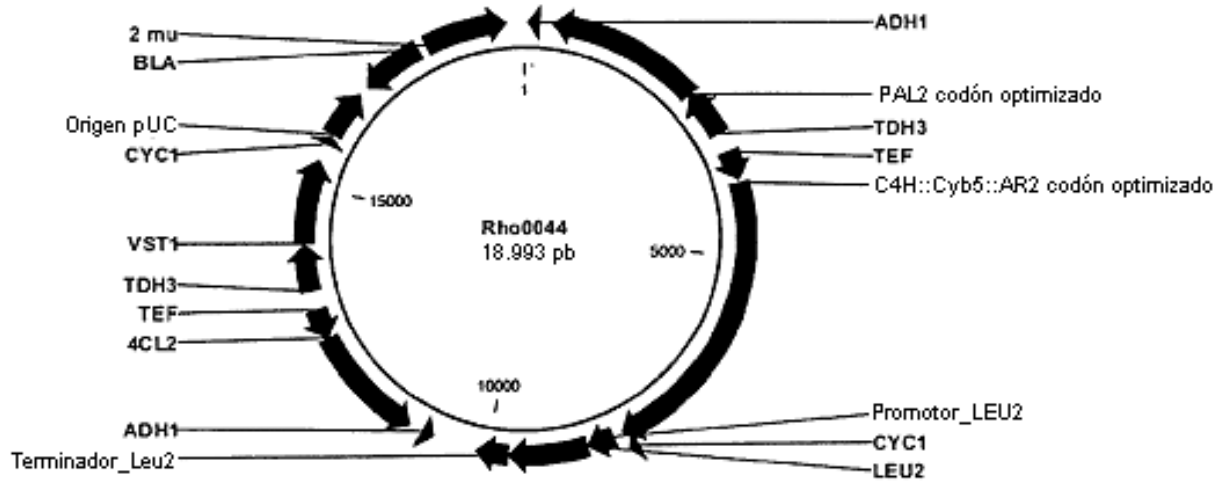


Figura 6

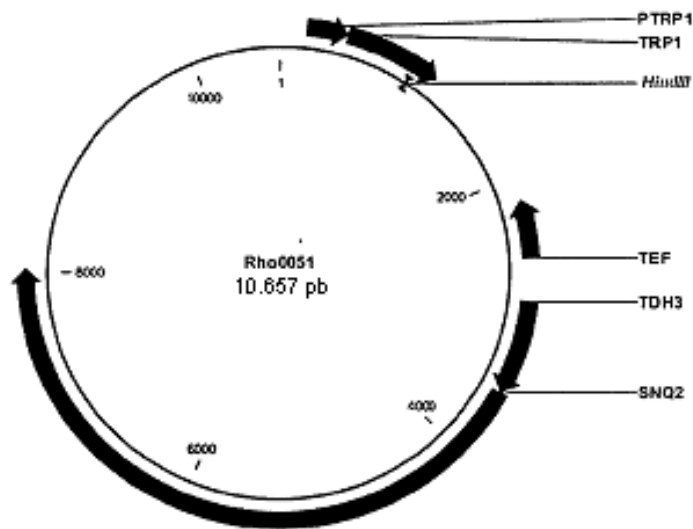


Figura 7

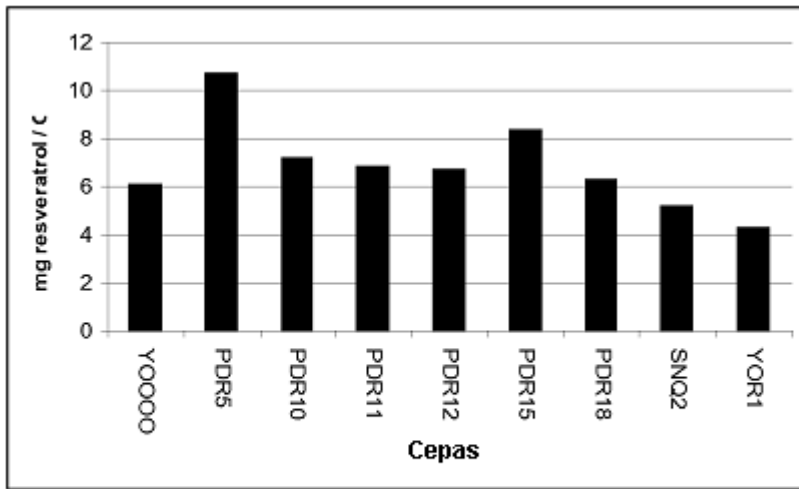


Figura 8

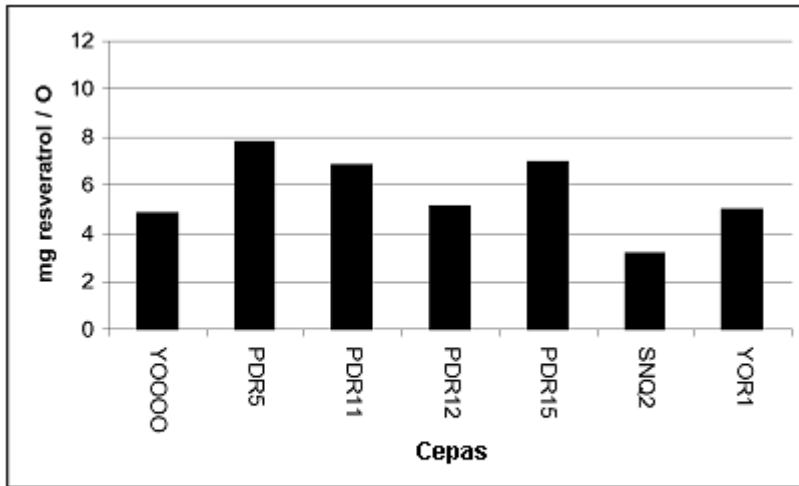


Figura 9

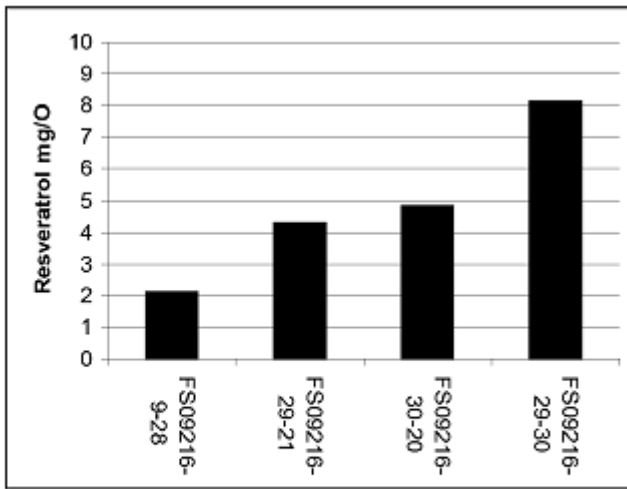


Figura 10

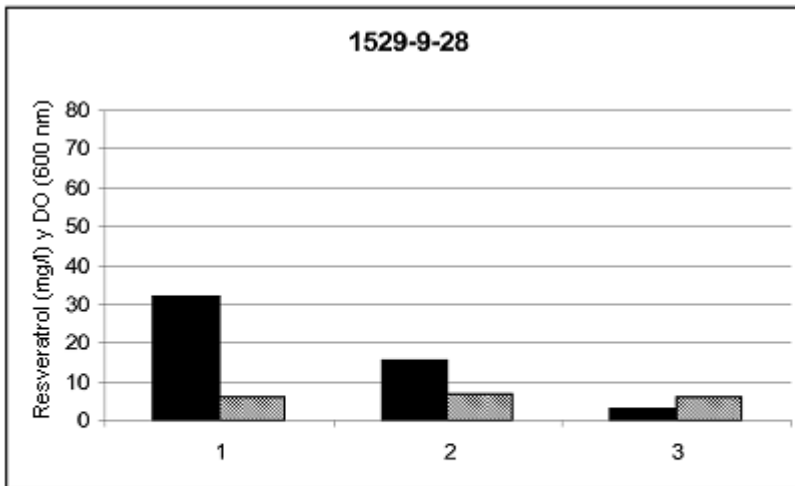


Figura 11

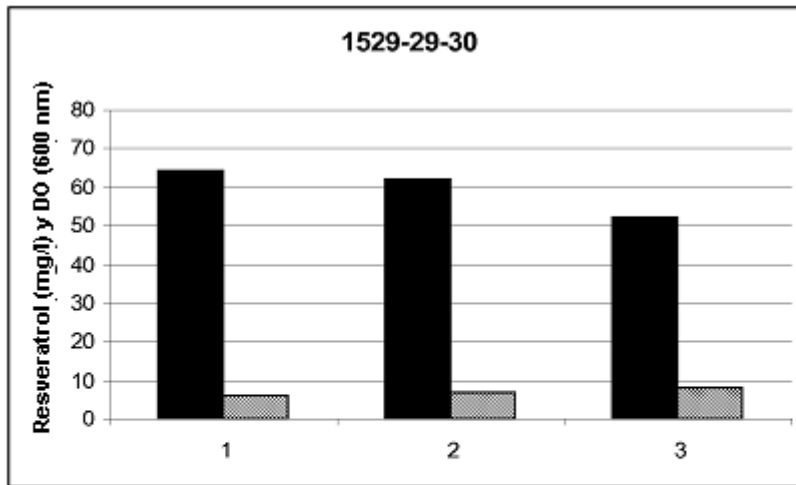


Figura 12

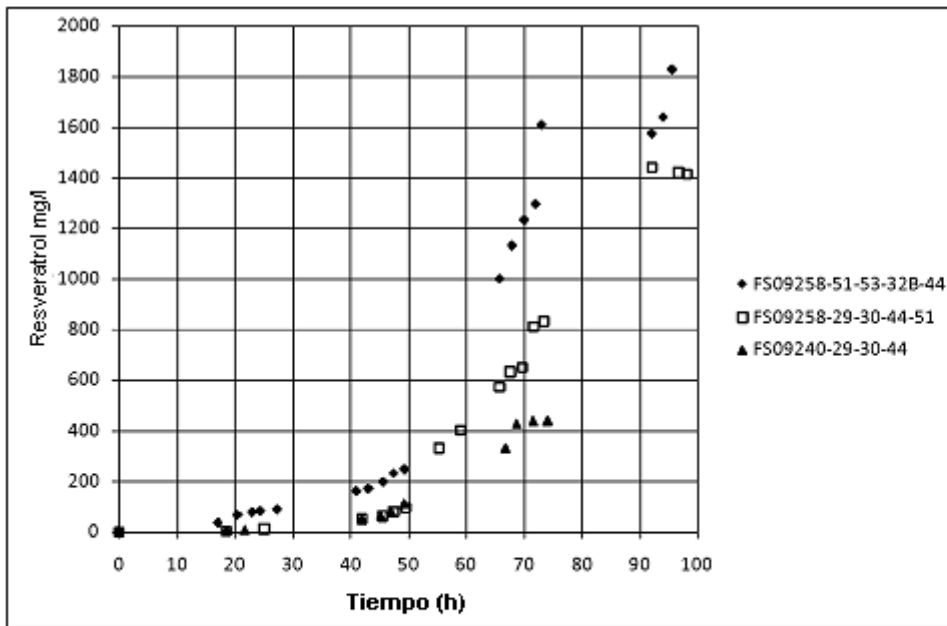


Figura 13

```

      20      40
T G T T G G A A T A A A A A T C A A C T A T C A T C T A T T A A C T A G T A T T T A C A T T A C T A G T A T A T
      60      80      100
T A T C A T A T A C G G T G T T A G A A G A T G A C A T A A A T G A T G A G A A A C A G T C A T C T A A A T T A
      120      140      160
G T G G A A G C T G A A A T G C A A G G A T T G A T A A T G T A A T A Bgl G A T C T A T G A A T A A C A T A T A A
      180      200      220
A A C G A A A A G A G G A A T A A T C A T A A T A T T A T A T G T A G A A A T A T A G A T T C C C T T T T G T G
      240      260      280
G A T T C C T A T A T C C T Xho C G A G G A G A A C T T C T A G T A T A T T C T G T A T A C C T A A T A T T A T A G
      300      320
C C T T T A T C A A C A A T G G A A T C C C A A C A A T T A T C T C A A A A T T C A C C T A T T T C T C A
    
```

Figura 14

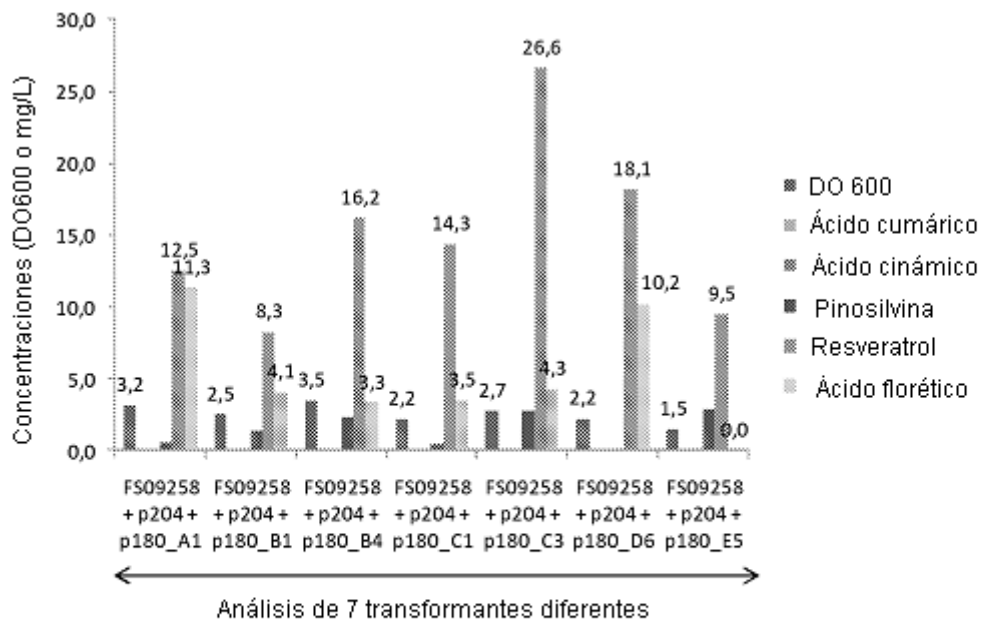


Figura 15

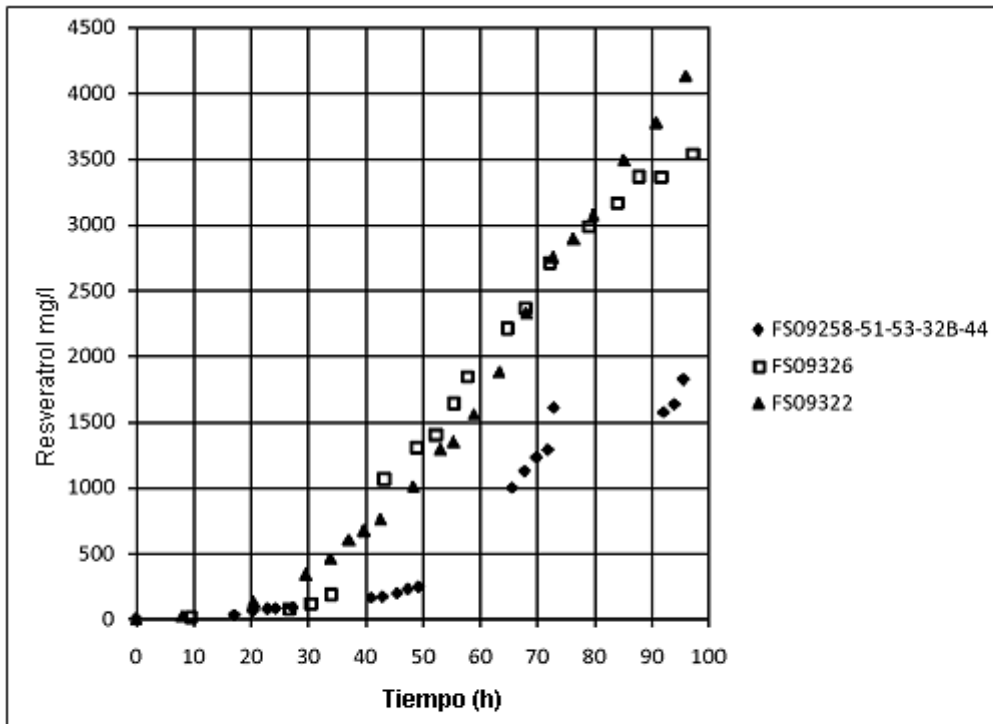


Figura 16

