

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 689**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C07C 13/38 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2015 PCT/US2015/063656**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16094178**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2015 E 15867372 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3242937**

54 Título: **Métodos para producir abienol**

30 Prioridad:

09.12.2014 US 201462089511 P

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

20.05.2020

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

ROYER, JOHN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 761 689 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

Métodos para producir abienol

Realizaciones de la presente divulgación se refieren a nuevos métodos para la producción de abienol y de vectores de expresión y células huésped útiles en dichos métodos.

- 5 Con una economía mundial cada vez mayor y la petición de un mayor nivel de vida, la demanda de fragancia está en aumento. Sin embargo, los suministros de fragancias de origen animal o vegetal son limitados, debido a restricciones en los recursos naturales y la protección animal. Se han realizado intentos para producir fragancias o sus precursores a partir de fuentes renovables tales como microorganismos.

10 El ámbar gris es un ingrediente de fragancia preciado y tradicional, que es un subproducto del intestino de la ballena. Ambrox, un sustituto del ámbar gris, se produce mediante una conversión química del diterpeno esclareol, que actualmente se obtiene de la salvia. Ambrox también se puede generar a partir del diterpeno abienol relacionado, que se ha encontrado en el abeto y el tabaco (Barrero et al. 1993, Tetrahedron 49: 10405-10412). Véase también la **Figura 1**.

15 Se propone que las vías tanto a abienol como a esclareol en plantas implican dos etapas. La primera etapa consiste en la conversión de la molécula de la vía isoprenoide difosfato de geranylgeranilo (GGPP) en un compuesto intermedio común denominado difosfato de labda-13-en-8-ol (LDPP) a través de la actividad de una diterpeno sintasa de clase II (diTPS). La segunda etapa es catalizada por una diTPS de clase I. Hay varios tipos de diTPS de clase I, cada uno responsable de producir un producto final específico. Por ejemplo, la abienol sintasa (ABS) es para la producción de abienol, y la esclareol sintasa (Scs) es responsable de la producción de esclareol. Véase la **Figura 2**.

20 Las enzimas implicadas en la conversión de dos etapas de GGPP en esclareol o GGPP en abienol son específicas para las plantas y pueden ser en forma de dos enzimas independientes o una sola enzima con dos sitios activos. Por ejemplo, en la producción de abienol por parte del tabaco (Sallaud et al. 2012, Plant J., 72(1):1-17), la diTPS de clase II del tabaco (a la que se alude como NtCPS2 por Sallaud et al., y a la que se alude como Nt-diTPS de clase II por la presente divulgación) y la diTPS sintasa del tabaco de clase I (a la que se alude como abienol sintasa del tabaco o Nt-ABS por la presente divulgación), están en forma de dos moléculas de proteínas diferentes. De manera similar, en la producción de esclareol por la salvia (Schalk et al. 2012, Journal of Am. Chem Soc. 134:18900-18903); (Caniard et al. 2012, BMC Plant Biology 12:119), la diTPS de clase II de salvia (a la que se alude como Ss LPS por Schalk et al., y a la que se alude como Ss-diTPS de clase II por la presente divulgación) y la diTPS sintasa de clase I de salvia (a la que se alude como esclareol sintasa de salvia o Ss-Scs por la presente divulgación), también están en forma de dos moléculas de proteínas independientes. En contraposición, en la producción de abienol por parte del abeto (Zerbe et al. 2012, J. Biol. Chem. 287:12121-12131; documento US20130224809), ambas subunidades diTPS de clase I y clase II residen en una abienol sintasa de clase I/II bifuncional (a la que se alude como AbCAS por Zerbe et al. y por la presente divulgación). Por lo tanto, en el abeto, GGPP se convierte en abienol en presencia de la abienol sintasa de clase I/II bifuncional. Véase la **Figura 2**.

35 Se considera que fuentes vegetales para esclareol y abienol son poco fiables; por lo tanto, un procedimiento para la producción microbiana de cualquiera de los productos podría tener un valor comercial. Las diTPS de clase II y los genes esclareol sintasa de salvia se han aislado y expresado simultáneamente en *E. coli*, lo que da como resultado títulos de aproximadamente 1,5 gramos por litro de esclareol en fermentadores a escala de laboratorio. La producción mensurable en *E. coli* de abienol se ha logrado mediante la expresión simultánea de los genes diTPS de clase II y abienol sintasa del tabaco, o la expresión de abienol sintasa de abeto de clase I/II individual. Sin embargo, la producción de abienol basada en los métodos existentes es muy baja. Por lo tanto, podría ser deseable producir abienol a un título mucho más alto.

40 Los autores de la invención han encontrado ahora, sorprendentemente, un nuevo método para aumentar significativamente la velocidad de producción de abienol a partir de difosfato de geranylgeranilo (GGPP) en presencia de una combinación de una diterpeno sintasa de clase II y una abienol sintasa de clase I/II bifuncional. En una realización, la diTPS de clase II puede ser de tabaco o salvia, y la abienol sintasa de clase I/II bifuncional puede ser de abeto. De acuerdo con la presente invención, la diTPS de clase II anterior es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 1, o la diTPS de clase II anterior es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 2, combinados con la abienol sintasa de clase I/II bifuncional anterior que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 3.

5 En otra realización, la combinación de las diTPS de clase II y la abienol sintasa de clase I/II bifuncional es expresada por una célula huésped recombinante. En una realización, la célula recombinante es un microorganismo modificado genéticamente, modificado genéticamente para expresar al menos un polipéptido exógeno seleccionado del grupo que consiste en la diTPS de clase II anterior y la abienol sintasa de clase I/II bifuncional. En una realización, la célula huésped comprende al menos un ácido nucleico que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en dicha diTPS de clase II y dicha abienol sintasa de clase I/II bifuncional.

10 En una realización, la célula huésped recombinante es un hongo. En otra realización, la célula huésped recombinante es un hongo *Yarrowia*. En una realización específica, la célula huésped recombinante es *Yarrowia lipolytica*.

15 En otro aspecto de la divulgación, la presente invención se dirige a una célula huésped recombinante que comprende un diterpeno sintasa de clase II y una abienol sintasa de clase I/II bifuncional. En una realización, la diTPS de clase II puede ser de tabaco o salvia, y la abienol sintasa de clase I/II bifuncional puede ser de abeto. En otra realización, la diTPS de clase II anterior puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 1. En otra realización, la diTPS de clase II anterior puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 2. En otra realización, la abienol sintasa de clase I/II bifuncional anterior puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 3.

20 En una realización, la célula huésped recombinante es un hongo. En otra realización, la célula huésped recombinante es un hongo *Yarrowia*. En una realización específica, la célula huésped recombinante es *Yarrowia lipolytica*.

25 En otro aspecto de la divulgación, la presente invención está dirigida a un vector de expresión que comprende una molécula de polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1 y una molécula de polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 3.

30 En otro aspecto de la divulgación, la presente invención está dirigida a un vector de expresión que comprende una molécula de polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 2 y una molécula de polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 3.

En una realización, una o ambas de las moléculas de polinucleótido arriba descritas están operativamente enlazadas a una secuencia control de la transcripción.

35 Las secuencias de ácidos nucleicos enumeradas en el listado de secuencias que se acompaña se muestran utilizando abreviaturas de letras estándar para bases de nucleótidos. Solo se muestra una cadena de cada una de las secuencias de ácidos nucleicos, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena mostrada. En la lista de secuencias que se acompaña:

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos que codifica la diterpeno sintasa de clase II de *Nicotiana tabacum*

MQVIITSSHRFFCHHLHQLKSPTSLSAQKAEFKKHGPRNWLFQTEGSLLYKPVRLNCATS
 DASYLGNVNEYLES D HSKNSEEKDIQVSRTIQMKGLTEEIKHMLNSMEDGRLNVLAYD
 TAWVSFIPNTTNGNDQRPMFSPCLQWIIDNQLSDGSGWEEIVFCIYDRLLNTLVCVIAL
 TLWNTCLHKRNKGVMFIKENLSKLETGEVENMTSGFELVFPTLLEKAQQLDIDIPYDAP
 VLKDIYARREVKLTRIPKDVIIHTIPTTVLFSLEGLRDDLDWQRLKLLQMPDGSFLISPAST
 AFAFMETNDEKCLAYLQNVVEKSNGGARQYPFDLVTRLWAIDRLQRLGISYFFAEFEFK
 ELLNHVFRYWDEENGIFSGRNSNVSDVDDTCMAIRLLRLHGVDVSPDALNNFKDGDQF
 VCFRGEVDGSPTHMFNLYRCSQVLFPGEKILEEAKNFTYNFLQQCLANNRCLDKWVIA
 KDIPGEIWWYALEFPWYASLPRVEARYYIEQYGGADDIWIGKTLYRMPDVNNNVYLQAA
 KLDYNRCQSQRHFEWLIMQEWFEKCNFQQFGISKKYLLVSYFLAAASIFEVEKSRERLA
 WAKSRIICKMITSYYNDEATTWTRNSLLMEFKVSHDPTRKNGNETKEILVLKNLRQFL
 RQLSEETFEDLGKDIHHQLQNAWETWLVFLREEKNACQEETELLVRTINLSGGYMTHE
 ILFDADYENLSNLTKVCGKLNELQNDKVTGGSKNTNIELDMQALVKLVFGNTSSNINQ
 DIKQTFFAVVKTFYSSAHVSEEIMNFHISKVLFQQV

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos que codifica la diterpeno sintasa de clase II de *Salvia sclarea*

MTSVNLSRAPAAIIRRLQLQPEFHAECWLKSSSKHAPFTLSCQIRPKQLSQIAELRVTS
 LDASQASEKDISLVQTPHKVEVNEKIEESIEYVQNLLMTSGDGRISVSPYDTAVIALIKDL
 KGRDAPQFPSCLEWIAHHQLADGSGWDEFFCIYDRILNTLACVVALKSWNLQSDIIEKG
 VTYIKENVHKLKGANVEHRTAGFELVVPFTFMQMATDLGIQGLPYDHPLIKEIADTKKQR
 LKEIPKDLVYQMPTNLLYSLEGLGDLEWERLLKLSGNGSFLTSPSSTAAVLMHTKDEK
 CLKYIENALKNCDGGAPHTYPVDIFSRLLWAIDRLQRLGISRFFQHEIKYFLDHIESVWEET
 GVFSGRYTKFSDDTSMGVRLKMHGYDVPNVLKHFKQQDGKFCYIGQSVESASP
 MYNLYRAAQLRFPGEVFEATKFAFNFLQEMLVKDRLQERWVISDHLFDEIKLGLKM
 PWYATLPRVEAAYYLDHYAGSGDVWIGKSFYRMPEISNDTYKELAILDFNRCQTQHQL
 EWIHMQEWDRCSLSEFGISKRELLRSYFLAAATIFEPERTQERLLLAKTRILSKMITSFV
 NISGTTLSLDYNFNGLDEIISSANEDQGLAGTLLATFHQLLDGFDIYTLHQLKHVWSQWF
 MKVQQGEGSGGEDAVLLANTLNICAGLNEDVLSNNEYTALSTLTNKICNRLAQIQDNKI
 LQVVDGSIKDKLEQDMQALVKLVLQENGGAVDRNIRHTFLSVFKTFYDAYHDETT
 DLHIFKVL

- 5 La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos que codifica la abienol sintasa de clase I/II bifuncional de *Abies balsamea*

ES 2 761 689 T3

MALPVYSLKSHIPITTIASAKMNYTPNKGMITANGRSRRIRLSPNKIVACAGEADRTFPSQ
SLEKTALFPDQFSEKNGTPSNFTPPNREFPPSFWNNDIINSITASHKVQTGDRKRIQTLISEI
KNVFNMSMGDGETSPSAYDTAWVARIPAVDGSEQPQFPQTLEWILQNQLKDGSWGEEFY
FLAYDRLLATLACIITLIWRTGNVQLHKGIEFFRKQVVRMDDEADNHRPSGFEIVFPAM
LNEAKSLGLDLPYELPFIEQMVKKREAKLKMITTNVLYTIQTLLYSLEGLHEIVDFDKII
KLQSKDGSFLGSPASTAAVFMQTGNTKCLEFLEFVLRKFRNHVPSDYPLDLFERLWVVD
TVERLGIDRHFKKEIKDALDYVYSCWDERGIGWAKDSPIADIDDTAMGLRILRLHGYNV
SPDVLTFKDENGEFFCFMGQTQRGVTDMLNVYRCSQVAFPGETIMEEAKLCTERYLR
NALENADAFDKWAIKKNIRGEVEYALKYPWHRSMRLEVRSYIGNYGPNDVWLKSL
YMMPYISNEKYLELAKLDFNSVQSLHQEEIRELVRWCKSSGFTELKFTRDRVVETYFAV
ASSMFEPEFSTCRAVYTKISVLLVILDDLVDGYGSPDEIKLFSEAVKRWDLSLLEQMPDH
MKICFLGLYNTVNEVAEEGRKTQGHVDLGYIRNLWEIQLAAFTREAEWSQGKYVPSFD
EYIENAQVSGVATILLITILFTEEDDILSHIDYGSKFLRLASLTARLANDIKTYQEERAHGE
VVSAIQCYMKDRPEITEEEALKYVYGRMVNDLAE LNSEYLKSNEMPQNCKRLVFD TAR
VAQLFTMEGDGLTYSDTMEIKEHIKKCLFEPAT

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos que codifica el gen de la abienol sintasa de *Nicotiana tabacum*

MVLGLRSKIPLPDHKLGNIKLGSVTNAICHRPCRVRCSHSTASSMEEAKERIRETFGKIE
LSPSSYDTAWVAMVPSRYSMNQPCFPQCLDWILENQREDGSWGLNPSHPLLVKDSLSST
LASLLALRKWRIGDNQVQRGLGFIETHGWAVDNKDQISPLGFEIIFPCMINYA EKLNLDDL
PLDPNLVNMMLCERELTIERALKNEFEGNMANVEYFAEGLGELCHWKEMMLRQRHNG
SLFDSPATTAALYHQYDEKCFGYLNSILKLHDNWWPTICPTKIHSNLFLVDALQNLGV
DRYFKTEVKRVLDEIYRLWLEKNEEIFSDVAHCAMAFRLLRMNNYEVSSEELEGFVDQE
HFFTTSSGKLMNHVAILELHRASQVAIHERKDHILDKISTWTRNFMEQKLLDKHIPDRSK
KEMEFAMRKFYGTDFRVETRRYIESYKMDSFKILKAAYRSSGINNIDLLKFSEHDFNLCC
TRHKEELQQMKRWFTDCKLEQVGLSQQYLYTSYFIIAAILFEPEYADARLAYAKYAIIT
AVDDFFDCFICKEELQNIIEVERWEGYSTVGFRSERVRIFFLALYKMVEEIAAKAETKQ
GRCVKDHLINLWIDMLKCMLVELDLWKIKSTTPSIEEYLSVACVTIGVPCFVLTSLYLLG
PKLSKDVIESSEVSALCNCTAAVARLINDIHSYKREQAESSTNMVSILITQSQGTISEEEAI
RQIKEMMESKRRELLGMVLQNKESQLPQVCKDLFWTTINAAYSIIHGDGYRFPPEEFK
NHINDVIYKPLNQYSP

- 5 La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de ADN que codifica la diterpeno sintasa de clase II de *Nicotiana tabacum*, optimizada para la expresión en *Yarrowia lipolytica*

ES 2 761 689 T3

atgcaggttattattacctctcaccgattttctgccaccacctcaccagctcaagtcccctacctcccttctgctcagaaggctgagttta
agaagcacggccccgaaactggctttccagactgagggtctctctctttacaagcctgtccgactcaactgtgctacttctgatctcttac
cttggttaacgtgaacgagtagcttgagctgaccacttaagaactccgaggagaagatattcaggttcccgaactatccagatgaagggt
cttaccgaggagatcaagcacatgcttaactctatggaggacggacgacttaacgtcctcgcctacgacactgcttgggttctttattcctaa
cactaccaacaacggaaacgatcagcgacctatgttccctctgtctcagtggtatttgacaaccagcttctgatggttctggggagagg
agattgtttctgcafttacgaccgactccttaactctcgtttgtgtattgctctcactctctggaacttgccttcacaagcgaacaagggt
gtgatgtttatcaaggagaaccttttaagctggagactggtgaggtgagaacatgacttctggtttgagctgttttcccactctcttgaga
aggcccagcagctcgatattgacattccctacgatgctcctgtcctgaaggatattacgctcgacgagaggtaagctacccgaatcccta
aggagttatccacactattccactaccgttctctttctcttgaggactccgagatgacctcgaactggcagcagctcctgaagctccagat
gcctgacgggttcttctgatttcccctgctccactgcttctgcttcatggagactaacgatgagaagtgtcttgcctacctcagaacgttgtt
gagaagctcaacggaggtgcccgacagctaccctcagacttctgacttggccattgatcactccagcagctcggaaactcttact
actttcccaggaggtcaaggagcttctcaaccagctgttccgatactgggacgaggagaacggaafttctctggacgaaacttaacgttt
ctgatgttgatgacacttgcattgctatccgacttctccgacttccaggttacgatgttcccctgacgcccttaacaactcaaggacggcag
cagttcgtttctccgaggtgaggtggacggttctcctaccacatgttaactctaccgatgttcccaggttctttcccggagagaagatt
cttgaggaggctaagaacttcaactcctcagcagctgcttcaacaaccgatgctcgcacaagtggtcattgctaaggacatc
ccccggcagatftggtacgctctgagtttccctggtacgctccctccccgagtgaggctcgatactacattgagcagtagcggcggagct
gacgatattggattggcaagactctcaccgaatgccgatgcaacaacaacgtttacctcaggctgccaagctcgattacaaccgatgc
cagttcccagcaccgatttgagtgctgattatgcaggagtggttgagaagtcaacttccagcagttcggaafttccaagaagtacctcttg
ttcttactctctgctgccccttctattttgaggtcgagaagctccgagagcagacttgcctgggctaagtctcgaattatctgtaagatgact
tcttactacaacgatgaggccactacctggaccactcgaactctctcttattggagtttaaggtttctcagacctaccgaaagaacggta
acgagactaaggagatcctgttctcaagaacctcagacttctcagacgttctgaggagacttccgaggacctggcaaggacatcc
accaccagctcagaacgctgggagacttggctgtttctctcagagaggagaagaacgcttgcaggaggagactgagcttctcgtgcga
actattaacctctctggcggctacatgaccacgatgagattctttcagatgccgactacgagaacctgtccaaccttacaacaaggttgtg
gcaagctcaacgagctcagaacgacaaggtcactggcggctcagaacaccacattgagcttgacatgcaggctctcgttaagctgggt
tttgtaaacctctctaacatcaaccaggacatttaagcagacttcttctgtgtgcaagaccttactactctgccacgttctgaggaga
ttatgaacttcaattccaaggtgctcttccagcaggtctaa

La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de ADN de la diterpeno sintasa de clase II de *Salvia sclarea*, optimizada para la expresión en *Yarrowia lipolytica*

ES 2 761 689 T3

atgacttctgtaacctttcccagccccctgcccattatccgacgacgacttcagcttcagcctgagttcacgccgagtgcttctggctgaa
gtcttctccaagcacgccccctcacccttctgcccagattcgacctaacgagctctcccagattgccgagcttcgagttacttccctcgatg
cttcccaggtctccgagaaggacatttcccttggctcagactcccacaaggtgaggttaacgagaagatcgaggagctatcgagtagctcc
agaaccttctcatgactccggcgacggacgaattctgtgtccccctacgacaccgctgtgatcgcctgattaaggacctcaagggtcga
gatgccctcagtttccctctgtcttgatggattgccaccaccagcttctgatggctcttggggcgacgagttctctgatttacgaccga
atcctgaacctctcgttgtgtcgtccctgaagtcttgaacctcagctctgatattatgagaagggtgtgacctacatcaaggagaacgt
ccacaagctcaagggtgccaacgttgagcaccgaactgccggattcgagcttgtgttctacctttatgacagatggccactgaccttggcat
tcagggtcttccctacgatccccctcatcaaggagattgctgacactaagaagcagcgactcaaggagattccaaggatctcgtttacc
agatgcttaccaccttctactcccttggaggactcggcgaccttgagtgaggagcactcctgaagctccagtcggcaacggctcttc
ctcacttccccctccaccgccgctcttatgacaccaaggacgagaagtgtctgaagtacatcgagaacgccctcaagaactcgg
acggaggtgctccccacacttacctgtcgatatttctctcgactttgggtattgatcgacttcagcgacttggatttctcgacttccagca
cgagatcaagfcttctcgcacatcgagtcggttgggagagaccggagtttctctggacgatacactaagtttctgatattgatgaca
cctctatgggctgctgacttctcaagatgcacggatacagctcgcacccaacgttctcaagcactcaagcagcagatgtaagtttctg
ctacattggcagctgtcagctcctctctatgtacaaccttaccgagccgccagcttcgattcctcctggtgaggaggttttggaggg
ccactaagtttgccttaacttctcaggagatgcttgaaggatcgacttcaggagcagtggtgattccgaccacctttctgatgagatta
agctgggctcaagatgcttggctacgccaccctccccgagtcgagggccttactacctcgatcactacgctggttctgggtgatgttggat
tgcaagcttctaccgaatgctgagatttcaacgatacctacaaggagcttgcattctcgatttcaaccgatccagactcagcaccag
cttgagtggtcacatgcaggagtggtacgaccgatgctctcttccgagttcggcatttcaagcgagagcttctccgatcttctctcgc
cgccgctaccatttctgagcctgagcgaactcaggagcgaacttctcttccaagaccgaatctgtcttaagatgattacttcttttcaaca
tttccggtactaccttctctcgactacaactcaacggcctcgatgagattatctctctgccaacgaggatcagggtctggctgtactctc
ctggtaccttccaccagcttctcagcggattcgatatttactctccaccagctcaagcagtttggctccagtggtcatgaagggtcagc
agggagaggggttctggcggcgaggacgccgtgctcttccaacacctcaacatctgcggcctcaacgaggacgtgctctccaac
aacgagtacactgctctgtccacctcaacaagaatttgaaccgactcggccagatccaggacaacaagattctccaggttgggacg
gctccatcaagataaggagcttgagcaggatagcaggcccttgaagctcgtccttcaggagaacggcgagccgttgaccgaaaca
tccgacacaccttcttccgtttcaagacttctactacgatgctaccacgacgatgagactaccgacctcacatctcaaggttcttctg
acctgtgtgtaa

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de ADN que codifica la abienol sintasa de clase I/II bifuncional de *Abies balsamea*, optimizada para la expresión en *Yarrowia lipolytica*

ES 2 761 689 T3

atggccctgccggttactctcaagtcccacattcccatcactaccatcgccctgctaagatgaactacacccccaaagggtatgatta
ccgccaacggacgatctcgacgaatccgacttttcccacaagatcgttctgtgctggtgaggtgatcgaactttcccctctcagtcct
tgagaagaccgctcttcccgatcagttttgagaagaacggtactcccttaactcactcccccaaccgagagttccccctctttttg
gaacaacgatattatcaactctattactgctctcacaaggffcagactggcgaccgaaagcgaatccagactctcattctgagattaagaac
gtcttfaactctatggcgatggtgagacttctccctctgcttacgacaccgctgggtgctcgaatcccgccgtgatggctctgagcagc
cccagttccccagactctgagtgattctcagaaccagctcaaggacggtcttggggtgaggagtctacttcttcttacgaccgact
ctcgctacccttgctgcattattaccctcaccatttggcgaactggcaacgffcagcttcacaagggcattgagttctccgaaagcaggtgt
tcgaatggacgatgaggctgataaccaccgacctctggtttgagattgtcttcccctatgcttaacgaggctaagtcccttgcttgacc
tgccttacgagcttccctcattgagcagatggttaagaagcgagaggccaagctcaagatgattaccaccaacgctctgtacaccattcag
actaccctcttactctctgagggccttcacgagattgtgactcgataagattatcaagctccagctccaaggacggttcttctcctgctcc
cccgtctactgccgctgtttctatgcagactggtaactaaagtgcctgagttcctgagttcgttctccgaaagttcgaaccacgtgccc
tctgactaccccctgatctcttggagcacttgggtggtgactgtgagcacttggcattgatcgacactcaagaaggagatcaagg
acgctctgactacgtgactctgttgggacgagcggcattggctggccaaggactctccatcggcgatattgatgacactgctatgg
gccttgaatccttgcactgcacggatacaacgttccccgatgttctcaagacttcaaggacgagaacggagagttctttgctcatgggt
cagactcagcagaggattaccgacatgcttaacgtttaccgatgttctcaggttcttcccggagagactatcatggaggaggccaagctc
tgactgagcgatactgcgaaacgctctggagaacccgacgccttgacaagtgggctattaagaagaacattcgaggcgaggtggag
tacgctcaagtaaccctggcaccgatctatgccccgactggaggtgcgatcttcaattggtaactacggcccaacgatgctggctggt
aagtcctttacatgatgccctacatttcaacgagaagtaccttgcacttccaagctggactcaactctgtcagctccctcaccaggagg
agattcgagagctgtccgatggtgtaagctctctggttactgagctgaagttcaccgagatcgagttgtgagacttactcgtgttgcct
ctccatgttggagcccagttctactctgagccgtttactaagattccgttctcctcgtcattcttgacgactttacgatggctacgg
tttcccagcagatcaagctgttctccgaggtgtcaagcagatgggatctctcccttctgagcagatcccaccacatgaagattgtctc
ctgggtcttacaactgttaacgaggtgtctgaggaggacgaaagactcagggccacgatgttcttggctacattcgaacctttggga
gattcagctcggccttaccggagaggtgagtggtcccagggaagctgaccttctctgatgagctacattgagaacggcaggtt
ctattggaggtgctactatctctcttactattcttctactgaggaggacgatattctctcccacattgattacgggtccaagtttctccgactc
cttcttaccgctcacttgcacaacgacatcaagacttaccaggaggagcagccacggcgagggtgttccgctattcaggtttacatga
aggaccgaccgagattactgaggaggaggtctcaagtacgtttacggtcgaatggttaacgatctcggcagcttaactctgagttaccc
aagttaacgagatccccagaactgcaagcagctggttttgactcggcagttgcccagcttttactatggagggtgacggcctcac
ctactctgacactatggagattaaggagcacatcaagaagtgcctctttgagcccgtacctaa

La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de ADN que codifica el gen de la abienol sintasa de *Nicotiana tabacum*, optimizado para la expresión en *Yarrowia lipolytica*

atggtctctggcctcgatctaagatcattccccctccgatcacaagctcgaaacatcaagctcggttctgttaccacgctattfcccacg
 accctgtcagagtcgatgctctcactctactgctctctctatggaggaggctaaggagcgaatccgagagactffcggaagattgagctttct
 cctctctctacgactgctfctgggtgctatggtccctctcgatactctatgaaccgacctgtttccccagtgccctgactggattctgaga
 accagcgagaggacggtctctgggctcaaccctctcaccctctcctgtaaggactccctctctcactctcgtctctctctgcccctc
 gaaagtggcgaattggtgataaccaggtccagcgaggtctggttattgagactcacggtgggctgctgataacaagatcagattctc
 ccctgggttgagattctctccctgcatgattaactacgctgagaagctcaacctgacctccccctgaccccaacctgttaacatgatgct
 ctgagcagcgagagcttaccattgagcgagccctcaagaacgagttgagggtaacatggctaacgttgagtactttgctgagggactcgg
 gagctttgctactggaaggagatgatgcttcgacagcgacacaacggctctctcttctgactctcccgccaccactgccgctgcccctattacc
 accagtacgatgagaagtctttggctacctcaactctatcctcaagctccacgataactgggtcccactattgccccactaagattcactct
 aacctttctctgctgatccctcagaacctcggagttgacctgatacttaagactgaggttaagcgagttctcctgatgagattaccgactttg
 ctgagaagaacgagaggattttctgactgctcactgtgctatggtctttgactccttgaatgaacaactacgaggttctctgaggag
 ctgaggggtttgtgaccaggagcacttcttactacctctctggcaagctcatgaaccacgttctctctgagcttaccgagcttctcag
 gtgctattcagcagcgaaaggaccacattctgataagattctacttgactcgaactttatggagcagaagctccttgacaagcacattc
 ccgaccgatcaagaaggagatggagttgctatgcaagtttacggcactttcgaccgagtgagactcgacgatacagctgagctttac
 aagatggactcctttaagattctcaaggccttaccgatctccgggttaacaacattgaccttctcaagttctctgagcacgattcaacctct
 gccagaccgacacaaggaggagctcagcagatgaagcagatggtcaccgattgcaagctggagcaggtcggctttctcagcagctacc
 tctacacttcttactcattatcggcctatcctctttgagcccagctgctgatgctcacttctctacgtaagctacgccatcattatcactgc
 cgtggacgatttctcattgttttattgcaaggaggagcttcagaacatcagctgctgagcagatgggaggatactctaccgtcgga
 ttccgatctgagcaggtcgaattttctctctgccccttacaagatggtgaggagattgctccaaggccgagactaagcagggtcagatgtg
 tcaagataccttataacctttggattgatgctcaagtgtatgctggtgagcttgacctttggaagattaagtcactacccctctatcga
 ggagtaccttctgtgctgtgtactattggtgtccctgtttgtctcacttctctcacttctcggacccaagctgtccaaggacgtcattga
 gtctctgaggttccgccccttgcaactgtactgcccgtctcggccgacttattaacgatattcactcctacaagcgagagcaggtgagctc
 tctactaacatggtttctatccttatcaccagctcccaggtactatctctgaggaggagctattcgacagattaaggagatgatggagttaa
 gcgagcagagcttctcggaatggttctccagaacaaggagctccagctccccaggtgtgcaaggacctctttggactaccatcaacgcc
 gcttactctattcacactcacggcagatggataccgatccccgaggaggtcaagaaccacatcaacgatgtttattacaagcccctcaaccagt
 actccccctaa

Figuras:

5 Se mostrarán ahora realizaciones de la invención, solo a modo de ejemplo, con referencia a las Figuras 1-3, en las que:

La FIG. 1 muestra que la conversión de esclareol y abienol en Ambrox puede realizarse mediante un procedimiento químico.

10 La FIG. 2 muestra las rutas bioquímicas para convertir difosfato de geranilgeranilo en abienol en tabaco y en esclareol en salvia. A. vías hacia abienol en tabaco y esclareol en la salvia implican la actividad de dos enzimas separadas: un diTSP de tipo II que convierte el difosfato de geranilgeranilo (GGPP) en difosfato de labda-13-en-8-ol (LDPP) y una diTSP de tipo I que convierte LDPP en el producto final. En el tabaco, una abienol sintasa (Nt-ABS) que es un tipo de diTSP I convierte LDPP en abienol. En salvia, una esclareol sintasa, que es otro tipo de diTSP I convierte LDPP en esclareol. B. en primer lugar, la conversión en 2 etapas de GGPP en LDPP y de LDPP en abienol se realiza mediante una sola *cis* abienol sintasa de clase I/II bifuncional (Ab-CAS).

15 La FIG. 3 muestra un cromatograma HPLC de una capa de dodecano de una cepa productora de abienol. Se utilizó una columna C18. La fase móvil fue metanol etanol 4:1, TFA al 0,1% con una adición de agua al 11% durante los primeros tres minutos y luego metanol etanol directo durante 14 minutos. Las muestras se diluyeron 1:10 en fase móvil antes de la inyección. La FIG. 3a muestra el pico de abienol de la muestra de referencia comercial de abienol. La Fig. 3b muestra el pico de abienol del abienol generado a partir de los transformantes.

A menos que se defina lo contrario en esta memoria, las expresiones y los términos científicos y técnicos utilizados en esta memoria tendrán los significados que se entienden comúnmente por los expertos ordinarios en la técnica.

La expresión "diterpeno sintasa de clase II" o "diTPS de clase II" indica una enzima capaz de catalizar la conversión de difosfato de geranylgeranilo en difosfato de labda-13-en-8-ol. La diterpeno sintasa de clase II puede provenir de diversos organismos, tales como el tabaco (*Nicotiana*) o la salvia (*Salvia*). A una diterpeno sintasa de clase II específica utilizada en las realizaciones en esta memoria, derivada de *Nicotiana tabacum* y *Salvia sclarea* se la alude mediante una notación adicional, p. ej., "Nt-diTPS-Clase II" y "Ss-diTPS-Clase II", respectivamente. Un ejemplo de una Nt-diTPS-Clase II es el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Un ejemplo de una Ss-diTPS-Clase II es el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

La expresión "diterpeno sintasa de clase I" o "diTPS de clase I" indica una enzima capaz de catalizar la conversión de difosfato de labda-13-en-8-ol en abienol o esclareol. A una diterpeno sintasa de clase I específica utilizada en las realizaciones en esta memoria, derivada de *Nicotiana tabacum* se la alude mediante una notación adicional, p. ej., "Nt-ABS". Un ejemplo de una Nt-ABS es el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4.

La expresión "abienol sintasa de clase I/II bifuncional" o "CAS de clase I/II bifuncional" indica una enzima capaz de catalizar la conversión de difosfato de geranylgeranilo en abienol. La abienol sintasa de clase I/II bifuncional tiene dos sitios activos, que tienen la función de una diterpeno sintasa de clase I y una diterpeno sintasa de clase II, respectivamente. La abienol sintasa de clase I/II bifuncional específica utilizada en realizaciones particulares en esta memoria, derivada de *Abies balsamea*, se la alude mediante una notación adicional, p. ej., "CAS de clase I/II Ab-bifuncional", o simplemente CAS-Ab. Un ejemplo de abienol sintasa de clase I/II Ab-bifuncional es el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

Identidad de la Secuencia: La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de la secuencia".

Para los fines de la presente divulgación, el grado de identidad de la secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales utilizados son la penalización de apertura de hueco de 10, la penalización de extensión de hueco de 0.5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle etiquetada como "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción -nobrief) se utiliza como el porcentaje de identidad y se calcula como sigue:

$$(\text{Desoxirribonucleótidos Idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del Alineamiento} - \text{Número Total de Huecos en el Alineamiento})$$

Construcción de ácido nucleico: La expresión "construcción de ácido nucleico" significa una molécula de ácido nucleico, ya sea de cadena sencilla o doble, que se aísla de un gen que se produce de forma natural o se modifica para que contenga segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no existiría en la naturaleza o que es sintético. La expresión construcción de ácido nucleico es sinónima a la expresión "casete de expresión" cuando la construcción de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente divulgación.

Secuencias de control: La expresión "secuencias de control" significa todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente divulgación. Cada una de las secuencias de control puede ser nativa o extraña al polinucleótido que codifica el polipéptido o nativa o extraña entre sí. Secuencias de control de este tipo incluyen, pero no se limitan a un conductor, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada de la transcripción y la traducción. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

Enlazada operativamente: La expresión "enlazada operativamente" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de tal manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

Expresión: El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación post-transcripción, traducción, modificación post-traducción, y secreción.

Vector de expresión: La expresión "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y está operativamente enlazada a nucleótidos adicionales que proporcionan su expresión.

Célula huésped: La expresión "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción, y similares con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente divulgación. La expresión "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no sea idéntica a la célula madre debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

Variante: La expresión "variante" significa un polipéptido que tiene actividad enzimática que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o delección de uno o más (varios) residuos de aminoácidos en una o más (varias) posiciones. Una sustitución significa un reemplazo de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la separación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir uno o más aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición. En alguna realización, el uno o más aminoácidos anteriores son 1-3 aminoácidos.

En una realización del método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, abienol se convierte en difosfato de geranylgeranilo (GGPP) en presencia de una combinación de diterpeno sintasa de clase II y abienol sintasa de clase I/II bifuncional. La diterpeno sintasa de clase II de acuerdo con las realizaciones de esta memoria puede ser de cualquier organismo que exprese de forma nativa una enzima independiente de la diterpeno sintasa de clase II. En una realización, la diterpeno sintasa de clase II es de tabaco o, específicamente, de *Nicotiana tabacum*. En otra realización, la diterpeno sintasa de clase II es de salvia o, específicamente, de *Salvia sclarea*. La diterpeno sintasa de clase II de acuerdo con las realizaciones de esta memoria es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

La abienol sintasa de clase I/II bifuncional de acuerdo con realizaciones en esta memoria puede ser de cualquier organismo que exprese de forma nativa una única enzima con dos sitios activos, que tiene actividad de diterpeno sintasa de clase I y actividades de diterpeno sintasa de clase II, respectivamente. En una realización, la abienol sintasa de clase I/II bifuncional es de abeto o, específicamente, de *Abies balsamea*. La abienol sintasa de clase I/II bifuncional de acuerdo con las realizaciones de esta memoria es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3.

En una realización de la invención, la diTPS de clase II y la abienol sintasa de clase I/II bifuncional son expresadas por una célula huésped recombinante, tal como un microorganismo recombinante. Por lo tanto, las etapas de un aspecto de la invención pueden tener lugar dentro de una célula huésped, es decir, el método puede ser al menos parcialmente un método *in vivo*. La célula huésped puede ser recombinante y puede ser, por ejemplo, un microorganismo modificado genéticamente. Por lo tanto, un microorganismo puede ser modificado genéticamente, es decir, alterado artificialmente de su estado natural, para expresar tanto la diTPS de clase II como la abienol sintasa de clase I/II bifuncional. En una realización, expresa una combinación de una Nt-diTPS de clase II y una abienol sintasa de clase I/II Ab-bifuncional. En otra realización, expresa una combinación de una Ss-diTPS de clase II y una abienol sintasa de Ab-bifuncional de clase I/II. Preferiblemente, las enzimas son exógenas, es decir, no están presentes en la célula antes de la modificación, habiéndose introducido utilizando métodos microbiológicos tales como los descritos en esta memoria. Además, en el método de la invención, las enzimas pueden expresarse cada una por una célula huésped recombinante, ya sea dentro de la misma célula huésped o en células huésped separadas. El abienol puede secretarse de la célula huésped en la que se forma.

La célula huésped puede ser genéticamente modificada de cualquier manera conocida adecuada para este fin por la persona experta en la técnica. Esto incluye la introducción de los genes de interés, tales como uno o más genes que codifican las enzimas bifuncionales de abienol sintasa de clase I/II y diTPS de clase II, en un plásmido o cósmido u otro vector de expresión que se capaz de reproducirse dentro de la célula huésped. Alternativamente, el ADN de plásmido o cósmido o parte del ADN de plásmido o cósmido o una secuencia de ADN lineal puede integrarse en el genoma del huésped, por ejemplo mediante recombinación homóloga o integración aleatoria. Para llevar a cabo la modificación genética, el ADN puede ser introducido o transformado en células por absorción natural o mediado por procesos bien conocidos, tales como electroporación. La modificación genética puede implicar la expresión de un gen bajo el control de un promotor introducido. El ADN introducido puede codificar una proteína que podría actuar como una enzima o podría regular la expresión de genes adicionales.

Una célula huésped de este tipo puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una abienol sintasa de clase I/II bifuncional y una diTPS de clase II. Por ejemplo, la célula puede comprender una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 3 y al menos una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un complemento de la misma, o un fragmento de un polinucleótido de este tipo que codifica una variante funcional (que puede ser un fragmento que proporciona una variante funcional) de cualquiera

de las enzimas en abienol sintasa de clase I/II bifuncional y diTPS de clase II, por ejemplo enzimas tal como se describen en esta memoria. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las enzimas pueden ser exógenas, es decir, no se producen de forma natural en la célula huésped.

5 Por lo tanto, otro aspecto de la invención proporciona una célula huésped recombinante, tal como un microorganismo, que comprende un primer polipéptido que es una diTPS de clase II, que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, al menos 60%, al menos 65 %, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95 %, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% idéntica a las SEQ ID NOs: 1 o 2 y que comprende un segundo polipéptido que es una abienol sintasa de clase I/II bifuncional, que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 3. La célula también puede comprender polipéptidos que son variantes funcionales o fragmentos de cualquiera de las secuencias anteriores.

15 Un polinucleótido adecuado pueden ser introducido en la célula por integración aleatoria, recombinación homóloga y/o puede formar parte de un vector de expresión que comprende una combinación de secuencias de polinucleótidos SEQ ID NOs: 1 y 3, una combinación de secuencias de polinucleótidos SEQ ID NOs: 1 y 2, o un complemento de los mismos. Un vector de expresión de este tipo forma otro aspecto de la invención. Vectores adecuados para la construcción de un vector de expresión de este tipo son bien conocidos en la técnica y pueden disponerse para que comprendan el polinucleótido enlazado operativamente a una o más secuencias de control de la expresión, de modo que sean útiles para expresar las enzimas requeridas en una célula huésped, por ejemplo un microorganismo tal como se describe arriba. Por ejemplo, promotores que incluyen, pero no se limitan a promotores TEF1, HSP e HYP pueden utilizarse junto con genes endógenos y/o genes heterólogos para la modificación de patrones de expresión de diTPS de clase II y una abienol sintasa de clase I/II bifuncional. De manera similar, secuencias terminadoras a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan al uso de secuencias terminadoras XPR2 de *Yarrowia lipolytica*.

25 En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante o modificada genéticamente, como se ha mencionado a lo largo de esta memoria descriptiva, puede ser cualquier microorganismo seleccionado del grupo que consiste en levaduras, hongos (tales como miembros del género *Yarrowia*), protistas, algas, bacterias y arqueas. La bacteria puede comprender una bacteria gram-positiva o una bacteria gram-negativa que incluye, pero no se limita los géneros *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paracoccus* y *Rhodococcus*. En determinadas realizaciones de la invención, se emplean levaduras u hongos de géneros que incluyen, pero no se limitan a, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Neurospora crassa*, *Blakeslea*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cunninghamella*, *Lipomyces*, *Mortierella*, *Mucor*, *Phycomyces*, *Pythium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon Trichosporon* y *Yarrowia*. En determinadas realizaciones particulares, se utilizan organismos de especies que incluyen, pero no se limitan a *Blakeslea trispora*, *Candida pulcherrima*, *C. revkaufi*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus curvatus*, *Cunninghamella echinulata*, *C. elegans*, *C. japonica*, *Escherichia coli*, *Fusarium sporotrichioides*, *F. graminearum*, *Fusarium venenatum*, *Gibberella zea*, *G. fujikuroi*, *Lipomyces starkeyi*, *L. lipoferus*, *Mortierella alpina*, *M. isabellina*, *M. ramanniana*, *M. vinacea*, *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleanus*, *Pythium irregulare*, *Rhodosporidium turuloides*, *Rhodotorula glutinis*, *R. gracilis*, *R. graminis*, *R. mucilaginosa*, *R. pinicola*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon pullans*, *T. cutaneum* y *Yarrowia lipolytica*.

40 Microorganismos particularmente adecuados, por ejemplo, incluyen *Yarrowia lipolytica*, *Escherichia coli*, *Fusarium venenatum*, *Gibberella fujikuroi* y *Saccharomyces cerevisiae*.

La plataforma *Yarrowia* ha sido optimizada para el flujo a través de la ruta de isoprenoides y ha alcanzado niveles de producción de más de 10 gramos por litro de carotenoides totales. Dado que los diterpenos también se derivan de la vía isoprenoide, *Yarrowia* es muy adecuada para la producción a alto nivel de abienol.

45 La célula huésped recombinante o el microorganismo se pueden utilizar para expresar las enzimas arriba mencionadas y un extracto exento de células obtenidos entonces por métodos estándar, para uso en el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Realizaciones de la presente divulgación también abarcan variantes de los polipéptidos tal como se definen en esta memoria. Tal como se usa en esta memoria, una "variante" significa un polipéptido en el que la secuencia de aminoácidos difiere de la secuencia base de la que se deriva en que uno o más aminoácidos dentro de la secuencia son sustituidos por otros aminoácidos. Por ejemplo, una variante de SEQ ID NO: 1 puede tener una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 50% idéntica a SEQ ID NO: 1, por ejemplo, al menos aproximadamente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica. Las variantes y/o los fragmentos son variantes/fragmentos funcionales en que la secuencia variante tiene características

de actividad enzimática funcional similares o idénticas a la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos no variante especificada en esta memoria.

5 Por ejemplo, una variante funcional de la SEQ ID NO: 1 tiene características de diTPS de clase II similares o idénticas a SEQ ID NO: 1. Un ejemplo puede ser que la tasa de conversión por una variante funcional de SEQ ID NO: 1, de GGPP a LDPP, puede ser la misma o similar, aunque dicha variante funcional también puede proporcionar otros beneficios. Por ejemplo, al menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o al menos aproximadamente 100%, la tasa se logrará cuando se usa la enzima que es una variante funcional de la SEQ ID NO : 1.

10 Una variante funcional o fragmento de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO anteriores, por lo tanto, es cualquier secuencia de aminoácidos que permanece dentro de la misma categoría de enzima (*es decir*, tiene el mismo número EC). Métodos para determinar si una enzima cae dentro de una categoría particular son bien conocidos por la persona experta, que puede determinar la categoría de enzima sin el uso de la habilidad inventiva. Métodos adecuados pueden obtenerse, por ejemplo, de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.

15 Las sustituciones de aminoácidos pueden ser consideradas como "conservadora", cuando un aminoácido es reemplazado por un aminoácido diferente con propiedades ampliamente similares. Sustituciones no conservativas son cuando los aminoácidos son reemplazados por aminoácidos de un tipo diferente.

Por "sustitución conservativa" se entiende la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de la misma clase, en que las clases se definen como sigue:

20 Ejemplos de Clases de Aminoácidos:
No polares: A, V, L, I, P, M, F, W
Polares sin carga: G, S, T, C, Y, N, Q
De carácter ácido: D, E
De carácter básico: K, R, H.

25 La invención se extiende a una combinación nueva de diTPS de clase II y una abienol sintasa de clase I/II bifuncional para la conversión de GGPP en abienol. La mejora significativa de la tasa de conversión de GGPP en abienol es el resultado de una combinación nueva de este tipo. En una realización particular tal como se muestra en el Ejemplo 3, se observó una mejora de 10 veces en el título de abienol cuando se utilizó la diTPS de clase II de *Nicotiana tabacum* o *Salvia sclarea* en combinación con una abienol sintasa de clase I/II bifuncional de *Abies balsamea*, cuando se comparan con una abienol sintasa de clase I/II bifuncional utilizada sola.

30 El resultado arriba descrito es inesperado. Se reconoce convencionalmente en la técnica que una sola enzima bifuncional sería más eficiente para catalizar un sustrato que dos enzimas separadas que tienen las mismas dos funciones, debido a un efecto de armazón (Zerbe *et al.* 2012, J. Biol. Chem. 287:págs.12121-12131). El razonamiento es que la expresión de las dos actividades en la enzima bifuncional es más equilibrada, y las actividades se mantienen en estrecha proximidad entre sí. Esta visión se corrobora por la observación en esta
35 divulgación de que una combinación de diTPS de clase I y clase II de *Nicotiana tabacum* produce poco abienol en comparación con las diTPS de clase I/II bifuncionales de *A. balsamea*. Véase el Ejemplo 3.

40 En contra de las enseñanzas anteriores, los autores de la presente divulgación crearon transformantes que contienen una enzima diTPS de función única de clase II y una abienol sintasa de clase I/II bifuncional. Los resultados demostraron que el título de producción de abienol es significativamente mayor que el producido por el sistema de dos enzimas de diTPS de clase I y clase II, o por una sola abienol sintasa de clase I/II bifuncional. Añadir una enzima diTPS de clase II además de una abienol sintasa de clase I/II bifuncional no produce simplemente un efecto aditivo. En cambio, se logra un efecto sinérgico, que es inesperado.

Los siguientes Ejemplos pretenden ilustrar la invención sin limitar su alcance de modo alguno.

Ejemplos

45 Ejemplo 1

Construcción de Vectores que Contienen el gen diTPS de Clase II, la abienol sintasa de Clase I/II Bifuncional

Los plásmidos que se construyeron y utilizaron en la presente divulgación se muestran en la **Tabla 1**.

El gen abienol sintasa de clase I/II bifuncional de *Abies balsamea* (Ab-CAS) fue optimizado en codones de acuerdo con el sesgo de codones de *Yarrowia*, y se sintetizó *de novo*. Durante la *síntesis de novo*, la secuencia 5'-

TGCTAGCCACAAAA, que contiene un sitio de restricción *NheI* y una secuencia típica de Kozak para permitir un inicio eficiente de la traducción, se añadió inmediatamente aguas arriba del presunto codón de iniciación ATG. La secuencia ACGCGT-3', que comprende un sitio de restricción *MluI*, se añadió inmediatamente aguas abajo del codón de parada. Esta secuencia se escindió utilizando *NheI* y *MluI* y se ligó a pMB6655 cortado con *NheI* y *MluI* para producir pMB6839. La proteína resultante codificada por el gen Ab-CAS de pMB6839 se especifica en SEQ ID No: 3. El gen diTPS de clase II de *Nicotinia tabacum* (Nt-diTPS-Clase II) se clonó en el vector de expresión pMB6674 tal como se describió anteriormente para crear pMB6845. La secuencia de la proteína del gen Nt-diTPS-Clase II codificado por pMB6845 se especifica en la SEQ ID No: 2. El gen Ab-CAS y el promotor y terminador en pMB6839 se escindieron por digestión con *PvuII* y *SspI* y se clonaron en el sitio *EcoRV* de pMB6845 para crear pMB6847, que expresa tanto el gen Ab-CAS como el gen Nt-diTPS-Clase II junto con el gen de resistencia a la higromicina *HPH*.

El gen de la abienol sintasa de *Nicotinia tabacum* (Nt-ABS) se sintetizó y se clonó en pMB6655 tal como se describe para pMB6839, para crear pMB6840. La secuencia de proteínas para el gen Nt-ABS de pMB6840 se especifica en la SEQ ID No: 4. El gen Nt-ABS y el promotor y terminador en pMB6840 se separaron por digestión con *PvuII* y *SspI*, y se clonaron en el sitio *EcoRV* de pMB6845 para crear pMB6849, que expresa tanto el gen Nt-ABS como el gen Nt-diTPS-clase II junto con el gen de resistencia a la higromicina *HPH*.

El gen diTPS de clase II de *Salvia sclarea* (Ss-diTPS-clase II) se sintetizó y se clonó en pMB6674 tal como se describe arriba para crear pMB6874. La secuencia de proteínas de Ss-diTPS-clase II se especifica en SEQ ID No. 2. El gen Ab-CAS y las señales de expresión de pMB6839 se escindieron por digestión con *PvuII* y *SspI* y se clonaron en el sitio *EcoRV* de pMB6874 para crear pMB6879, que expresa tanto el gen Ab-ABS como el gen Ss-diTPS-clase II con selección de higromicina.

Las secuencias de genes que codifican las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOs 1-4 fueron optimizadas en codones de acuerdo con el sesgo de codones de *Yarrowia* y las secuencias de ácidos nucleicos resultantes son SEQ ID NOs 5-8, respectivamente.

25 **Tabla 1.** Plásmidos

Plásmido	Cadena Principal	Inserción(es)	Fuente
pMB6839	pMB6655 (higR)	Ab-CAS (clase I/II)	Fragmento sintetizado de <i>NheI-MluI</i>
pMB6845	pMB6674 (higR)	Nt-diTPS-Clase II	Fragmento sintetizado de <i>NheI-MluI</i>
pMB6847	pMB6845 (higR)	Ab-CAS (clase I/II) + Nt-diTPS-Clase II	Fragmento sintetizado de <i>NheI-MluI</i>
pMB6840	pMB6655 (higR)	Nt-ABS (clase I)	Fragmento sintetizado de <i>NheI-MluI</i>
pMB6849	pMB6845 (higR)	Nt-ABS (clase I) + Nt-diTPS-Clase II	Fragmento sintetizado de <i>NheI-MluI</i>
pMB6874	pMB6674 (higR)	Ss-diTPS-Clase II	Fragmento sintetizado de <i>NheI-MluI</i>
pMB6879	pMB6874 (higR)	Ab-CAB (clase I/II) + Ss-diTPS-Clase II	Fragmento sintetizado de <i>NheI-MluI</i>

Todos los procedimientos de biología molecular básica y de manipulación de ADN descritos en esta memoria se llevan a cabo generalmente de acuerdo con Sambrook *et al.* o Ausubel *et al.* (J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (eds). 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Nueva York; F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D, Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (eds.). 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: Nueva York).

Ejemplo 2

Construcción de Células Huésped Recombinantes que contienen genes de diTPS de Clase II y de abienol sintasa de Clase I/II Bifuncionales

35 En este ejemplo, los vectores que contienen genes diTPS de clase II y abienol sintasa de clase I/II bifuncionales se introdujeron en una cepa huésped de *Y. lipolytica*.

Los vectores arriba descritos se transformaron en una cepa de *Y. lipolytica* (ML7206) que previamente había sido optimizada para el aumento de flujo a través de la ruta de isoprenoides. La cepa huésped ML7206 es una cepa prototrófica de *Y. lipolytica* con el siguiente genotipo (*MATB erg9-4789::ura3 {HMG-tr GGS carB}*). La cepa ML7206 se construyó mediante la introducción de genes heterólogos bajo el control de promotores constitutivos, junto con varias generaciones de cruzamiento, comenzando con MF350 y ATCC201249 tal como se describe en la Patente de

EE.UU. Nº 7.851.199. El gen *ERG9*, que codifica la escualeno sintasa, fue reemplazado por una versión hipomórfica que alberga una mutación puntual (F317I) y una inserción del gen *URA3* (posteriormente inactivado por mutación) directamente después del codón de parada.

- 5 El gen *GGS* y el gen *HMG* truncado ("*HMG-tr*") se derivaron de secuencias de *Yarrowia* correspondientes a los genes geranilgeranil pirofosfato sintasa nativa e hidroximetilglutaril-CoA reductasa, respectivamente. El gen *carB* se derivó de *Mucor circinelloides*, y codifica una actividad de fitoeno deshidrogenasa, pero no tiene relación con el siguiente ejemplo.

Ejemplo 3

10 Estudio del Título de Abienol de las Células Huésped Recombinantes que contienen un gen diTPS de Clase II y un gen CAS de Clase I/II Bifuncional

En este ejemplo, se examinaron las producciones de abienol en células huésped recombinantes descritas en el Ejemplo 2.

- 15 Los transformantes descritos en el Ejemplo 2 se hicieron crecer en matraces de agitación en un medio rico (YPD) recubierto con un volumen de 10% de dodecano. Estudios previos con isoprenoides han demostrado que los productos isoprenoides son típicamente exportados por microorganismos y se acumulan en una capa de dodecano. Después del crecimiento a 28°C, 200 rpm, durante 6 días, la fracción de dodecano se retiró de los matraces de agitación y se analizó por HPLC en una columna C18, con un detector de matriz de fotodiodos. La configuración de HPLC consistió en una columna YMC PackPro C18 RS [parte nº RS08503-1456WT 150 x 4,6 mm S3 µm] a una temperatura de la columna de 16°C, la fase móvil consistió en una mezcla de (400 ml de Metanol, 100 ml de Etanol y Ácido Trifluoroacético al 0,1%) utilizando un caudal isocrático de 1 mL/min. Los transformantes que contienen el gen abienol sintasa generaron un pico a 2,90 minutos con una absorbancia óptima de 237 nm (**Figura 3b**). Este pico fue consistente con un patrón de referencia de abienol adquirido de Toronto Research Chemicals Cat. nº 107600 (**Figura 3a**).

25 **Tabla 2.** Producción de abienol en transformantes de la cepa MB7206 optimizada con isoprenoide

Genes transformados en MB7206	Absorbancia de abienol (millones), YP + 5% de glucosa	Absorbancia de abienol (millones), YP + 10% de glucosa	Absorbancia de abienol (millones), YP + 12.5% de glucosa
ninguna	0	0	ND (no hecho)
Nt ABS de Clase I de Tabaco y Nt diTPS de Clase II de Tabaco (plásmido pMB6849)	0,4	0,4	ND
Ab-CAS de Clase I/II bifuncional de Abeto (plásmido pMB6839)	1,9	2,3	ND
Ab-CAS de Clase I/II bifuncional de Abeto y diTPS de Clase II de tabaco (plásmido pMB6847)	18,5	23,8	22,5
Ab-CAS de Clase I/II bifuncional de Abeto y diTPS de Clase II de salvia (plásmido pMB6879) (4 clones testados)	ND	ND	17,5

- 30 Como se muestra en la **Tabla 2**, la transformación que contiene tanto el gen diTPS de Clase II como el gen diTPS abienol sintasa (ABS) de Clase I de tabaco en *Yarrowia* resultó en una producción muy baja de abienol. La transformación del gen abienol sintasa de clase I/II bifuncional (Ab-CAS) de abeto solo dio como resultado una producción ligeramente elevada de abienol. Sorprendentemente, los transformantes que contienen el gen abienol sintasa de clase I/II bifuncional (Ab-CAS) junto con el gen di-TPS de clase II de tabaco o el gen di-TPS de clase II de salvia produjeron niveles significativamente más elevados de abienol. Este efecto se observó repetidamente en tres composiciones de medio diferentes en el transformante que contiene el gen di-TPS de clase II de tabaco y el gen Ab-CAS. Es inesperado observar que la adición de la enzima de clase II de tabaco o salvia podría superar significativamente la actividad de la abienol sintasa de clase I/II bifuncional de abeto sola, particularmente dado el hecho de que la transformación de los genes diTPS de Clase II y diTPS abienol sintasa de Clase I de tabaco dieron como resultado muy poco producto.

Listado de secuencias

<110> DSM IP ASSETS B.V.

5 <120> MÉTODOS PARA PRODUCIR ABIENOL

<130> 30010-US-PSP

<140> TBD
< 141> 09-12-2014

<160> 8

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
< 211> 802
< 212> PRT
< 213> Nicotiana tabacum

15

ES 2 761 689 T3

<400> 1

Met Gln Val Ile Ile Thr Ser Ser His Arg Phe Phe Cys His His Leu
 1 5 10 15

His Gln Leu Lys Ser Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Lys Ala Glu Phe
 20 25 30

Lys Lys His Gly Pro Arg Asn Trp Leu Phe Gln Thr Glu Gly Ser Leu
 35 40 45

Leu Tyr Lys Pro Val Arg Leu Asn Cys Ala Thr Ser Asp Ala Ser Tyr
 50 55 60

Leu Gly Asn Val Asn Glu Tyr Leu Glu Ser Asp His Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80

Glu Glu Lys Asp Ile Gln Val Ser Arg Thr Ile Gln Met Lys Gly Leu
 85 90 95

Thr Glu Glu Ile Lys His Met Leu Asn Ser Met Glu Asp Gly Arg Leu
 100 105 110

Asn Val Leu Ala Tyr Asp Thr Ala Trp Val Ser Phe Ile Pro Asn Thr
 115 120 125

Thr Asn Asn Gly Asn Asp Gln Arg Pro Met Phe Pro Ser Cys Leu Gln
 130 135 140

Trp Ile Ile Asp Asn Gln Leu Ser Asp Gly Ser Trp Gly Glu Glu Ile
 145 150 155 160

Val Phe Cys Ile Tyr Asp Arg Leu Leu Asn Thr Leu Val Cys Val Ile

ES 2 761 689 T3

Phe Arg Gly Glu Val Asp Gly Ser Pro Thr His Met Phe Asn Leu Tyr
 420 425 430

Arg Cys Ser Gln Val Leu Phe Pro Gly Glu Lys Ile Leu Glu Glu Ala
 435 440 445

Lys Asn Phe Thr Tyr Asn Phe Leu Gln Gln Cys Leu Ala Asn Asn Arg
 450 455 460

Cys Leu Asp Lys Trp Val Ile Ala Lys Asp Ile Pro Gly Glu Ile Trp
 465 470 475 480

Tyr Ala Leu Glu Phe Pro Trp Tyr Ala Ser Leu Pro Arg Val Glu Ala
 485 490 495

Arg Tyr Tyr Ile Glu Gln Tyr Gly Gly Ala Asp Asp Ile Trp Ile Gly
 500 505 510

Lys Thr Leu Tyr Arg Met Pro Asp Val Asn Asn Asn Val Tyr Leu Gln
 515 520 525

Ala Ala Lys Leu Asp Tyr Asn Arg Cys Gln Ser Gln His Arg Phe Glu
 530 535 540

Trp Leu Ile Met Gln Glu Trp Phe Glu Lys Cys Asn Phe Gln Gln Phe
 545 550 555 560

Gly Ile Ser Lys Lys Tyr Leu Leu Val Ser Tyr Phe Leu Ala Ala Ala
 565 570 575

Ser Ile Phe Glu Val Glu Lys Ser Arg Glu Arg Leu Ala Trp Ala Lys
 580 585 590

Ser Arg Ile Ile Cys Lys Met Ile Thr Ser Tyr Tyr Asn Asp Glu Ala
 595 600 605

Thr Thr Trp Thr Thr Arg Asn Ser Leu Leu Met Glu Phe Lys Val Ser
 610 615 620

His Asp Pro Thr Arg Lys Asn Gly Asn Glu Thr Lys Glu Ile Leu Val
 625 630 635 640

Leu Lys Asn Leu Arg Gln Phe Leu Arg Gln Leu Ser Glu Glu Thr Phe
 645 650 655

Glu Asp Leu Gly Lys Asp Ile His His Gln Leu Gln Asn Ala Trp Glu
 660 665 670

ES 2 761 689 T3

Thr Trp Leu Val Phe Leu Arg Glu Glu Lys Asn Ala Cys Gln Glu Glu
675 680 685

Thr Glu Leu Leu Val Arg Thr Ile Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Met Thr
690 695 700

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

Thr Asn Lys Val Cys Gly Lys Leu Asn Glu Leu Gln Asn Asp Lys Val
725 730 735

Thr Gly Gly Ser Lys Asn Thr Asn Ile Glu Leu Asp Met Gln Ala Leu
740 745 750

Val Lys Leu Val Phe Gly Asn Thr Ser Ser Asn Ile Asn Gln Asp Ile
755 760 765

Lys Gln Thr Phe Phe Ala Val Val Lys Thr Phe Tyr Tyr Ser Ala His
770 775 780

Val Ser Glu Glu Ile Met Asn Phe His Ile Ser Lys Val Leu Phe Gln
785 790 795 800

Gln Val

<210> 2

< 211> 780

< 212> PRT

< 213> Salvia sclarea

5

<400> 2

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

Arg Leu Gln Leu Gln Pro Glu Phe His Ala Glu Cys Ser Trp Leu Lys
20 25 30

Ser Ser Ser Lys His Ala Pro Phe Thr Leu Ser Cys Gln Ile Arg Pro
35 40 45

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

Ser Gln Ala Ser Glu Lys Asp Ile Ser Leu Val Gln Thr Pro His Lys
65 70 75 80

ES 2 761 689 T3

Val Glu Val Asn Glu Lys Ile Glu Glu Ser Ile Glu Tyr Val Gln Asn
85 90 95

Leu Leu Met Thr Ser Gly Asp Gly Arg Ile Ser Val Ser Pro Tyr Asp
100 105 110

Thr Ala Val Ile Ala Leu Ile Lys Asp Leu Lys Gly Arg Asp Ala Pro
115 120 125

Gln Phe Pro Ser Cys Leu Glu Trp Ile Ala His His Gln Leu Ala Asp
130 135 140

Gly Ser Trp Gly Asp Glu Phe Phe Cys Ile Tyr Asp Arg Ile Leu Asn
145 150 155 160

Thr Leu Ala Cys Val Val Ala Leu Lys Ser Trp Asn Leu Gln Ser Asp
165 170 175

Ile Ile Glu Lys Gly Val Thr Tyr Ile Lys Glu Asn Val His Lys Leu
180 185 190

Lys Gly Ala Asn Val Glu His Arg Thr Ala Gly Phe Glu Leu Val Val
195 200 205

Pro Thr Phe Met Gln Met Ala Thr Asp Leu Gly Ile Gln Gly Leu Pro
210 215 220

Tyr Asp His Pro Leu Ile Lys Glu Ile Ala Asp Thr Lys Lys Gln Arg
225 230 235 240

Leu Lys Glu Ile Pro Lys Asp Leu Val Tyr Gln Met Pro Thr Asn Leu
245 250 255

Leu Tyr Ser Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Glu Trp Glu Arg Leu Leu
260 265 270

Lys Leu Gln Ser Gly Asn Gly Ser Phe Leu Thr Ser Pro Ser Ser Thr
275 280 285

Ala Ala Val Leu Met His Thr Lys Asp Glu Lys Cys Leu Lys Tyr Ile
290 295 300

Glu Asn Ala Leu Lys Asn Cys Asp Gly Gly Ala Pro His Thr Tyr Pro
305 310 315 320

Val Asp Ile Phe Ser Arg Leu Trp Ala Ile Asp Arg Leu Gln Arg Leu
325 330 335

ES 2 761 689 T3

Gly Ile Ser Arg Phe Phe Gln His Glu Ile Lys Tyr Phe Leu Asp His
 340 345 350

Ile Glu Ser Val Trp Glu Glu Thr Gly Val Phe Ser Gly Arg Tyr Thr
 355 360 365

Lys Phe Ser Asp Ile Asp Asp Thr Ser Met Gly Val Arg Leu Leu Lys
 370 375 380

Met His Gly Tyr Asp Val Asp Pro Asn Val Leu Lys His Phe Lys Gln
 385 390 395 400

Gln Asp Gly Lys Phe Ser Cys Tyr Ile Gly Gln Ser Val Glu Ser Ala
 405 410 415

Ser Pro Met Tyr Asn Leu Tyr Arg Ala Ala Gln Leu Arg Phe Pro Gly
 420 425 430

Glu Glu Val Phe Glu Glu Ala Thr Lys Phe Ala Phe Asn Phe Leu Gln
 435 440 445

Glu Met Leu Val Lys Asp Arg Leu Gln Glu Arg Trp Val Ile Ser Asp
 450 455 460

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

Thr Leu Pro Arg Val Glu Ala Ala Tyr Tyr Leu Asp His Tyr Ala Gly
 485 490 495

Ser Gly Asp Val Trp Ile Gly Lys Ser Phe Tyr Arg Met Pro Glu Ile
 500 505 510

Ser Asn Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ala Ile Leu Asp Phe Asn Arg Cys
 515 520 525

Gln Thr Gln His Gln Leu Glu Trp Ile His Met Gln Glu Trp Tyr Asp
 530 535 540

Arg Cys Ser Leu Ser Glu Phe Gly Ile Ser Lys Arg Glu Leu Leu Arg
 545 550 555 560

Ser Tyr Phe Leu Ala Ala Ala Thr Ile Phe Glu Pro Glu Arg Thr Gln
 565 570 575

Glu Arg Leu Leu Leu Ala Lys Thr Arg Ile Leu Ser Lys Met Ile Thr

ES 2 761 689 T3

580 585 590

Ser Phe Val Asn Ile Ser Gly Thr Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Asn Phe
595 600 605

Asn Gly Leu Asp Glu Ile Ile Ser Ser Ala Asn Glu Asp Gln Gly Leu
610 615 620

Ala Gly Thr Leu Leu Ala Thr Phe His Gln Leu Leu Asp Gly Phe Asp
625 630 635 640

Ile Tyr Thr Leu His Gln Leu Lys His Val Trp Ser Gln Trp Phe Met
645 650 655

Lys Val Gln Gln Gly Glu Gly Ser Gly Gly Glu Asp Ala Val Leu Leu
660 665 670

Ala Asn Thr Leu Asn Ile Cys Ala Gly Leu Asn Glu Asp Val Leu Ser
675 680 685

Asn Asn Glu Tyr Thr Ala Leu Ser Thr Leu Thr Asn Lys Ile Cys Asn
690 695 700

Arg Leu Ala Gln Ile Gln Asp Asn Lys Ile Leu Gln Val Val Asp Gly
705 710 715 720

Ser Ile Lys Asp Lys Glu Leu Glu Gln Asp Met Gln Ala Leu Val Lys
725 730 735

Leu Val Leu Gln Glu Asn Gly Gly Ala Val Asp Arg Asn Ile Arg His
740 745 750

Thr Phe Leu Ser Val Phe Lys Thr Phe Tyr Tyr Asp Ala Tyr His Asp
755 760 765

Asp Glu Thr Thr Asp Leu His Ile Phe Lys Val Leu
770 775 780

<210> 3
 < 211> 867
 < 212> PRT
 < 213> Abies balsamea

5

<400> 3
 Met Ala Leu Pro Val Tyr Ser Leu Lys Ser His Ile Pro Ile Thr Thr
1 5 10 15
 Ile Ala Ser Ala Lys Met Asn Tyr Thr Pro Asn Lys Gly Met Ile Thr

ES 2 761 689 T3

Met Ile Thr Thr Asn Val Leu Tyr Thr Ile Gln Thr Thr Leu Leu Tyr
 275 280 285

Ser Leu Glu Gly Leu His Glu Ile Val Asp Phe Asp Lys Ile Ile Lys
 290 295 300

Leu Gln Ser Lys Asp Gly Ser Phe Leu Gly Ser Pro Ala Ser Thr Ala
 305 310 315 320

Ala Val Phe Met Gln Thr Gly Asn Thr Lys Cys Leu Glu Phe Leu Glu
 325 330 335

Phe Val Leu Arg Lys Phe Arg Asn His Val Pro Ser Asp Tyr Pro Leu
 340 345 350

Asp Leu Phe Glu Arg Leu Trp Val Val Asp Thr Val Glu Arg Leu Gly
 355 360 365

Ile Asp Arg His Phe Lys Lys Glu Ile Lys Asp Ala Leu Asp Tyr Val
 370 375 380

Tyr Ser Cys Trp Asp Glu Arg Gly Ile Gly Trp Ala Lys Asp Ser Pro
 385 390 395 400

Ile Ala Asp Ile Asp Asp Thr Ala Met Gly Leu Arg Ile Leu Arg Leu
 405 410 415

His Gly Tyr Asn Val Ser Pro Asp Val Leu Lys Thr Phe Lys Asp Glu
 420 425 430

Asn Gly Glu Phe Phe Cys Phe Met Gly Gln Thr Gln Arg Gly Val Thr
 435 440 445

Asp Met Leu Asn Val Tyr Arg Cys Ser Gln Val Ala Phe Pro Gly Glu
 450 455 460

Thr Ile Met Glu Glu Ala Lys Leu Cys Thr Glu Arg Tyr Leu Arg Asn
 465 470 475 480

Ala Leu Glu Asn Ala Asp Ala Phe Asp Lys Trp Ala Ile Lys Lys Asn
 485 490 495

Ile Arg Gly Glu Val Glu Tyr Ala Leu Lys Tyr Pro Trp His Arg Ser
 500 505 510

Met Pro Arg Leu Glu Val Arg Ser Tyr Ile Gly Asn Tyr Gly Pro Asn
 515 520 525

ES 2 761 689 T3

Asp Val Trp Leu Gly Lys Ser Leu Tyr Met Met Pro Tyr Ile Ser Asn
 530 535 540

Glu Lys Tyr Leu Glu Leu Ala Lys Leu Asp Phe Asn Ser Val Gln Ser
 545 550 555 560

Leu His Gln Glu Glu Ile Arg Glu Leu Val Arg Trp Cys Lys Ser Ser
 565 570 575

Gly Phe Thr Glu Leu Lys Phe Thr Arg Asp Arg Val Val Glu Thr Tyr
 580 585 590

Phe Ala Val Ala Ser Ser Met Phe Glu Pro Glu Phe Ser Thr Cys Arg
 595 600 605

Ala Val Tyr Thr Lys Ile Ser Val Leu Leu Val Ile Leu Asp Asp Leu
 610 615 620

Tyr Asp Gly Tyr Gly Ser Pro Asp Glu Ile Lys Leu Phe Ser Glu Ala
 625 630 635 640

Val Lys Arg Trp Asp Leu Ser Leu Leu Glu Gln Met Pro Asp His Met
 645 650 655

Lys Ile Cys Phe Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Val Asn Glu Val Ala Glu
 660 665 670

Glu Gly Arg Lys Thr Gln Gly His Asp Val Leu Gly Tyr Ile Arg Asn
 675 680 685

Leu Trp Glu Ile Gln Leu Ala Ala Phe Thr Arg Glu Ala Glu Trp Ser
 690 695 700

Gln Gly Lys Tyr Val Pro Ser Phe Asp Glu Tyr Ile Glu Asn Ala Gln
 705 710 715 720

Val Ser Ile Gly Val Ala Thr Ile Leu Leu Ile Thr Ile Leu Phe Thr
 725 730 735

Glu Glu Asp Asp Ile Leu Ser His Ile Asp Tyr Gly Ser Lys Phe Leu
 740 745 750

Arg Leu Ala Ser Leu Thr Ala Arg Leu Ala Asn Asp Ile Lys Thr Tyr
 755 760 765

Gln Glu Glu Arg Ala His Gly Glu Val Val Ser Ala Ile Gln Cys Tyr
 770 775 780

ES 2 761 689 T3

Met Lys Asp Arg Pro Glu Ile Thr Glu Glu Glu Ala Leu Lys Tyr Val
785 790 795 800

Tyr Gly Arg Met Val Asn Asp Leu Ala Glu Leu Asn Ser Glu Tyr Leu
805 810 815

Lys Ser Asn Glu Met Pro Gln Asn Cys Lys Arg Leu Val Phe Asp Thr
820 825 830

Ala Arg Val Ala Gln Leu Phe Thr Met Glu Gly Asp Gly Leu Thr Tyr
835 840 845

Ser Asp Thr Met Glu Ile Lys Glu His Ile Lys Lys Cys Leu Phe Glu
850 855 860

Pro Ala Thr
865

<210> 4
< 211> 792
< 212> PRT
< 213> Nicotiana tabacum

5

<400> 4
Met Val Leu Gly Leu Arg Ser Lys Ile Ile Pro Leu Pro Asp His Lys
1 5 10 15

Leu Gly Asn Ile Lys Leu Gly Ser Val Thr Asn Ala Ile Cys His Arg
20 25 30

Pro Cys Arg Val Arg Cys Ser His Ser Thr Ala Ser Ser Met Glu Glu
35 40 45

Ala Lys Glu Arg Ile Arg Glu Thr Phe Gly Lys Ile Glu Leu Ser Pro
50 55 60

Ser Ser Tyr Asp Thr Ala Trp Val Ala Met Val Pro Ser Arg Tyr Ser
65 70 75 80

Met Asn Gln Pro Cys Phe Pro Gln Cys Leu Asp Trp Ile Leu Glu Asn
85 90 95

Gln Arg Glu Asp Gly Ser Trp Gly Leu Asn Pro Ser His Pro Leu Leu
100 105 110

Val Lys Asp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Ala Ser Leu Leu Ala Leu Arg
115 120 125

ES 2 761 689 T3

Lys Trp Arg Ile Gly Asp Asn Gln Val Gln Arg Gly Leu Gly Phe Ile
 130 135 140

Glu Thr His Gly Trp Ala Val Asp Asn Lys Asp Gln Ile Ser Pro Leu
 145 150 155 160

Gly Phe Glu Ile Ile Phe Pro Cys Met Ile Asn Tyr Ala Glu Lys Leu
 165 170 175

Asn Leu Asp Leu Pro Leu Asp Pro Asn Leu Val Asn Met Met Leu Cys
 180 185 190

Glu Arg Glu Leu Thr Ile Glu Arg Ala Leu Lys Asn Glu Phe Glu Gly
 195 200 205

Asn Met Ala Asn Val Glu Tyr Phe Ala Glu Gly Leu Gly Glu Leu Cys
 210 215 220

His Trp Lys Glu Met Met Leu Arg Gln Arg His Asn Gly Ser Leu Phe
 225 230 235 240

Asp Ser Pro Ala Thr Thr Ala Ala Ala Leu Ile Tyr His Gln Tyr Asp
 245 250 255

Glu Lys Cys Phe Gly Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Lys Leu His Asp Asn
 260 265 270

Trp Val Pro Thr Ile Cys Pro Thr Lys Ile His Ser Asn Leu Phe Leu
 275 280 285

Val Asp Ala Leu Gln Asn Leu Gly Val Asp Arg Tyr Phe Lys Thr Glu
 290 295 300

Val Lys Arg Val Leu Asp Glu Ile Tyr Arg Leu Trp Leu Glu Lys Asn
 305 310 315 320

Glu Glu Ile Phe Ser Asp Val Ala His Cys Ala Met Ala Phe Arg Leu
 325 330 335

Leu Arg Met Asn Asn Tyr Glu Val Ser Ser Glu Glu Leu Glu Gly Phe
 340 345 350

Val Asp Gln Glu His Phe Phe Thr Thr Ser Ser Gly Lys Leu Met Asn
 355 360 365

His Val Ala Ile Leu Glu Leu His Arg Ala Ser Gln Val Ala Ile His

ES 2 761 689 T3

Lys Ser Thr Thr Pro Ser Ile Glu Glu Tyr Leu Ser Val Ala Cys Val
625 630 635 640

Thr Ile Gly Val Pro Cys Phe Val Leu Thr Ser Leu Tyr Leu Gly
645 650 655

Pro Lys Leu Ser Lys Asp Val Ile Glu Ser Ser Glu Val Ser Ala Leu
660 665 670

Cys Asn Cys Thr Ala Ala Val Ala Arg Leu Ile Asn Asp Ile His Ser
675 680 685

Tyr Lys Arg Glu Gln Ala Glu Ser Ser Thr Asn Met Val Ser Ile Leu
690 695 700

Ile Thr Gln Ser Gln Gly Thr Ile Ser Glu Glu Glu Ala Ile Arg Gln
705 710 715 720

Ile Lys Glu Met Met Glu Ser Lys Arg Arg Glu Leu Leu Gly Met Val
725 730 735

Leu Gln Asn Lys Glu Ser Gln Leu Pro Gln Val Cys Lys Asp Leu Phe
740 745 750

Trp Thr Thr Ile Asn Ala Ala Tyr Ser Ile His Thr His Gly Asp Gly
755 760 765

Tyr Arg Phe Pro Glu Glu Phe Lys Asn His Ile Asn Asp Val Ile Tyr
770 775 780

Lys Pro Leu Asn Gln Tyr Ser Pro
785 790

<210> 5
< 211> 2409
< 212> ADN
< 213> Yarrowia lipolytica

5

<400> 5
atgcaggtta ttattacctc ctctcaccga tttttctgcc accaccttca ccagctcaag 60
tcccctacct ccctttctgc tcagaaggct gagtttaaga agcacggccc ccgaaactgg 120
cttttcaga ctgagggtc tctcctttac aagcctgtcc gactcaactg tgctacttct 180
gatgcttctt accttggtaa cgtgaacgag taccttgagt ctgaccactc taagaactcc 240
gaggagaagg atattcaggt ttcccgaact atccagatga agggctttac cgaggagatc 300
aagcacatgc ttaactctat ggaggacgga cgacttaacg tcctgcctta cgacactgct 360
tgggtttcct ttattcctaa cactaccaac aacggaacg atcagcgacc tatgtttccc 420

ES 2 761 689 T3

tcttgtcttc agtggattat tgacaaccag ctttctgatg gttcttgggg agaggagatt 480
gttttctgca tttacgaccg actccttaac actctcgttt gtgttattgc tctcactctc 540
tggaacactt gccttcacaa gcgaaacaag ggtgtgatgt ttatcaagga gaacctttct 600
aagctggaga ctggtgaggt tgagaacatg acttctgggt ttgagcttgt ttttcccact 660
ctccttgaga aggcccagca gctcgatatt gacattccct acgatgctcc tgtcctgaag 720
gatatttacg ctcgacgaga ggtaagctc acccgaatcc ctaaggacgt tatccacact 780
attcccacta ccgttctctt ttctcttgag ggactccgag atgacctcga ctggcagcga 840
ctcctgaagc tccagatgcc tgacggttct ttcttgattt cccctgcttc cactgccttt 900
gctttcatgg agactaacga tgagaagtgt cttgcctacc ttcagaacgt tgttgagaag 960
tctaaccggag gtgcccgaca gtaccocctc gacctgttta ctcgactttg ggccattgat 1020
cgactccagc gactcggaat ctcttactac tttgccgagg agttcaagga gcttctcaac 1080
cacgtgttcc gatactggga cgaggagaac ggaattttct ctggacgaaa ctctaactt 1140
tctgatgttg atgacacttg catggctatc cgacttctcc gacttcacgg ttacgatgtt 1200
tcccctgacg cccttaacaa cttcaaggac ggcgaccagt tcgtttgctt ccgaggtgag 1260
gtggacgggt ctccctacca catgtttaac ctctaccgat gttcccaggt tcttttcccc 1320
ggagagaaga ttcttgagga ggctaagaac ttcacttaca acttccttca gcagtgcctt 1380
gctaacaacc gatgcctcga caagtgggtc attgctaagg acatccccgg cgagatttgg 1440
tacgctcttg agtttccctg gtacgcctcc cttccccgag tggaggctcg atactacatt 1500
gagcagtacg gcggagctga cgatatttgg attggcaaga ctctctaccg aatgcccgat 1560
gtcaacaaca acgtttacct tcaggctgcc aagctcgatt acaaccgatg ccagtcccag 1620
caccgatttg agtggctgat tatgacggag tggtttgaga agtgaactt tcagcagttc 1680
ggaatttcca agaagtacct ccttgtttct tacttccttg ctgccgcttc tatttttgag 1740
gtcgagaagt cccgagagcg acttgcttgg gctaagtctc gaattatctg taagatgatt 1800
acttcttact acaacgatga ggccactacc tggaccactc gaaactctct ccttatggag 1860
tttaaggttt ctcacgacct taccgaaaag aacggtaacg agactaagga gatccttggt 1920
ctcaagaacc ttcgacagtt ccttcgacag ctttctgagg agactttcga ggacctggc 1980
aaggacatcc accaccagct tcagaacgct tgggagactt ggcttgttt ccttcgagag 2040
gagaagaacg cttgtcagga ggagactgag cttctcgtgc gaactattaa cctctctggc 2100
ggctacatga cccacgatga gattcttttc gatgccgact acgagaacct gtccaacctt 2160
accaacaagg tttgtggcaa gctcaacgag cttcagaacg acaaggtcac tggcggctct 2220
aagaacacca acattgagct tgacatgcag gctctcgta agctggttt tggtaacacc 2280
tcctctaaca tcaaccagga cattaagcag actttctttg ctggtgtcaa gacctctac 2340
tactctgcc acgtttctga ggagattatg aactttcaca tttccaaggt gctctttcag 2400
caggtctaa 2409

ES 2 761 689 T3

<210> 6
 < 211> 2358
 < 212> ADN
 < 213> Yarrowia lipolytica

5

<400> 6
 atgacttctg ttaacctttc cggagccccc gctgccatta tccgacgacg acttcagctt 60
 cagcctgagt ttcacgccga gtgttcttgg ctgaagtctt cttccaagca cgtccccttc 120
 accctttcct gccagattcg acctaagcag ctctcccaga ttgccgagct tcgagttact 180
 tccctcgatg ottcccaggc ttccgagaag gacatttccc ttgttcagac tccccacaag 240
 gttgagggta acgagaagat cgaggagtct atcgagtacg tccagaacct tctcatgact 300
 tccggcgacg gacgaatttc tgtgtccccc tacgacaccg ctgtgatcgc cctgattaag 360
 gacctcaagg gtcgagatgc ccctcagttt ccctcttgtc ttgagtggat tgcccaccac 420
 cagcttgctg atggctcttg gggcgacgag ttcttctgta tttacgaccg aatcctgaac 480
 actctcgctt gtgtcgtcgc cctgaagtct tggaaccttc agtctgatat tattgagaag 540
 ggtgtgacct acatcaagga gaacgtccac aagctcaagg gtgccaacgt tgagcaccga 600
 actgccggat tcgagcttgt ggttcctacc tttatgcaga tggccactga ccttggcatt 660
 cagggctctc cctacgatca cccctcatc aaggagattg ctgacactaa gaagcagcga 720
 ctcaaggaga ttccaagga tctcgtttac cagatgccta ccaaccttct ctactccctt 780
 gagggactcg gcgaccttga gtgggagcga ctctgaagc tccagtccgg caacggctcc 840
 ttctcactt cccctcctc caccgccgcc gtccttatgc acaccaagga cgagaagtgt 900
 ctgaagtaca tcgagaacgc cctcaagaac tggcagcgag gtgctcccca cacttaccct 960
 gtcgatattt tctctcgact ttgggctatt gatcgacttc agcgacttgg tatttctcga 1020
 ttcttccagc acgagatcaa gtacttcctc gatcacatcg agtccgtttg ggaggagacc 1080
 ggagttttct ctggacgata cactaagttt tctgatattg atgacacctc tatgggcggt 1140
 cgacttctca agatgcacgg atacgacgtc gatcccaacg ttctcaagca cttcaagcag 1200
 caggatggta agttttcctg ctacattggg cagtctgtcg agtctgcctc tcctatgtac 1260
 aacctttacc gagccgccca gcttcgattc cctgggtgagg aggtttttga ggaggccact 1320
 aagtttgcct ttaacttctc tcaggagatg cttgtcaagg atcgacttca ggagcgatgg 1380
 gtgatttccg accacctttt cgatgagatt aagctgggcc tcaagatgcc ttggtacgcc 1440
 acccttcccc gagtcgaggc cgcttactac ctcgatcact acgctggttc tggatgatgt 1500

ES 2 761 689 T3

tggattggca agtctttcta ccgaatgcct gagatttcca acgataccta caaggagctt 1560
gccattctcg atttcaaccg atgccagact cagcaccagc ttgagtggat tcacatgcag 1620
gagtggtacg accgatgctc tctttccgag ttcggcattt ccaagcgaga gcttctccga 1680
tcttactttc tcgccgccgc taccattttc gagcctgagc gaactcagga gcgacttctc 1740
cttgccaaga cccgaatcct gtctaagatg attacttctt ttgtcaacat ttccggtact 1800
accctttctc tcgactacaa cttcaacggc ctcgatgaga ttatctcctc tgccaacgag 1860
gatcagggtc tggctggtac tctcctggct accttccacc agcttctcga cggattcgat 1920
atttactctc tccaccagct caagcacggt tgggtcccagt ggttcatgaa ggtgcagcag 1980
ggagaggggt ctggcggcga ggacgccgtg ctccttgcca acaccctcaa catctgcgcc 2040
ggcctcaacg aggacgtgct ctccaacaac gagtacactg ctctgtccac cctcaccaac 2100
aagatttgca accgactcgc ccagatccag gacaacaaga ttctccaggt tgtggacggc 2160
tccatcaagg ataaggagct tgagcaggat atgcaggccc ttgtcaagct cgtccttcag 2220
gagaacggcg gagccgttga ccgaaacatc cgacacacct tcctttccgt tttcaagact 2280
ttctactaag atgcctacca cgacgatgag actaccgacc ttcacatctt caaggttctc 2340
tttcgaccog ttgtgtaa 2358

<210> 7
< 211> 2604
< 212> ADN
< 213> Yarrowia lipolytica

5

<400> 7
atggccctgc ccgtttactc tctcaagtcc cacattccca tcactacat cgcctctgct 60
aagatgaact acacccccaa caagggatg attaccgcca acggacgatc tcgacgaatc 120
cgactttctc ccaacaagat cgttgcttgt gctggtgagg ctgatcgaac tttcccctct 180
cagtcccttg agaagaccgc tctctttccc gatcagtttt ctgagaagaa cggactccc 240
tctaacttca ctcccccaa ccgagagttt cccccctctt tttggaacaa cgatattatc 300
aactctatta ctgcttctca caaggttcag actggcgacc gaaagcgaat ccagactctc 360
atctctgaga ttaagaacgt cttaactct atgggcgatg gtgagacttc tccctctgct 420
tacgacaccg cttgggttgc tcgaatcccc gccgttgatg gctctgagca gcccagttt 480
ccccagactc ttgagtggat tcttcagaac cagctcaagg acggttcttg gggtgaggag 540
ttctacttcc ttgcttacga ccgacttctc gctacccttg cctgcattat taccctcacc 600
atctggcgaa ctggcaacgt tcagcttcac aagggcattg agttcttccg aaagcagggt 660
gttcgaatgg acgatgaggc tgataaccac cgaccctctg gttttgagat tgtctttccc 720
gctatgctta acgaggctaa gtccttgggt cttgacctgc cctacgagct tcccttcatt 780

ES 2 761 689 T3

gagcagatgg ttaagaagcg agaggccaag ctcaagatga ttaccaccaa cgtcctgtac 840
accattcaga ctaccctcct ttactctctg gagggccttc acgagattgt tgacttcgat 900
aagattatca agctccagtc caaggacggt tctttcctcg gctccccgc ttctactgcc 960
gctgttttca tgcagactgg taacactaag tgccttgagt tccttgagtt cgttctccga 1020
aagtttcgaa accacgtgcc ctctgactac cccctcgatc tctttgagcg actttgggtc 1080
gttgacactg ttgagcgact tggcattgat cgacacttca agaaggagat caaggacgct 1140
cttgactacg tgtactcttg ttgggacgag cgaggcattg gctgggcaa ggactctccc 1200
atcgccgata ttgatgacac tgctatgggc cttcgaatcc ttcgactgca cggatacaac 1260
gtttccccg atgttctcaa gactttcaag gacgagaacg gagagtctt ttgcttcatg 1320
ggtcagactc agcgaggagt taccgacatg cttaacgttt accgatgttc tcaggttgc 1380
tttcccgag agactatcat ggaggaggcc aagctctgta ctgagcgata cctgcgaaac 1440
gctctggaga acgccgacgc ctttgacaag tgggctatta agaagaacat tcgaggcgag 1500
gtggagtacg ctctcaagta cccctggcac cgatctatgc cccgactgga ggtgcatct 1560
tacattggta actacggccc caacgatgtc tggcttgta agtccctta catgatgcc 1620
tacatttcta acgagaagta ccttgagctt gccaaactgg acttcaactc tgtgcagtcc 1680
cttcaccagg aggagattcg agagcttgtc cgatggtgta agtccctcg tttcactgag 1740
ctgaagtta cccgagatcg agttgttgag acttacttcg ctgttgctc ctccatgtt 1800
gagcccagat tctctacctg tcgagccgtt tacactaaga tttccgttct cctcgtcatt 1860
cttgacgacc tttacgatgg ctacggttct cccgacgaga tcaagctggt ctccgagget 1920
gtcaagcgat gggatctctc ccttcttgag cagatgcccg accacatgaa gatttgcttc 1980
ctgggtcttt acaacactgt taacgagggt gctgaggagg gacgaaagac tcagggccac 2040
gatgttcttg gctacattcg aaacctttgg gagattcagc tcgccgcttt caccgagag 2100
gctgagtggc cccagggcaa gtacgtgcc tctttcgatg agtacattga gaacgcccag 2160
gtttctattg gagttgctac tatcctcctt attactattc ttttactga ggaggacgat 2220
attctctccc acattgatta cggttccaag tttctccgac tcgcttctct taccgctcga 2280
cttgccaacg acatcaagac ttaccaggag gagcgagccc acggcgaggt ggtttccgct 2340
attcagtgtt acatgaagga ccgaccogag attactgagg aggaggctct caagtacgtt 2400
tacggtcgaa tggttaacga tctcggcgag cttaactctg agtacctcaa gtctaacgag 2460
atgccccaga actgcaagcg actggttttt gacactgcc gagttgcca gcttttcaact 2520
atggaggggtg acggcctcac ctactctgac actatggaga ttaaggagca catcaagaag 2580
tgcctctttg agcccgctac ctaa 2604

<210> 8
< 211> 2379
< 212> ADN
< 213> Yarrowia lipolytica

ES 2 761 689 T3

<400> 8
atggttcttg gcctgcgatc taagatcatt ccccttcccg atcacaagct cggaaacatc 60
aagctcgggt ctgttaccaa cgctatattgc caccgaccct gtcgagtccg atgctctcac 120
tctactgctt cctctatgga ggaggctaag gagcgaatcc gagagacttt cggaaagatt 180
gagctttctc cctcctctta cgacactgct tgggttgcta tgggtcccctc tcgatactct 240
atgaaccagc cctgttttcc ccagtgcctt gactggattc ttgagaacca gcgagaggac 300
ggttcttggg gcctcaaccc ctctcaccct cttctcgtta aggactccct ttcttccact 360
ctcgttctc tcttgcctc tcgaaagtgg cgaattgggtg ataaccaggt ccagcgagggt 420
cttggttta ttgagactca cgttgggct gtcgataaca aggatcagat ttctcccctt 480
ggttttgaga ttatcttcc ctgcatgatt aactacgctg agaagctcaa ccttgacctc 540
cccctgacc ccaacctgt taacatgatg ctctgcgagc gagagcttac cattgagcga 600
gccctcaaga acgagtttga ggtaacatg gctaacgttg agtactttgc tgagggactc 660
ggtgagcttt gtcactgaa ggagatgatg cttcgacagc gacacaacgg ctctctcttt 720
gactctccc ccaccactgc cgctgccctt atttaccacc agtacgatga gaagtgcttt 780
ggctacctca actctatcct caagctccac gataactggg ttcccactat tgccccact 840
aagattcact ctaacctttt cctogttgat gcccttcaga acctcggagt tgaccgatac 900
tttaagactg aggttaagcg agttctcgat gagatttacc gactttggct tgagaagaac 960
gaggagattt tttctgacgt tgctcactgt gctatggctt ttcgactcct tcgaatgaac 1020
aactacgagg tttcctctga ggagcttgag ggttttggtg accaggagca cttctttact 1080
acctcctctg gcaagctcat gaaccacgtt gctattctgg agcttcaccg agcttctcag 1140
gtggctattc acgagcgaaa ggaccacatt cttgataaga tttctacttg gactcgaaac 1200
tttatggagc agaagctcct tgacaagcac attcccagcc gatctaagaa ggagatggag 1260
tttgctatgc gaaagtttta cggcactttc gaccgagtgg agactcgacg atacatcgag 1320
tcttacaaga tggactcctt taagattctc aaggccgctt accgatcttc cggtattaac 1380
aacattgacc ttctcaagtt ctctgagcac gatttcaacc tctgccagac ccgacacaag 1440
gaggagcttc agcagatgaa gcgatggttc accgattgca agctggagca ggtcggctct 1500
tctcagcagt acctctacac ttcttacttc attatgccc ctatcctctt tgagcccagag 1560
tacgctgatg ctcgacttgc ttacgctaag tacgccatca ttatcactgc cgtggacgat 1620
ttcttcgatt gttttatttg caaggaggag cttcagaaca tcatcgagct tgtcgagcga 1680
tgggagggat actctaccgt cggattccga tctgagcgag ttcgaatfff ctctcttccc 1740

ES 2 761 689 T3

ctttacaaga	tggttgagga	gattgctgcc	aaggccgaga	ctaagcaggg	tcgatgtgtc	1800
aaggatcacc	ttattaacct	ttggattgat	atgctcaagt	gtatgctggt	tgagcttgac	1860
ctttggaaga	ttaagtccac	taccccctct	atcgaggagt	acctttctgt	tgccctgtgt	1920
actattggtg	ttccctgttt	tgttctcact	tctctctacc	ttctcggacc	caagctgtcc	1980
aaggacgtca	ttgagtcctc	tgaggtttcc	gccctttgca	actgtactgc	cgctgtcgcc	2040
cgacttatta	acgatattca	ctoctacaag	cgagagcagg	ctgagtcctc	tactaacatg	2100
gtttctatcc	ttatcaccca	gtcccagggt	actatctctg	aggaggaggc	tattcgacag	2160
attaaggaga	tgatggagtc	taagcgacga	gagcttctcg	gaatggttct	ccagaacaag	2220
gagtcccagc	tccccaggt	gtgcaaggac	ctcttttgga	ctaccatcaa	cgccgcttac	2280
tctattcaca	ctcacggcga	tgataaccga	ttccccgagg	agttcaagaa	ccacatcaac	2340
gatgttattt	acaagcccct	caaccagtac	tccccctaa			2379

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir abienol, que comprende convertir difosfato de geranylgeranilo (GGPP) en abienol en presencia de una combinación de (1) diterpeno sintasa (diTPS) de clase II con al menos 50% de identidad en un polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y (2) abienol sintasa de clase I/II (CAS) bifuncional con al menos 50% de identidad con un polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 3.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la diTPS de clase II es de tabaco o salvia.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la abienol sintasa de clase I/II bifuncional es de abeto.
- 10 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que abienol es producido por una célula huésped que expresa de forma recombinante al menos una de dichas diTPS de clase II y dichas abienol sintasa de clase I/II bifuncional.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula huésped es un microorganismo recombinante que se modifica genéticamente para expresar al menos un polipéptido exógeno seleccionado del grupo que consiste en dicha diTPS de clase II y dicha abienol sintasa de clase I/II bifuncional.
- 15 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el microorganismo recombinante comprende al menos un ácido nucleico que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en dicha diTPS de clase II y dicha abienol sintasa de clase I/II bifuncional.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la célula huésped es un hongo.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la célula huésped es *Yarrowia lipolytica*.
- 20 9. Una célula huésped que comprende una diterpeno sintasa heteróloga de clase II con al menos un 50% de identidad con un polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y una abienol sintasa heteróloga de clase I/II (CAS) bifuncional con al menos 50% de identidad con un polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 3.
10. La célula huésped de la reivindicación 9, en la que la diTPS de clase II es de tabaco o salvia.
11. La célula huésped recombinante de la reivindicación 9, en la que la abienol sintasa de clase I/II bifuncional es de abeto.
- 25 12. La célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que es un hongo.
13. La célula huésped de la reivindicación 12, que es *Yarrowia lipolytica*.
14. Un vector de expresión que comprende una molécula de polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 o que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.
- 30 15. El vector de expresión de la reivindicación 14, en el que una o ambas secuencias de polinucleótidos están operativamente enlazadas a una secuencia de control de la transcripción.

FIG. 1

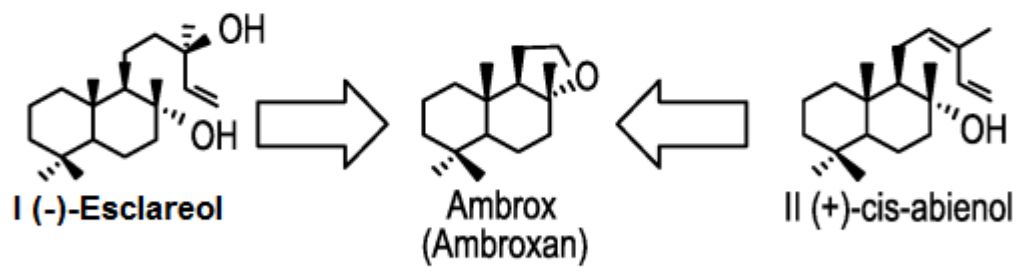


FIG. 2A

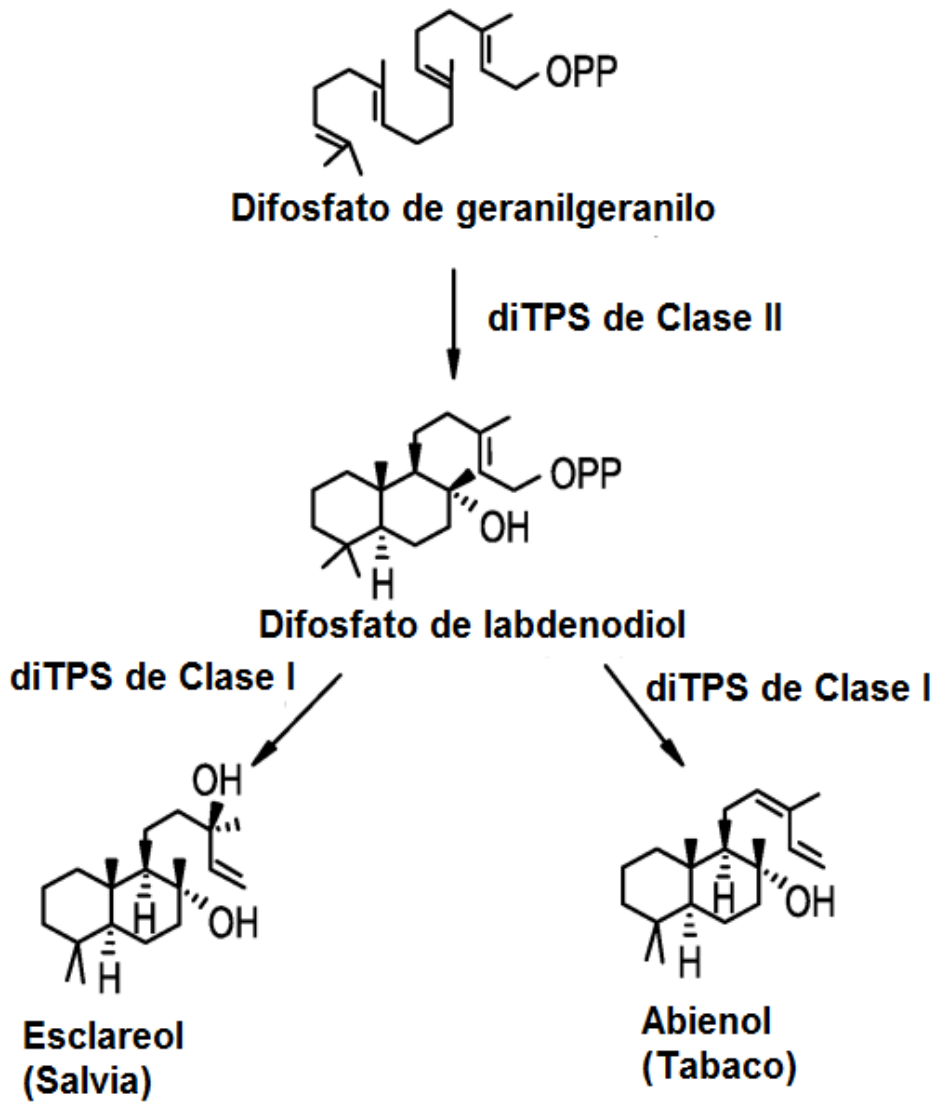
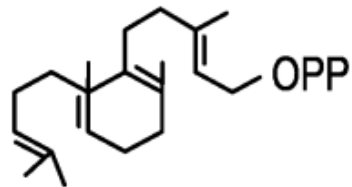
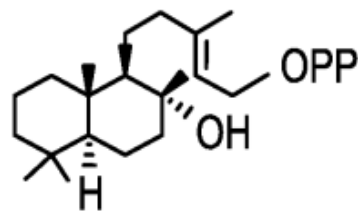


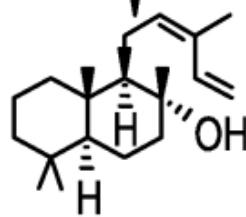
FIG. 2B



Difosfato de geranilgeranilo



Difosfato de labdenodiol



Abienol
(Abeto)

FIG. 3A

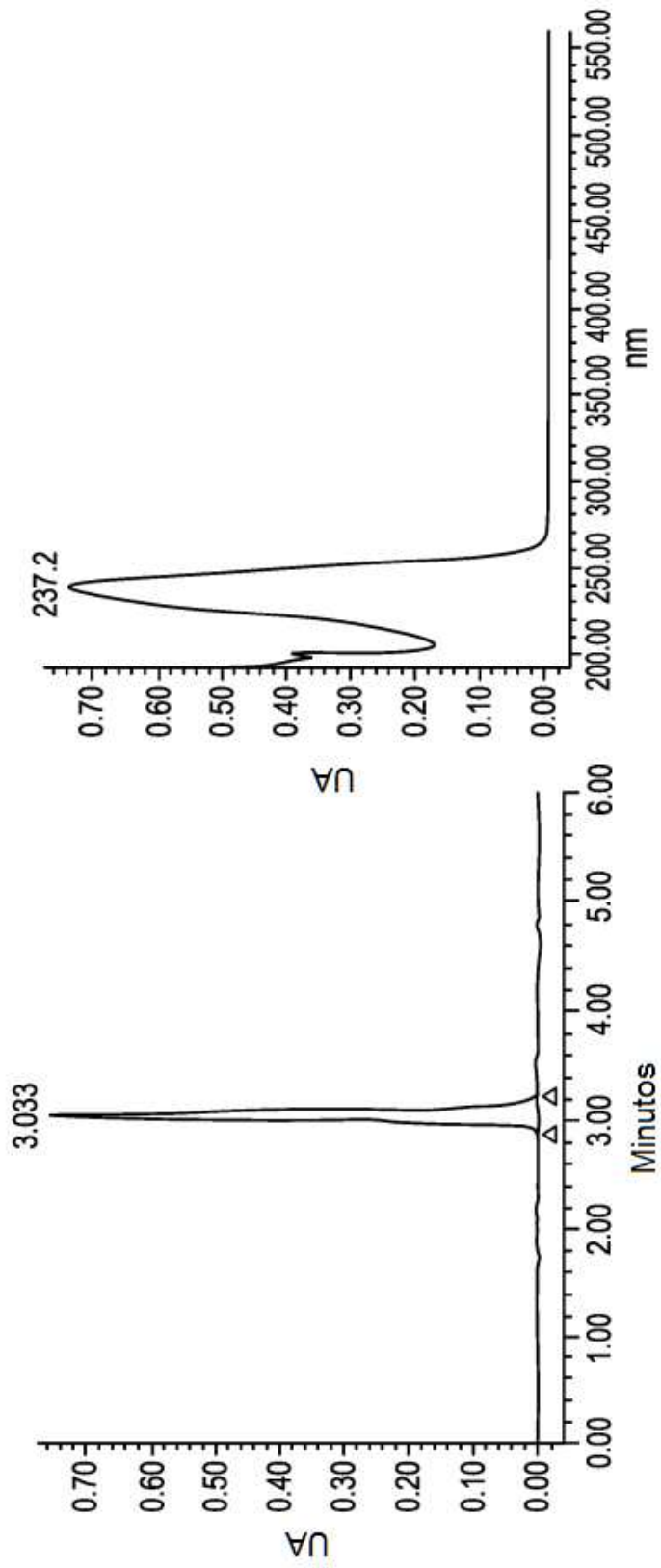


FIG. 3B

