

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 394**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/12** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 15/77** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2008** **E 11193520 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014** **EP 2431476**

54 Título: **Bacterias corineformes con actividad de escisión de glicina**

30 Prioridad:

**19.02.2007 EP 07102652**

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

**03.11.2014**

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)**  
**Rellinghauser Strasse 1-11**  
**45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**ZELDER, OSKAR;**  
**SCHRÖDER, HARTWIG;**  
**KLOPPROGGE, CORINNA;**  
**HEROLD, ANDREA;**  
**HAEFNER, STEFAN;**  
**PATTERSON, THOMAS A.;**  
**YOCUM, R. ROGERS y**  
**PERO, JANICE G.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 517 394 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

Bacterias corineformes con actividad de escisión de glicina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para producir L-metionina y a bacterias corineformes que presentan un sistema de escisión de glicina funcional.

Antecedentes de la invención

Actualmente, la producción anual mundial de metionina es alrededor de 500.000 toneladas. La metionina es el primer aminoácido limitante en el ganado de aves de corral y en el pienso, y, debido a esto, se aplica principalmente como suplemento del pienso.

10 En contraste con otros aminoácidos industriales, la metionina se aplica casi exclusivamente como un racemato de D- y L-metionina, que se produce mediante síntesis química. Puesto que los animales pueden metabolizar ambos estereoisómeros de metionina, es posible la alimentación directa de la mezcla racémica producida químicamente (D'Mello y Lewis, Effect of Nutrition Deficiencies in Animals: Amino Acids, Rechgigl (Ed.), CRC Handbook Series in Nutrition and Food, 441-490, 1978).

15 Sin embargo, existe todavía un gran interés en la sustitución de la producción química existente mediante un procedimiento biotecnológico que produzca exclusivamente L-metionina. Esto es debido al hecho de que, a menores niveles de suplementación, L-metionina es una mejor fuente de aminoácidos de azufre que D-metionina (Katz y Baker (1975) Poult. Sci. 54: 1667-74). Además, el procedimiento químico usa sustancias químicas más bien peligrosas, y produce corrientes residuales sustanciales. Todas estas desventajas de producción química se podrían evitar mediante un procedimiento biotecnológico eficiente.

20 La producción fermentativa de sustancias químicas finas, tales como aminoácidos, compuestos aromáticos, vitaminas y cofactores, se lleva a cabo típicamente hoy en microorganismos tales como *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Pichia pastoris* (*P. pastoris*), *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* o *Gluconobacter oxydans*.

25 Los aminoácidos tales como glutamato se producen así usando métodos de fermentación. Para estos fines, se ha mostrado que ciertos organismos tales como *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) son particularmente adecuados. La producción de aminoácidos mediante fermentación también tiene, entre otras, la ventaja de que sólo se producen L-aminoácidos, y que se evitan sustancias químicas medioambientalmente problemáticas tales como disolventes, ya que se usan típicamente en síntesis química.

30 Algunos intentos en la técnica anterior para producir sustancias químicas finas tales como aminoácidos, lípidos, vitaminas o hidratos de carbono en microorganismos tales como *E. coli* y *C. glutamicum* han intentado lograr esta meta incrementando, por ejemplo, la expresión de genes implicados en las rutas biosintéticas de las sustancias químicas respectivas.

35 Los intentos para incrementar la producción de por ejemplo lisina al aumentar la expresión de genes que están implicados en la ruta biosintética de la producción de lisina se describen, por ejemplo, en los documentos WO 02/10209, WO 2006008097, WO2005059093, o en Cremer et al. (Appl. Environ. Microbiol, (1991), 57(6), 1746-1752).

40 Krömer et al. (Metabolic Engineering 8 (2006) 353-369) analizan rutas metabólicas teóricas para la producción de L-metionina mediante *E. coli* y *C. glutamicum*. A fin de mejorar la producción de metionina a partir de sustratos de azúcar mediante *C. glutamicum*, los autores proponen introducir el sistema de escisión de glicina en *C. glutamicum*.

Sin embargo, existe todavía una fuerte necesidad para identificar dianas adicionales en las rutas metabólicas que se puedan usar para influir beneficiosamente en la producción de metionina en microorganismos tales como *C. glutamicum*.

45 Objeto y sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos para la producción de L-metionina en microorganismos.

Es un objeto además de la presente invención proporcionar microorganismos que producen L-metionina.

Estos y otros objetos de la invención, según se manifestarán a partir de las descripciones que se suceden, se logran mediante la materia objeto de las reivindicaciones independientes.

50 Otras realizaciones de la invención se definen por las reivindicaciones dependientes.

El método usa un microorganismo del género *Corynebacterium*. Se prefiere particularmente el uso de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

5 La presente invención se refiere a métodos en los que se cultiva un microorganismo, a saber, una corinebacteria, que se obtiene mediante modificación genética a partir de un organismo de partida, de manera que la actividad enzimática de un sistema de escisión de glicina (GCS) está incrementada en comparación con el organismo de partida.

10 Esto se puede lograr mediante modificación genética de un organismo de partida de manera que la cantidad y/o actividad de glicina descarboxilasa dependiente de PLP (*gcvP*, proteína P), aminometil transferasa que contiene lipoamida (*gcvH*, proteína H) y enzima sintetizadora de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF (*gcvT*, proteína T) están incrementadas en comparación con el organismo de partida. Estas modificaciones genéticas aseguran que la glicina acumulada se convierta en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, CO<sub>2</sub> y N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF. Los microorganismos se pueden cultivar en presencia de ácido lipoico y/o lipoamida.

15 Adicionalmente, los microorganismos se modifican además genéticamente de manera que presentan una mayor cantidad y/o actividad biológica de ácido lipoico sintasa (*lipA*), lipoil transferasa (*lipB*), y/o ácido lipoico sintetasa (*lipA*).

Los microorganismos cultivados se pueden modificar adicional o alternativamente de forma genética para presentar una mayor cantidad y/o actividad de una lipoamida deshidrogenasa (*lpd*) que requiere FAD, dependiente de NAD<sup>+</sup>.

20 Se describe además un método que permite producir L-metionina cultivando microorganismos que se han modificado genéticamente de manera que se incrementa la cantidad y/o actividad biológica de formiato-THF-sintetasa, y de manera que se ha establecido un sistema de escisión de glicina funcional. Tales microorganismos presentarán típicamente una mayor cantidad y/o actividad biológica de formiato-THF-sintetasa, *gcvH*, *gcvP* y *gcvT* (*gcvHPT*). En un aspecto, estos últimos microorganismos se cultivarán en presencia de ácido lipoico y/o lipoamida. Como alternativa, o adicionalmente, los microorganismos se pueden modificar además genéticamente para presentar una mayor cantidad y/o actividad de *lipA*, *lipB* y/o *lipA*. Los microorganismos también pueden presentar una mayor cantidad y/o actividad biológica de *lpd*.

30 Las realizaciones descritas anteriormente de métodos según la invención se llevan a cabo preferiblemente cultivando microorganismos de la especie *C. glutamicum*. Las modificaciones genéticas descritas anteriormente se pueden introducir en una cepa de tipo salvaje de *C. glutamicum*. En realizaciones preferidas, estas alteraciones genéticas se introducen en una cepa de *C. glutamicum* que ya se considera que es una cepa productora de metionina.

Las secuencias codificantes para las formiato-THF-sintetasa *gcvP*, *gcvT*, *gcvH*, *lipA*, *lipA* y *lipB* mencionadas anteriormente derivan preferiblemente de *C. jeikeium* o *E. coli*. Se han de considerar particularmente las secuencias de *C. jeikeium* en caso de que el método se lleve a cabo cultivando cepas de *C. glutamicum*.

35 Se describen además microorganismos que se han derivado mediante modificación genética a partir de un microorganismo de partida para producir más N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF en comparación con el organismo de partida. Los microorganismos se seleccionan de las bacterias del género corineforme, siendo preferidas la especie *C. glutamicum*.

40 En un aspecto, el microorganismo se obtiene mediante modificación genética a partir de un organismo de partida de manera que la cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa se incrementan en comparación con el organismo de partida. Otras elaboraciones de este último aspecto comprenden microorganismos con una disminución en la cantidad y/o actividad de formiato-THF-desformilasa, y/o con un incremento en cualquiera de las actividades de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-THF-ciclosintetasa, N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-THF-reductasa y/o N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF-reductasa.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a bacterias corineformes que se obtienen mediante modificación genética a partir de un organismo de partida de manera que la actividad enzimática de un sistema de escisión de glicina está incrementada en dicho organismo en comparación con el organismo de partida.

Además, el microorganismo está modificado además de forma genética para presentar una mayor capacidad para captar ácido lipoico y/o lipoamida proporcionados externamente, y/o para sintetizar endógenamente ácido lipoico. Para este fin, la cantidad y/o actividad de *lipA*, *lipA* y/o *lipB* está incrementada en dichos microorganismos. La cantidad y/o actividad de *lpd* también puede estar incrementada en comparación con el organismo de partida.

50 El microorganismo se puede alterar genéticamente a fin de presentar una mayor cantidad y/o actividad de *gcvP*, *gcvT* y *gcvH*.

El microorganismo deriva preferiblemente de la especie de *C. glutamicum*. Las alteraciones genéticas se pueden introducir en una cepa de tipo salvaje de *C. glutamicum*, o en una cepa que ya se considera que es una cepa productora de metionina.

Se describen además aquí bacterias corineformes en las que la cantidad y/o actividad biológica de formiato-THF-sintetasa, *gcvP*, *gcvT* y *gcvH* están incrementadas en comparación con el organismo de partida. En elaboraciones adicionales de este aspecto, la cantidad y/o actividad de *lpIA*, *lipA* y/o *lipB* se pueden incrementar en comparación con el organismo de partida. Como alternativa y/o adicionalmente, la cantidad y/o actividad de *lpd* puede estar incrementada.

5

El microorganismo deriva preferiblemente de la especie de *C. glutamicum*. Las alteraciones genéticas se pueden introducir en una cepa de tipo salvaje de *C. glutamicum*, o en una cepa que ya se considera que es una cepa productora de metionina.

Leyendas de las figuras

10 La Figura 1 muestra una comparación de secuencias de la secuencia de aminoácidos de *lpd* de *C. jeikeum* y *C. glutamicum*.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a un método para producir L-metionina, que comprende la etapa de cultivar un microorganismo genéticamente modificado y aislar opcionalmente metionina. La presente invención también se refiere a un microorganismo genéticamente modificado que es capaz de producir L-metionina.

La invención se basa en el hallazgo de que una producción eficiente de L-metionina (también denominada como metionina) se puede lograr en microorganismos si tales organismos se han modificado genéticamente a partir de un organismo de partida de manera que el microorganismo resultante produce más N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-tetrahidrofolato (THF) en comparación con el organismo de partida.

20 Antes de describir con detalle realizaciones ejemplares de la presente invención, se dan las siguientes definiciones.

Un nombre de un gen o un nombre de una proteína, por ejemplo, pero sin limitarse a, formiato-THF-sintetasa, *gcvPTH*, *lipA*, *lipB*, *lpIA*, *lpd*, y cualquier otro nombre de gen o de proteína contenido aquí, se referirá al gen y/o a la proteína o enzima codificada por dicho gen, o a ambos, dependiendo del contexto en el que se use el nombre.

25 La expresión “alrededor de”, en el contexto de la presente invención, representa un intervalo de exactitud que la persona experta en la técnica entenderá que es habitual para el rasgo en cuestión. La expresión indica típicamente desviación del valor numérico indicado de +/- 10%, y preferiblemente +/- 5%.

El término “microorganismo”, para los fines de la presente invención, se refiere a procariotas y a eucariotas inferiores.

30 Los organismos de la presente invención comprenden así microorganismos tal como son conocidos en la técnica como útiles para la producción de sustancias químicas finas tales como aminoácidos, vitaminas, cofactores enzimáticos, etc. Se seleccionan del género de *Corynebacterium*, con un foco particular en *Corynebacterium glutamicum*.

35 Como se explicará con detalle mediante la siguiente descripción, la presente invención se refiere principalmente a microorganismos que se han modificado genéticamente a fin de presentar una mayor cantidad y/o actividad de ciertas enzimas.

40 Las expresiones “modificación genética” y “alteración genética”, así como sus variaciones gramaticales dentro del significado de la presente invención, pretenden significar que un microorganismo se ha modificado por medio de tecnología génica para expresar una cantidad alterada de una o más proteínas que pueden estar presentes de forma natural en el microorganismo respectivo, una o más proteínas que no están presentes de forma natural en el microorganismo respectivo, o una o más proteínas con una actividad alterada en comparación con las proteínas del microorganismo no modificado respectivo. Se considera que un microorganismo no modificado es un “organismo de partida”, cuya alteración genética da como resultado un microorganismo según la presente invención.

45 La expresión “organismo de partida” se puede referir por lo tanto al tipo salvaje de un organismo. En el caso de *C. glutamicum*, éste puede ser por ejemplo ATCC13032. Sin embargo, la expresión “organismo de partida”, para los fines de la presente invención, también se puede referir a un organismo que ya posee alteraciones genéticas en comparación con el organismo de tipo salvaje de la especie respectiva, pero que entonces se modifica además genéticamente a fin de producir un organismo según la presente invención.

50 En caso de *C. glutamicum*, el organismo de partida puede ser así una cepa de *C. glutamicum* de tipo salvaje, tal como ATCC13032. Sin embargo, el organismo de partida puede ser también preferiblemente, por ejemplo, una cepa de *C. glutamicum* que ya se ha manipulado mediante ingeniería para la producción de metionina.

Tal organismo de partida productor de metionina puede derivar por ejemplo de una bacteria corineforme de tipo salvaje, y preferiblemente de una bacteria *C. glutamicum* de tipo salvaje que contiene alteraciones genéticas en al menos uno de los siguientes genes: *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>* y *metH*, en la que las alteraciones genéticas conducen a la

sobreexpresión de cualquiera de estos genes, dando de ese modo como resultado una mayor producción de metionina con respecto a la metionina producida en ausencia de las alteraciones genéticas. En una realización preferida, tal organismo de partida productor de metionina contendrá alteraciones genéticas simultáneamente en *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>* y *metH*, dando como resultado de ese modo una mayor producción de metionina con respecto a la metionina producida en ausencia de las alteraciones genéticas.

En estos organismos de partida, las copias endógenas de *ask* y *hom* se cambian típicamente a alelos resistentes a la retroalimentación, que ya no están sujetos nunca más a la inhibición por retroalimentación mediante lisina, treonina, metionina, o mediante una combinación de estos aminoácidos. Esto se puede realizar mediante mutación y selección, o mediante sustituciones genéticas definidas de los genes por alelos mutados que codifican proteínas con inhibición por retroalimentación reducida o disminuida. Una cepa de *C. glutamicum* que incluye estas alteraciones genéticas es, por ejemplo, *C. glutamicum* DSM17322. La persona experta en la técnica estará al tanto de que se pueden usar alteraciones genéticas alternativas a aquellas que se han descrito más abajo para la generación de *C. glutamicum* DSM17322 para lograr también la sobreexpresión de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>* y *metH*.

Para los fines de la presente invención, *ask<sup>fbr</sup>* representa una aspartato cinasa resistente a retroalimentación. *hom<sup>fbr</sup>* representa una homoserina deshidrogenasa resistente a retroalimentación. *metH* representa una metionina sintasa dependiente de vitamina B12.

En otra realización preferida, un organismo de partida productor de metionina puede derivar de una bacteria corineforme de tipo salvaje, y preferiblemente de una bacteria *C. glutamicum* de tipo salvaje que contiene alteraciones genéticas en al menos uno de los siguientes genes: *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA* (también denominado como *metX*), *metY* (también denominado como *metZ*), y *hsk<sup>mutado</sup>*, en la que las alteraciones genéticas conducen a la sobreexpresión de cualquiera de estos genes, dando como resultado de ese modo una mayor producción de metionina con respecto a la metionina producida en ausencia de las alteraciones genéticas. En una realización preferida, tal organismo de partida productor de metionina contendrá alteraciones genéticas simultáneamente en *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA* (también denominado como *metX*), *metY* (también denominado como *metZ*), y *hsk<sup>mutado</sup>*, dando como resultado de ese modo una mayor producción de metionina con respecto a la metionina producida en ausencia de las alteraciones genéticas.

En estos organismos de partida, las copias endógenas de *ask*, *hom* y *hsk* se sustituyen típicamente por *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, y *hsk<sup>mutado</sup>* como se describe anteriormente para *ask<sup>fbr</sup>* y *hom<sup>fbr</sup>*. Una cepa de *C. glutamicum* que incluye estas alteraciones genéticas es, por ejemplo, *C. glutamicum* M2014. La persona experta en la técnica estará al tanto de que se pueden usar alteraciones genéticas alternativas a aquellas que se describen más abajo específicamente para la generación de *C. glutamicum* M2014, para lograr también la sobreexpresión de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA* (también denominado como *metX*), *metY* (también denominado como *metZ*), y *hsk<sup>mutado</sup>*.

Para los fines de la presente invención, *metA* representa una homoserina succiniltransferasa de por ejemplo *E. coli*. *metY* representa una O-acetilhomoserina sulfhidrilasa. *hsk<sup>mutado</sup>* representa una homoserina cinasa que se ha mutado para mostrar actividad enzimática reducida. Esto se puede lograr intercambiando treonina con serina o alanina en una posición que corresponde a T190 de *hsk* de *C. glutamicum* ATCC 13032 con número de acceso Genbank Cg11184. Como alternativa o adicionalmente, se puede sustituir el codón de partida ATG por un codón de partida TTG. Tales modificaciones conducen a una reducción en la actividad enzimática de la proteína *hsk* resultante en comparación con el gen *hsk* no mutado.

En otra realización preferida, un organismo de partida productor de metionina puede derivar de una bacteria corineforme de tipo salvaje, y preferiblemente de una bacteria *C. glutamicum* de tipo salvaje que contiene alteraciones genéticas en al menos uno de los siguientes genes: *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA* (también denominado como *metX*), *metY* (también denominado como *metZ*), *hsk<sup>mutado</sup>* y *metF*, en la que las alteraciones genéticas conducen a la sobreexpresión de cualquiera de estos genes, en combinación con alteraciones genéticas en uno de los siguientes genes: *serA*, en la que las alteraciones genéticas disminuyen la expresión de este gen en el que la combinación da como resultado una mayor producción de metionina por el microorganismo con respecto a la producción de metionina en ausencia de la combinación.

En estos organismos de partida, la copia endógena de *ask*, *hom*, *hsk* se sustituye como se describe anteriormente, y la copia endógena de *serA* se interrumpe típicamente de forma funcional. Una cepa de *C. glutamicum* que incluye estas alteraciones genéticas es, por ejemplo, *C. glutamicum* OM264C. La persona experta en la técnica estará al tanto de que se pueden usar alteraciones genéticas alternativas a aquellas que se describen más abajo específicamente para la generación de *C. glutamicum* OM264C, para lograr también la sobreexpresión de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA* (también denominado como *metX*), *metY* (también denominado como *metZ*), *hsk<sup>mutado</sup>* y *metF*, y la expresión reducida de *serA*.

Para los fines de la presente invención, *serA* representa 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (véase la Tabla 1).

En otra realización preferida, un organismo de partida productor de metionina puede derivar de una bacteria corineforme de tipo salvaje, y preferiblemente de una bacteria *C. glutamicum* de tipo salvaje que contiene alteraciones genéticas en al menos uno de los siguientes genes: *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA* (también denominado

como *metX*), *metY* (también denominado como *metZ*), *hsk<sup>mutado</sup>* y *metF*, en la que las alteraciones genéticas conducen a la sobreexpresión de cualquiera de estos genes, en combinación con alteraciones genéticas en al menos uno de los siguientes genes: *mcbR* y *metQ*, en la que las alteraciones genéticas disminuyen la expresión de cualquiera de estos genes, en la que la combinación da como resultado una mayor producción de metionina por el microorganismo con respecto a la producción de metionina en ausencia de la combinación. En una realización preferida, tal organismo de partida productor de metionina contendrá alteraciones genéticas simultáneamente en *ask<sup>fb</sup>*, *hom<sup>fb</sup>*, *metH*, *metA* (también denominado como *metX*), *metY* (también denominado como *metZ*), *hsk<sup>mutado</sup>* y *metF*, en el que las alteraciones genéticas conducen a la sobreexpresión de cualquiera de estos genes, en combinación con alteraciones genéticas en *mcbR* y *metQ*, en el que las alteraciones genéticas disminuyen la expresión de cualquiera de estos genes, en el que la combinación da como resultado una mayor producción de metionina por el microorganismo con respecto a la producción de metionina en ausencia de la combinación.

En estos organismos de partida, las copias endógenas de *ask*, *hom* y *hsk* se sustituyen típicamente como se describe anteriormente, mientras que las copias endógenas de *mcbR* y *metQ* están interrumpidas o suprimidas típicamente de forma funcional. Una cepa de *C. glutamicum* que incluye estas alteraciones genéticas es, por ejemplo, *C. glutamicum* OM469. La persona experta en la técnica estará al tanto de que se pueden usar alteraciones genéticas alternativas a aquellas que se describen más abajo específicamente para la generación de *C. glutamicum* OM469, para lograr también la sobreexpresión de *ask<sup>fb</sup>*, *hom<sup>fb</sup>*, *metH*, *metA* (también denominado como *metX*), *metY* (también denominado como *metZ*), *hsk<sup>mutado</sup>* y *metF*, y la expresión reducida de *mcbR* y *metQ*.

Para los fines de la presente invención, *metF* representa una N<sup>5</sup>,10-metileno-tetrahidrofolato reductasa (EC 1.5.1.20). *mcbR* representa un regulador transcripcional de tipo TetR del metabolismo del azufre (número de acceso Genbank AAP45010). *metQ* representa una lipoproteína de unión a D-metionina que funciona en la importación de metionina.

En una realización preferida adicional, un organismo de partida productor de metionina puede derivar de una bacteria corineforme de tipo salvaje, y preferiblemente de una bacteria *C. glutamicum* de tipo salvaje que contiene alteraciones genéticas en al menos uno de los siguientes genes: *ask<sup>fb</sup>*, *hom<sup>fb</sup>*, *metH*, *metA* (también denominado como *metX*), *metY* (también denominado como *metZ*), *hsk<sup>mutado</sup>*, *metF*, *tkl*, *tal*, *zwf* y *6pgl*, en la que las alteraciones genéticas conducen a la sobreexpresión de cualquiera de estos genes, en combinación con alteraciones genéticas en al menos uno de los siguientes genes: *mcbR*, *metQ* y *sda*, en la que las alteraciones genéticas disminuyen la expresión de cualquiera de estos genes, en la que la combinación da como resultado una mayor producción de metionina por el microorganismo con respecto a la producción de metionina en ausencia de la combinación. En una realización preferida, tal organismo de partida productor de metionina contendrá alteraciones genéticas simultáneamente en *ask<sup>fb</sup>*, *hom<sup>fb</sup>*, *metH*, *metA* (también denominado como *metX*), *metY* (también denominado como *metZ*), *hsk<sup>mutado</sup>*, *metF*, *tkl*, *tal*, *zwf* y *6pgl*, en el que las alteraciones genéticas conducen a la sobreexpresión de cualquiera de estos genes, en combinación con alteraciones genéticas en al menos uno de los siguientes genes: *mcbR*, *metQ* y *sda*, en el que las alteraciones genéticas disminuyen la expresión de cualquiera de estos genes, en el que la combinación da como resultado una mayor producción de metionina por el microorganismo con respecto a la producción de metionina en ausencia de la combinación.

Una cepa de *C. glutamicum* que incluye estas alteraciones genéticas es, por ejemplo, *C. glutamicum* GK1259. La persona experta en la técnica estará al tanto de que se pueden usar alteraciones genéticas alternativas a aquellas que se describen más abajo específicamente para la generación de *C. glutamicum* GK1259, para lograr también la sobreexpresión de *ask<sup>fb</sup>*, *hom<sup>fb</sup>*, *metH*, *metA* (también denominado como *metX*), *metY* (también denominado como *metZ*), *hsk<sup>mutado</sup>*, *metF*, *tkl*, *tal*, *zwf* y *6pgl*, y la expresión reducida de *mcbR*, *metQ* y *sda*.

Para los fines de la presente invención, *tkl* representa transcetolasa, *tal* representa transaldolasa, *zwf* representa glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, *6pgl* representa 6-fosfo-glucono-lactonasa, y *sda* representa serina desaminasa (véase la Tabla 1). La persona experta en la técnica entiende que para incrementar la cantidad y/o actividad de *zwf*, se incrementará también la cantidad y/o actividad de *opca*, que sirve como una proteína de armazón estructural para *zwf*. En GK1259, esto se logra mediante el uso del promotor P<sub>SOD</sub> que incrementa simultáneamente la transcripción del operón de fosfato de pentosa que comprende *tkl*, *tal*, *zwf* y *6pgl*.

Como se ha expuesto anteriormente, los microorganismos genéticamente modificados de la presente invención se caracterizan por que se incrementa la cantidad de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF.

Típicamente, la cantidad de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF se incrementará en el microorganismo según la presente invención en comparación con el organismo de partida respectivo en al menos alrededor de 2%, al menos alrededor de 5%, al menos alrededor de 10%, o al menos alrededor de 20%. En otras realizaciones preferidas, la cantidad de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF se incrementará en al menos alrededor de 30%, en al menos alrededor de 50%, o en al menos alrededor de 75%. Incluso realizaciones más preferidas se refieren a microorganismos en los que la cantidad de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF se incrementa en al menos alrededor de un factor de 2, al menos alrededor de un factor de 5, o al menos alrededor de un factor de 10.

Los métodos y microorganismos según la presente invención se pueden usar para producir más metionina en comparación con una situación en la que se cultiva el microorganismo de partida respectivo, que no se ha

modificado genéticamente como se esboza más abajo. Los microorganismos y métodos de la presente invención también se pueden usar para incrementar la eficiencia de la síntesis de metionina.

La expresión "eficiencia de la síntesis de metionina" describe el rendimiento de carbono de metionina. Esta eficiencia se calcula como un porcentaje de la entrada de energía que entra en el sistema en forma de un sustrato de carbono. A lo largo de la invención, este valor se da en valores de porcentajes ((mol de metionina) (mol de sustrato de carbono)<sup>-1</sup> x 100). La expresión "mayor eficiencia de la síntesis de metionina" se refiere así a una comparación entre el organismo de partida y la bacteria corineforme actual, en la que se han incrementado la cantidad y/o actividad de al menos una de las enzimas mencionadas más abajo.

Las fuentes de carbono preferidas según la presente invención son azúcares tales como mono-, di- o polisacáridos. Por ejemplo, los azúcares seleccionados del grupo que comprenden glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa pueden servir como fuentes de carbono particularmente preferidas.

Los métodos y bacterias corineformes según la invención también se pueden usar para producir más metionina en comparación con el organismo de partida.

Los métodos y bacterias corineformes según la invención también se pueden usar para producir metionina a una velocidad más rápida en comparación con el organismo de partida. Si, por ejemplo, se considera un período de producción típico, los métodos y bacterias corineformes permitirán producir metionina a una velocidad más rápida, es decir, se producirá la misma cantidad de metionina en un punto en el tiempo más pronto, en comparación con el organismo de partida. Esto se aplica particularmente para la fase de crecimiento logarítmica.

Los métodos y bacterias corineformes según la invención permiten producir al menos alrededor de 3 g de metionina/l de volumen de cultivo si la cepa se incuba en incubaciones de matraces de agitación. Se puede preferir un título de al menos alrededor de 4 g de metionina/l de volumen de cultivo, al menos alrededor de 5 g de metionina/l de volumen de cultivo, o al menos alrededor de 7 g de metionina/l de volumen de cultivo si la cepa se incuba en incubaciones de matraces de agitación. Un valor más preferido asciende hasta al menos alrededor de 10 g de metionina/l de volumen de cultivo, e incluso más preferiblemente hasta al menos alrededor de 20 g de metionina/l de masa celular si la cepa se incuba en incubaciones de matraces de agitación.

Los métodos y bacterias corineformes según la invención permiten producir al menos alrededor de 25 g de metionina/l de volumen de cultivo si la cepa se incuba en experimentos de fermentación usando un fermentador agitado y alimentado con fuente de carbono. Se puede preferir un título de al menos alrededor de 30 g de metionina/l de volumen de cultivo, al menos alrededor de 35 g de metionina/l de volumen de cultivo, o al menos alrededor de 40 g de metionina/l de volumen de cultivo si la cepa se incuba en experimentos de fermentación usando un fermentador agitado y alimentado con una fuente de carbono. Un valor más preferido asciende hasta al menos alrededor de 50 g de metionina/l de volumen de cultivo, e incluso más preferiblemente hasta al menos alrededor de 60 g de metionina/l de masa celular si la cepa se incuba en experimentos de fermentación usando un fermentador agitado y alimentado con fuente de carbono.

En una realización preferida, los métodos y microorganismos de la invención permiten incrementar la eficiencia de la síntesis de metionina y/o la cantidad de metionina y/o el título y/o la velocidad de la síntesis de metionina en comparación con el organismo de partida en al menos alrededor de 2%, al menos alrededor de 5%, al menos alrededor de 10%, o al menos alrededor de 20%. En realizaciones preferidas, la eficiencia de la síntesis de metionina y/o la cantidad de metionina y/o el título y/o la velocidad se incrementan en comparación con el organismo de partida en al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 40%, o al menos alrededor de 50%. Incluso más preferido es un incremento de al menos alrededor de un factor de 2, al menos alrededor de un factor de 3, al menos alrededor de un factor de 5, y al menos alrededor de un factor de 10.

El término "metabolito" se refiere a compuestos químicos que se usan en las rutas metabólicas de organismos como precursores, intermedios y/o productos finales. Tales metabolitos pueden servir no sólo como unidades de construcción químicas, sino también pueden ejercer una actividad reguladora sobre enzimas y su actividad catalítica. Se sabe de la bibliografía que tales metabolitos pueden inhibir o estimular la actividad de las enzimas (Stryer, Biochemistry (2002) W.H. Freeman & Co., Nueva York, Nueva York).

La expresión "condiciones estándar" se refiere al cultivo de un microorganismo en un medio estándar que no está enriquecido con respecto a un compuesto particular. La temperatura, el pH y el tiempo de incubación pueden variar, como se describirá con más detalle más abajo.

Las condiciones de cultivo estándar para microorganismos se pueden tomar de la bibliografía, incluyendo libros de texto tales como "Sambrook y Russell, Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición (2001).

"Medios mínimos" son medios que contienen solamente las necesidades para el crecimiento de células de tipo salvaje o mutantes, es decir, sales inorgánicas, una fuente de carbono, y agua. En el caso de células mutantes, un medio mínimo puede contener uno o más aditivos de compuestos químicos sustancialmente puros, para permitir el

crecimiento de células mutantes que son deficientes en la producción de tal sustancia o sustancias químicas.

Por el contrario, “medios enriquecidos” se diseñan para satisfacer todos los requisitos de crecimiento de un organismo específico, es decir, además de los contenidos de los medios mínimos, contienen, por ejemplo, aminoácidos, factores de crecimiento, cofactores enzimáticos, etc.

5 La expresión “incrementar la cantidad” de al menos una proteína en comparación con un organismo de partida, en el contexto de la presente invención, significa que un microorganismo de partida se modifica genéticamente para expresar una mayor cantidad de por ejemplo una de las enzimas mencionadas anteriormente. Se ha de entender que incrementar la cantidad de, por ejemplo, una enzima se refiere a una situación en la que se incrementa la cantidad de enzima funcional. En el contexto de la presente invención, una enzima se considera funcional si es capaz de catalizar la reacción respectiva.

10 Hay diversas opciones para incrementar la cantidad de una proteína en microorganismos tales como bacterias corineformes, que son bien conocidas por la persona experta en la técnica. Estas opciones incluyen incrementar el número de copias de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína respectiva, incrementar la transcripción y/o traducción de tales secuencias de ácidos nucleicos, o sus combinaciones. Estas diversas opciones se discutirán con más detalle más abajo.

15 La expresión “incrementar la actividad” de al menos una proteína se refiere a la situación de que se introduce al menos una mutación en las secuencias de tipo salvaje respectivas de la proteína que conduce a la producción de más metionina en comparación con una situación en la que se expresa la misma cantidad de proteína de tipo salvaje. Esto se puede lograr, por ejemplo, usando enzimas que poseen mutaciones específicas que permiten una mayor actividad de la enzima. Tales mutaciones pueden, por ejemplo, inactivar las regiones de las enzimas que son responsables de la inhibición por retroalimentación. Al mutar estas posiciones, por ejemplo introduciendo mutaciones de punto no conservativas, la enzima ya no proporciona regulación por retroalimentación, y de este modo la actividad de la enzima no se puede disminuir si, por ejemplo, se producen más moléculas de producto. Además, la actividad de una enzima se puede incrementar introduciendo mutaciones que incrementan el metabolismo catalítico de una enzima. Tales mutaciones se pueden introducir en la copia endógena del gen que codifica la enzima respectiva, o se pueden proporcionar sobreexpresando un mutante correspondiente a partir de las secuencias de ácidos nucleicos exógenas que codifican tal enzima. Tales mutaciones pueden comprender mutaciones de punto, supresiones o inserciones. Las mutaciones de punto pueden ser conservativas (sustitución de un aminoácido por un aminoácido de propiedades bioquímicas y fisicoquímicas comparables) o no conservativas (sustitución de un aminoácido por otro que no es comparable en términos de propiedades bioquímicas y fisicoquímicas). Además, las supresiones pueden comprender sólo dos o tres aminoácidos hasta dominios completos de la proteína respectiva. Para dar un ejemplo, en el caso de transcetolasa de *C. glutamicum* ATCC13032 (número de acceso Genbank Cgl1574), una mutación de alanina en una posición que corresponde a A293 por R, y/o alanina en una posición que corresponde a A327 por T, el intercambio conduce a una enzima con actividad enzimática mejorada. La persona experta en la técnica será capaz de desarrollar mutaciones adicionales o alternativas basándose en la información proporcionada aquí.

20 De este modo, la expresión “incrementar la actividad” de al menos una enzima se refiere a la situación en la que se introducen mutaciones en la secuencia de tipo salvaje respectiva para reducir mecanismos reguladores negativos tales como inhibición por retroalimentación, y/o para incrementar el metabolismo catalítico de la enzima.

40 Un incremento de la cantidad y/o actividad de una proteína tal como una enzima se puede lograr mediante diferentes rutas, por ejemplo cambiando mecanismos reguladores inhibidores a nivel transcripcional, traduccional o proteico, y/o incrementando la expresión génica de un ácido nucleico que codifica esta proteína en comparación con el organismo de partida, por ejemplo induciendo el gen endógeno o introduciendo secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína.

45 Por supuesto, los enfoques para incrementar la cantidad y/o actividad de una proteína tal como una enzima se pueden combinar. De este modo, es posible, por ejemplo, sustituir la copia endógena de una enzima de bacteria corineforme por un mutante que codifica su versión insensible a la retroalimentación. Si la transcripción de esta copia mutada se pone bajo el control del promotor fuerte, se incrementan la cantidad y la actividad de la enzima respectiva. Se entiende que, en este caso, la enzima todavía debe ser capaz de catalizar la reacción en la que participa habitualmente.

50 Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína tal como una enzima pueden ser de origen endógeno o exógeno. De este modo, por ejemplo se puede incrementar la cantidad de una proteína tal como una enzima incrementando la expresión de secuencias de ácidos nucleicos que aparecen de forma natural en el microorganismo de partida respectivo, por ejemplo, mediante integración cromosómica de secuencias de ácidos nucleicos adicionales, o usando un promotor fuerte delante del gen endógeno. Como alternativa o adicionalmente, también se puede incrementar la cantidad de una proteína tal como una enzima expresando la secuencia de ácido nucleico que codifica un homólogo de esta enzima a partir de otro organismo. Los ejemplos de este último escenario se ofrecerán más abajo.

- De este modo, por ejemplo se puede incrementar la cantidad de *lpd* en *C. glutamicum* al sobreexpresar la secuencia de *C. glutamicum* respectiva, ya sea a partir de un vector autónomamente replicante o a partir de una copia cromosómica insertada adicionalmente (véase más abajo), o se pueden usar las enzimas correspondientes de, por ejemplo, *Bacillus subtilis* o *E. coli* y sobreexpresar la enzima, por ejemplo, mediante el uso de un vector autónomamente replicable.
- En algunas circunstancias, puede ser preferible usar las enzimas endógenas, ya que la secuencia codificante endógena de, por ejemplo, *C. glutamicum* ya están optimizadas con respecto a su uso de codones para la expresión en *C. glutamicum*.
- Si, en el contexto de la siguiente descripción, se establece que la cantidad y/o actividad de una proteína tal como una enzima específica se debería disminuir en comparación con el organismo de partida, las definiciones anteriores se aplican cambiando lo que haya que cambiar.
- La reducción de la cantidad y/o actividad de una proteína tal como una enzima se puede lograr suprimiendo parcial o completamente las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína respectiva, inhibiendo la transcripción al introducir, por ejemplo, promotores débiles, inhibiendo la traducción al modificar el uso de codones en consecuencia, al introducir mutaciones en las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas respectivas, que hacen no funcionales a las proteínas, y/o sus combinaciones.
- En el contexto de la siguiente descripción, se hará uso de la expresión “homólogo funcional”. La expresión “homólogo funcional”, para los fines de la presente invención, se refiere al hecho de que una cierta actividad enzimática puede ser proporcionada no sólo por una proteína específica de secuencia de aminoácidos definida, sino también por proteínas de secuencia similar de otros organismos (no) relacionados.
- Por ejemplo, la actividad de formiato-THF-sintetasa se puede establecer en *C. glutamicum* expresando secuencias de ácido nucleico que codifican la formiato-THF-sintetasa de *C. jeikeium* (SEC ID NO.1: secuencia de ácido nucleico, SEC ID NO. 2: secuencia de aminoácidos, número de acceso gene bank (NP\_939608)), o mediante sus homólogos funcionales.
- Los homólogos de una proteína de otros organismos se pueden identificar por la persona experta mediante análisis de homología. Esto se puede realizar determinando la similitud, es decir, porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos para homólogos putativos y las secuencias para los genes o proteínas codificados por ellos (*por ejemplo*, secuencias de ácido nucleico para formiato-THF-sintetasa, *gcvH*, *gcvP*, *gcvT*, *lpd*, *lplA*, *lipA*, *lipA*).
- El porcentaje de identidad se puede determinar, por ejemplo, mediante inspección visual o usando homología a base de algoritmos.
- Por ejemplo, a fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, el algoritmo alineará las secuencias con fines de comparación óptima (*por ejemplo*, se pueden introducir saltos en la secuencia de aminoácidos de una proteína para el alineamiento óptimo con la secuencia de aminoácidos de otra proteína). Entonces se comparan los restos de aminoácidos en las posiciones de los aminoácidos correspondientes. Cuando una posición en una secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido que la posición correspondiente en la otra, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (*es decir*, % de identidad = # de posiciones idénticas/# total de posiciones multiplicado por 100).
- Para estos fines, se conocen en la técnica diversos programas de ordenador. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos se puede determinar comparando la información de secuencia usando el programa de ordenador GAP descrito por Devereux et al. (1984) Nucl. Acids. Res., 12:387 y disponible de la University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). El porcentaje de identidad también se puede determinar alineando dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos usando el programa de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™) (como se describe por Tatusova et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett., 174:247).
- En la fecha de presentación de esta solicitud de patente, un paquete de software estándar que proporciona el programa BLAST se puede encontrar en el sitio web de BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Por ejemplo, si se usa cualquiera de las SEC IDs mencionadas anteriormente, se puede realizar una búsqueda BLAST a base de secuencias de ácidos nucleicos o a base de secuencias de aminoácidos e identificar homólogos estrechamente relacionados de las enzimas respectivas en, por ejemplo, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, etc. Por ejemplo, para alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos usando el programa BLAST™, los ajustes por defecto son los siguientes: el premio para el emparejamiento es 2, la penalización para el desemparejamiento es -2, las penalizaciones para salto abierto y salto de extensión son 5 y 2 respectivamente, la caída de los tiempos de salto es 50, la expectativa es 10, el tamaño de la palabra es 11, y el filtro está OFF.
- Las búsquedas y análisis de secuencias comparables se pueden realizar en la base de datos de EMBL (<http://www.embl.org>) o la página de Expasy (<http://www.expasy.org/>). Todas las búsquedas de secuencias

anteriores se realizan típicamente con los parámetros por defecto tal como están preinstalados por los proveedores de bases de datos en la fecha de presentación de la presente solicitud. Las búsquedas de homología también se pueden realizar de forma habitual usando programas de software tales como el software Lasergene de DNA Star, Inc., Madison, Winconsin, USA, que usa el método CLUSTAL (Higgins et al. (1989), *Comput. Appl. Biosci.*, 5(2) 151).

- 5 La persona experta entiende que dos proteínas probablemente realizarán la misma función (por ejemplo, proporcionan la misma actividad enzimática) si comparten un cierto grado de identidad como se describe anteriormente. Un límite inferior típico en el nivel de aminoácidos es típicamente al menos alrededor de 25% de identidad. A nivel de ácidos nucleicos, el límite inferior es típicamente al menos 50%.

- 10 Los grados de identidad preferidos para ambos tipos de secuencias son al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 60% o al menos alrededor de 70%. Los niveles de identidad más preferidos son al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 90%, o al menos alrededor de 95%. Se considera que estos niveles de identidad son significativos.

- 15 Como se usan aquí, los términos “homología” y “homólogo” no están limitados para designar proteínas que tienen un ancestro genético común teórico, sino que incluyen proteínas que pueden estar genéticamente no relacionadas que, no obstante, han evolucionado para realizar funciones similares y/o tener estructuras similares. El requisito de que los homólogos deben ser funcionales significa que los homólogos descritos aquí engloban proteínas que tienen sustancialmente la misma actividad que la proteína de referencia. Para que las proteínas tengan homología funcional, no se requiere necesariamente que tengan identidad significativa en sus secuencias de aminoácidos, sino, más bien, proteínas que tienen homología funcional se definen así por tener actividades similares o idénticas, por ejemplo actividades enzimáticas.

- 20 Preferiblemente, una enzima procedente de otro organismo distinto de por ejemplo la bacteria corineforme hospedante se considerará que es un homólogo funcional si muestra similitud al menos significativa, es decir, alrededor de 50% de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos, y cataliza la misma reacción que su contraparte en la bacteria corineforme. Los homólogos funcionales que proporcionan la misma actividad enzimática y comparten un grado mayor de identidad, tal como al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80%, o al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos, son homólogos funcionales preferidos adicionales.

- 25 La persona experta en la técnica sabe que también se pueden usar fragmentos o versiones mutadas de las enzimas mencionadas anteriormente procedentes de bacterias corineformes o de sus homólogos funcionales en otros organismos en tanto que estos fragmentos y versiones mutadas presenten el mismo tipo de actividad funcional. Los fragmentos típicos funcionalmente activos presentarán supresiones N-terminales y/o C-terminales, mientras que las versiones mutadas comprenden típicamente supresiones, inserciones o mutaciones de punto.

- 30 A título de ejemplo, se considerará que una secuencia de *E. coli* codifica un homólogo funcional de formiato-THF-sintetasa de *C. jeikeum* si presenta los niveles de identidad mencionados anteriormente a nivel de aminoácidos con respecto a SEC ID NO. 2, y presenta la misma actividad enzimática. Los ejemplos se pueden tomar de la Tabla 1. También se pueden usar fragmentos o, por ejemplo, mutantes de punto de estas secuencias, en tanto que las proteínas resultantes todavía catalicen el mismo tipo de reacción que las enzimas de longitud completa.

- 35 Más abajo se mostrarán ejemplos de incremento de la cantidad de una enzima para formiato-THF-sintetasa, *gcvTHP*, *lplA*, *lipA* y *lipB*. Para serina desaminasa se proporcionarán ejemplos para disminuir la cantidad de una enzima.

Incremento de la cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa en microorganismos

- 40 Se describen aquí microorganismos en los que un organismo de partida se manipula genéticamente de manera que la cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa se incrementa en el microorganismo resultante en comparación con el organismo de partida. También se describen métodos para producir metionina en microorganismos, que comprenden la etapa de cultivar el microorganismo mencionado anteriormente.

En microorganismos tales como *E. coli* y *C. jeikeum*, se conocen las secuencias para formiato-THF-sintetasa. En tales microorganismos, el incremento de la cantidad y/o de la actividad de formiato-THF-sintetasa requerirá elevar la cantidad y/o actividad de esta enzima por encima del nivel del organismo de partida respectivo, por ejemplo sobreescribiendo secuencias de ácido nucleico que codifican esta actividad enzimática.

- 45 50 En *C. glutamicum*, no se conoce una formiato-THF-sintetasa. Los siguientes pasajes describen cómo se puede establecer una actividad de formiato-THF-sintetasa en *C. glutamicum*. La persona experta en la técnica estará no obstante al tanto de cómo se puede incrementar la cantidad y/o actividad de una formiato-THF-sintetasa en otros microorganismos tales como *C. jeikeum* y *E. coli*.

- 55 Se describe aquí, *entre otros*, un microorganismo de *C. glutamicum* en el que se incrementan la cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa, y el uso de tal microorganismo para producir metionina. Esto se puede lograr, por ejemplo, incrementando el número de copias de secuencias de ácido nucleico que codifican una formiato-THF-

sintetasa, incrementando la transcripción y/o traducción de secuencias que codifican una formiato-THF-sintetasa, o una combinación de los mismos.

Se puede usar una formiato-THF-sintetasa de *C. jeikeum*. La secuencia de ácido nucleico de esta formiato-THF-sintetasa se representa en SEC ID NO. 1, mientras que la secuencia de aminoácido se representa en SEC ID NO. 2. El número de acceso gene bank es YP\_250663.1. Esta secuencia deriva de la cepa *C. jeikeium* NCTC K11915, que también se denomina como K411. Una formiato-THF-sintetasa también se puede obtener a partir de la cepa DSMZ 7171. En este caso, la secuencia de ácido nucleico se representa mediante SEC ID No: 51, y la secuencia de aminoácidos se representa mediante SEC ID No. 52.

Por supuesto, también se pueden usar fragmentos funcionales de una formiato-THF-sintetasa como se representa mediante SEC ID Nos. 1 y 2, o sus homólogos funcionales. En la Tabla 1 se representan algunos de los homólogos que se pueden identificar usando búsquedas de homología estándar.

El número de copias de las secuencias de ácido nucleico que codifican formiato-THF-sintetasa se puede incrementar en un microorganismo, y preferiblemente en *C. glutamicum*, por ejemplo expresando la secuencia de plásmidos que se replican autónomamente, o integrando copias adicionales de las secuencias de ácido nucleico respectivas en el genoma del microorganismo, y preferiblemente de *C. glutamicum*.

En el caso de vectores replicables autónomamente, éstos se pueden mantener de forma estable en, por ejemplo, una bacteria corineforme. Los vectores típicos para expresar polipéptidos y enzimas tales como formiato-THF-sintetasa en *C. glutamicum* incluyen pCliK, pB y pEKO como se describe en Bott, M. y Eggeling, L., eds. Handbook of Corynebacterium glutamicum. CRC Press LLC, Boca Raton, FL; Deb, J.K. et al. (FEMS Microbiol. Lett. (1999), 175(1), 11-20), Kirchner O. et al. (J. Biotechnol. (2003), 104 (1-3), 287-299), documento WO2006069711 y en el documento WO2007012078.

En otro enfoque para incrementar el número de copias de secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido en una bacteria corineforme, se pueden integrar copias adicionales de secuencias de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos en el cromosoma de *C. glutamicum*. La integración cromosómica puede tener lugar, por ejemplo, en el locus en el que está localizada la copia endógena del polipéptido respectivo. Adicionalmente y/o como alternativa, la multiplicación cromosómica de secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos puede tener lugar en otros loci en el genoma de una bacteria corineforme.

En caso de *C. glutamicum*, hay diversos métodos conocidos por la persona experta en la técnica para incrementar el número de copias génicas mediante integración cromosómica. Uno de tales métodos hace uso, por ejemplo, del vector pK19 sacB, y se ha descrito con detalle en la publicación de Schäfer A, et al. J Bacteriol. 1994 176(23): 7309-7319. Otros vectores para la integración cromosómica de secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos incluyen pCLIK int sacB, como se describe en los documentos WO2005059093 y WO2007011845.

Otro enfoque preferido para incrementar la cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa en microorganismos, y particularmente en *C. glutamicum*, es incrementar la transcripción de las secuencias codificantes mediante el uso de un promotor fuerte.

Si la actividad de una formiato-THF-sintetasa endógena se incrementa mediante el uso de un promotor fuerte, entonces la expresión "promotor fuerte" significa que la transcripción a partir del promotor recientemente introducido es más fuerte que la del promotor endógeno de origen natural.

Sin embargo, en un caso en el que formiato-THF-sintetasa se expresa en *C. glutamicum* que no conoce este tipo de enzima, se puede usar un promotor que se sabe que proporciona una expresión fuerte de genes endógenos de *C. glutamicum*.

Los promotores preferidos en este contexto son los promotores P<sub>SOD</sub> (SEC ID No. 3), P<sub>groES</sub> (SEC ID No 4), P<sub>EFTu</sub> (SEC ID No 5), promotor mágico SP01 P<sub>15</sub> (SEC ID No 42), y λP<sub>R</sub> (SEC ID No 6), algunas veces también denominado como lambdaP<sub>R</sub>. En *C. glutamicum* el promotor λP<sub>R</sub> puede ser más fuerte que el promotor P<sub>SOD</sub>. El promotor P<sub>SOD</sub> puede ser más fuerte que el promotor P<sub>groES</sub>, y el promotor P<sub>groES</sub> puede ser más débil que el promotor P<sub>EFTu</sub> o el promotor P<sub>15</sub>. El promotor P<sub>EFTu</sub> puede ser más fuerte que el promotor P<sub>SOD</sub>. Sin embargo, la fuerza de un promotor en cualquier organismo no es necesariamente una propiedad inherente del promotor, puesto que la fuerza del promotor puede variar ampliamente dependiendo del contexto en el que se coloca el promotor mediante la ingeniería genética.

El incremento de la cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa en microorganismos, y particularmente en *C. glutamicum*, permitirá que los microorganismos crezcan en medios que comprenden formiato como la fuente de carbono. Además, el uso de formiato que también aparece como un metabolito durante diversas rutas biosintéticas permitirá igualmente incrementar la producción de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF. Un mayor nivel de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF conducirá a una mayor producción de metil-THF y producción de metionina.

También se describe aquí un método que comprende cultivar los microorganismos descritos anteriormente y aislar opcionalmente metionina.

- En elaboraciones adicionales de la descripción descrita anteriormente, en la que la cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa se incrementan en un microorganismo, y preferiblemente en *C. glutamicum*, la cantidad de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF se puede incrementar además disminuyendo la cantidad y/o actividad de formil-THF-desformilasa. En SEC ID NO. 7 se representa una secuencia de ácido nucleico para formil-THF-desformilasa, y en SEC ID NO. 8 se representa la secuencia de aminoácidos. La Tabla 1 proporciona números de acceso de gene bank para esta actividad enzimática.
- Como alternativa o adicionalmente, la cantidad y/o actividad de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-THF-ciclosintetasa, N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-THF-reductasa y/o N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF-reductasa se incrementan en comparación con el organismo de partida. En una realización preferida, se incrementa la cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa, se disminuye la cantidad y/o actividad de formil-THF-desformilasa, y se incrementa la cantidad y/o actividad de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-THF-ciclosintetasa, N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-THF-reductasa y/o N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-reductasa, en comparación con el organismo de partida. Puesto que todas estas actividades enzimáticas mencionadas anteriormente están presentes en microorganismos, y también en *C. glutamicum* (con la excepción de formiato-THF-sintetasa), se puede preferir usar las secuencias de ácido nucleico endógenas para incrementar y/o disminuir la cantidad y/o actividad de las actividades enzimáticas respectivas en los microorganismos, y preferiblemente en *C. glutamicum*.
- Más abajo se describirán con detalle enfoques para incrementar la cantidad y/o actividad para una proteína. Por supuesto, estos enfoques también se pueden aplicar a formiato-THF-sintetasa. Más abajo se describirán enfoques para disminuir la cantidad y/o actividad de una proteína en un microorganismo. Por supuesto, estos enfoques también se pueden aplicar a la disminución de formil-THF-desformilasa.
- Por supuesto, también se pueden usar homólogos funcionales de formiato-THF-sintetasa de *C. jeikeium* o de las otras enzimas mencionadas anteriormente. Estos homólogos funcionales presentarán los grados de identidad mencionados anteriormente con respecto a SEC ID NO. 1 o SEC ID NO. 2, y proporcionan el mismo tipo de actividad enzimática. En la Tabla 1 se proporcionan los números de acceso de formiato-THF-sintetasa para organismos distintos de *C. jeikeium*.
- Un aspecto preferido se refiere a microorganismos de *C. glutamicum* que expresan formiato-THF-sintetasa, y al uso de estos organismos de *C. glutamicum* en la producción de metionina. Estas cepas pueden mostrar adicionalmente las alteraciones genéticas mencionadas anteriormente discutidas para formil-THF-desformilasa, N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-THF-ciclosintetasa, N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-THF-reductasa y/o N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF-reductasa.
- Una cepa de *C. glutamicum* típica que se puede usar como organismo de partida será una cepa de tipo salvaje tal como ATCC13032. Sin embargo, se puede preferir usar un organismo de partida que ya se ha modificado genéticamente para asegurar una mayor producción de metionina. Tal organismo puede presentar las características de DSM17323, y de este modo presenta una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>* y *metH*. Una cepa de partida preferida también puede tener las características de M2014, y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, y *hsk<sup>mutado</sup>*. Otros organismos de partida preferidos pueden tener las características de OM469, y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, *hsk<sup>mutado</sup>* y *metF* y presentar una menor cantidad y/o actividad de *mcbR* y *metQ*. Aún otros organismos de partida preferidos pueden tener las características de GK1259, y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, *hsk<sup>mutado</sup>*, *tkt* (y opcionalmente *g6pdh*, *zwfa* y *6pgl*) y *metF*, y presentar una menor cantidad y/o actividad de *mcbR*, *metQ* y *sda*, o de M2616 y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, *hsk<sup>mutado</sup>*, *tkt* (y opcionalmente *g6pdh*, *zwfa* y *6pgl*) y *metF*, y presentar una menor cantidad y/o actividad de *mcbR*, *metQ* y *serA*.
- Se encontró además que la producción de metionina se puede estimular adicionalmente si se cultivan los microorganismos descritos anteriormente, que presentan una mayor cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa, en un medio que contiene mayores cantidades de formiato.
- Este aspecto, en el que el formiato se añade deliberadamente al medio de cultivo, se realiza particularmente de forma preferible con cepas de *C. glutamicum* que se han modificado genéticamente para presentar las características anteriores de formiato-THF-sintetasa y las otras alteraciones genéticas. Nuevamente, se preferirá incrementar la actividad de formiato-THF-sintetasa expresando las secuencias correspondientes de *C. jeikeium* en *C. glutamicum* o sus homólogos funcionales y fragmentos.
- Microorganismos con mayor cantidad y/o actividad del sistema de escisión de glicina
- En un aspecto, la presente invención se refiere a microorganismos, y preferiblemente *C. glutamicum*, que presentan una mayor actividad enzimática del sistema de escisión de glicina. La presente invención también se refiere a métodos que hacen uso de estos microorganismos para la producción de metionina cultivando dichos microorganismos y aislando opcionalmente metionina.
- En algunas aplicaciones industriales, microorganismos tales como *E. coli* o *C. glutamicum* producen glicina como subproducto. La presente invención hace uso de este subproducto al proporcionar microorganismos que presentan una mayor actividad del sistema de escisión de glicina.

El sistema de escisión de glicina de microorganismos comprende típicamente 4 a 5 subunidades.

La primera subunidad es una glicina descarboxilasa dependiente de PLP (GcvP, también denominada simplemente proteína P). La segunda subunidad es una amino metil transferasa que contiene lipoamida (GcvH, también denominada proteína H). La tercera subunidad es una enzima que sintetiza N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF (GcvT). Estos tres factores se denominan también algunas veces como gcvPHT. La cuarta subunidad es una lipoamida deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>, que requiere FAD (*lpd*, también denominada simplemente proteína L). Los genes correspondientes son nombres *gcvP*, *gcvT*, *gcvH* y *lpd*, respectivamente. Los ejemplos de este tipo de GCS se encuentran en *E. coli* y *C. jeikeium*. La subunidad *lpd* también es compartida típicamente por al menos otras dos enzimas de multisubunidades, a saber, piruvato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa.

5 Si se incrementa la actividad enzimática del sistema GCS, la glicina en exceso de aquella requerida para la masa celular se metabolizará preferiblemente en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, CO<sub>2</sub> y N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF, que entonces se puede usar, por ejemplo, para una mayor síntesis de metionina. Sin embargo, algunos microorganismos, tales como por ejemplo *C. glutamicum*, carecen de un sistema GCS nativo. No obstante, tales organismos tendrán habitualmente un gen *lpd* que codifica la subunidad para uso en los dos sistemas enzimáticos mencionados anteriormente.

15 Como se mostrará más abajo, la proteína Lpd nativa en *C. glutamicum* es capaz de funcionar junto con un GCS no nativo, de manera que sólo es necesario instalar y expresar los genes *gcvP*, *gcvT* y *gcvH* para obtener una función de GCS activa en *C. glutamicum*. Sin embargo, también se puede preferir sobreexpresar un gen *lpd* no nativo, puesto que este gen puede ser más capaz de interactuar específica y eficientemente con los factores *gcvP*, *gcvT* y *gcvH*.

20 Además, se debería observar que, en algunos organismos, el sistema de escisión de glicina comprende cinco subunidades. Por ejemplo, en *Bacillus subtilis*, la subunidad P se divide por ejemplo en dos polipéptidos, denominados algunas veces P1 y P2, que son codificados por dos genes, algunas veces denominados *gcvP1* y *gcvP2*.

25 La presente invención, como se menciona anteriormente, se refiere, en una realización preferida, a microorganismos que se han modificado genéticamente para presentar una mayor actividad del sistema de escisión de glicina. Tal actividad incrementada del sistema de escisión de glicina se puede lograr incrementando la cantidad y/o actividad de las actividades enzimáticas codificadas por *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*. Se abordará más abajo cómo se puede establecer un aumento de la actividad del sistema de escisión de glicina en *C. glutamicum*, puesto que esto representa una realización preferida de la presente invención.

30 Un aspecto de la presente invención se refiere a bacterias corineformes, y particularmente *C. glutamicum*, en las que la cantidad y/o actividad de las actividades enzimáticas codificadas por *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* (colectivamente denominados *gcvPHT*) se incrementan mediante alteración genética en comparación con el organismo de partida.

35 Esto se puede lograr incrementando la cantidad y/o actividad de las enzimas respectivas de *C. jeikeium*. La secuencia de ácido nucleico de *gcvP* se representa en SEC ID NO. 9, la secuencia de aminoácidos se representa en SEC ID NO. 10. El número de acceso de Genbank es CAI36361.1.

La secuencia de ácido nucleico de *gcvH* de *C. jeikeium* se representa en SEC ID NO. 11. La secuencia de aminoácidos se representa en SEC ID NO. 12. El número de acceso de Genbank es CAI36363.1.

La secuencia de ácido nucleico de *gcvT* de *C. jeikeium* se representa en SEC ID NO. 13. La secuencia de aminoácidos se representa en SEC ID NO. 14. El número de acceso de Genbank es CAI36362.1.

40 Para los fines de la presente invención, se puede preferir usar las secuencias anteriores que derivan de *C. jeikeium*.

La actividad de un sistema de escisión de glicina en un microorganismo, y particularmente en *C. glutamicum*, se puede incrementar expresando, y preferiblemente sobreexpresando, las secuencias mencionadas anteriormente, ya sea solas o en combinación, siendo esto último una realización particularmente preferida de la presente invención.

45 De este modo, la presente invención se refiere particularmente a microorganismos de *C. glutamicum* en los que las actividades enzimáticas de *gcvPHT* están incrementadas concomitantemente. Esto se puede lograr sobreexpresando las secuencias de *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* como se representan mediante SEC ID NOS. 9-14, sus fragmentos funcionales, o sus homólogos funcionales. Los homólogos funcionales de las secuencias mencionadas anteriormente de *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* se pueden identificar fácilmente a través de búsquedas de homología de secuencias en las bases de datos relevantes, y producirán secuencias para otros organismos tales como *E. coli*. Los números de acceso para estas enzimas de otros organismos se proporcionan en la Tabla 1. Se prefiere el uso de secuencias de *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* de *C. jeikeium*, particularmente en *C. glutamicum*, ya que estos genes están agrupados en un operón (Tauch et al. (2005) J. Bacteriol., 187, 4671-4682). Además, los genes *lpd* de *C. jeikeium* y *C. glutamicum* muestran un grado elevado de identidad de secuencia (véase la Fig. 1). Es razonable suponer que los factores *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* interactúan suave y eficientemente con el *lpd* de *C. glutamicum*. La cantidad y/o actividad de *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* se puede incrementar en microorganismos, y preferiblemente en *C. glutamicum*, mediante los métodos mencionados anteriormente en el contexto de formiato-THF-sintetasa. De este modo, se puede construir, por ejemplo, una unidad funcional que comprenda las secuencias codificantes de *gcvP*, *gcvH* y

*gcvT*, e incrementar el número de copias de la secuencia de ácido nucleico que comprende esta unidad usando, por ejemplo, plásmidos que se replican autónomamente o plásmidos que se integran en el genoma del microorganismo, y preferiblemente en el genoma de *C. glutamicum*.

5 Como alternativa o adicionalmente, se puede instalar un promotor delante de este operón que asegura una fuerte transcripción de las secuencias codificantes para *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*. Tal promotor se puede seleccionar preferiblemente del grupo del promotor P<sub>EFTu</sub>, P<sub>groES</sub>, P<sub>SOD</sub>, P<sub>15</sub> y λ<sub>PR</sub>.

10 En principio, no es necesario incrementar la cantidad y/o actividad del factor *lpd*. Este factor estará presente típicamente en cantidades suficientemente abundantes por el microorganismo hospedante, que se manipula genéticamente a fin de incrementar la cantidad y/o actividad de *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*. No obstante, en algunas realizaciones de la invención, se puede preferir incrementar también la cantidad y/o actividad de *lpd*. Para este fin, las secuencias endógenas de *lpd* se pueden sobreexpresar por cualquiera de los métodos descritos anteriormente que se ofrecen en un poco más de detalle más abajo. Dependiendo de la similitud del *lpd* del organismo de partida y del *lpd* a partir del que se toman los factores *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*, se puede preferir incrementar la cantidad y/o actividad de *lpd* incrementando la expresión de *lpd* endógeno o exógeno. En este caso, se seleccionará preferiblemente el *lpd* de aquel organismo a partir del que se toman los otros factores del sistema de escisión de glicina.

20 De este modo, una realización de la presente invención se refiere a microorganismos que derivan del organismo de partida de manera que el microorganismo resultante presenta una mayor cantidad y/o actividad de los factores *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*. La invención también se refiere a métodos que usan estos microorganismos para la producción de metionina cultivando los microorganismos y aislando opcionalmente la metionina.

Una realización preferida se refiere a microorganismos de *C. glutamicum* que expresan los factores *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* de *C. jeikeium* como se representa en SEC ID NOS. 9-14, o sus homólogos funcionales y fragmentos funcionales. La presente invención también se refiere preferiblemente al uso de estos organismos de *C. glutamicum* en la producción de metionina.

25 Una cepa de *C. glutamicum* típica que se puede usar como organismo de partida será una cepa de tipo salvaje tal como ATCC13032. Sin embargo, se puede preferir usar un organismo de partida que ya se ha modificado genéticamente para asegurar la producción incrementada de metionina. Tal organismo puede presentar las características de DSM17323, y de este modo presenta una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>* y *metH*. Una cepa de partida preferida también puede tener las características de M2014, y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, y *hsk<sup>mutado</sup>*. Otros organismos de partida preferidos pueden tener las características de OM469, y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, *hsk<sup>mutado</sup>* y *metF* y presentar una menor cantidad y/o actividad de *mcbR* y *metQ*.

35 Se ha encontrado además que la producción de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF y de metionina se puede incrementar en microorganismos que presentan una mayor actividad del sistema de escisión de glicina como se describe anteriormente, si los microorganismos se (i) proporcionan con ácido lipoico y/o lipoamida externos, y/o (ii) modifican genéticamente además para producir más ácido lipoico y/o lipoamida que el organismo de partida.

40 También se describen aquí métodos que hacen uso de los microorganismos descritos anteriormente que presentan una mayor cantidad y/o actividad de los factores *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* del sistema de escisión de glicina (y opcionalmente del factor *lpd*), y que se cultivan en un medio que contiene mayores cantidades de ácido lipoico y/o lipoamida. Para los fines de este aspecto, el ácido lipoico y/o la lipoamida se pueden añadir al medio hasta una concentración final de al menos alrededor de 0,1 mg/l, al menos alrededor de 1 mg/ml, y preferiblemente al menos alrededor de 10 mg/l.

45 Se sabe en la técnica que la lipoamida, algunas veces denominada amida del ácido lipoico, puede sustituir al ácido lipoico para la lipoilación de enzimas en algunos organismos (Reed, L.J. et al. (1958) J. Biol. Chem. 232, 143-158). Como tal, la alimentación de lipoamida puede sustituir a la alimentación de ácido lipoico en la invención descrita aquí. En otras palabras, la lipoamida, que está comercialmente disponible del mismo proveedor que el ácido lipoico en sus diversas formas (por ejemplo, números T 5875, T 5625, T 1395, T 8260 del catálogo de Sigma-Aldrich), también se puede usar para estimular o incrementar la actividad de escisión de glicina en organismos y métodos de la invención descritos aquí. Se pueden usar tanto las formas oxidadas como las formas reducidas de estos dos compuestos, así como diversas sales y ésteres de cualesquiera de estas formas. De este modo, la fuente del grupo lipoilo puede variar.

55 Este aspecto, en el que el ácido lipoico y/o la lipoamida se añaden intencionadamente al medio de cultivo, se realiza particularmente de forma preferible con cepas de *C. glutamicum* que se han modificado genéticamente para presentar las actividades de los factores *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* de un sistema de escisión de glicina. Nuevamente, se preferirá incrementar la actividad del sistema de escisión de glicina al expresar las secuencias correspondientes de *C. jeikeium* en *C. glutamicum* o sus homólogos y fragmentos funcionales. En una elaboración adicional de este aspecto de la invención, la cantidad y/o actividad del factor *lpd* se pueden incrementar usando las secuencias endógenas de *C. glutamicum* o las secuencias exógenas (véase la Tabla 1).

También en el caso de *C. glutamicum*, la concentración final de ácido lipoico y/o lipoamida en el medio será al menos alrededor de 0,1 mg/l, al menos alrededor de 1 mg/l, y preferiblemente al menos alrededor de 10 mg/l.

5 Los microorganismos según la presente invención que presentan mayor actividad en el sistema de escisión de glicina que resulta de una mayor cantidad y/o actividad de los factores *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* se modifican genéticamente además para presentar una mayor cantidad de ácido lipoico y/o lipoamida sintetizados internamente.

Hay dos rutas diferentes para hacer uso de ácido lipoico y ligarlo a proteínas diana. En *E. coli*, estas dos rutas se denominan la ruta dependiente de *lpIA* y la ruta dependiente de *lipB* (Morris et al. (1995) J. Bacteriol., 177, 1-10).

El gen *lpIA* codifica lipoil sintetasa (proteína LpIA). Esta enzima activa ácido lipoico con ATP y une subsiguientemente lipoil-AMP a *gcvH*.

10 La ruta dependiente de *lipB* comprende dos enzimas (Morris et al. (1995) J. Bacteriol., 177, 1-10). *LipA* codifica ácido lipoico sintasa (proteína LipA). El gen *lipB* codifica lipoil transferasa (proteína LipB). *LipA* convierte octanoil-ACP en lipoil-ACP. En una segunda etapa, *lipB* une el resto lipoilo al dominio lipoilo de *gcvH* y otras proteínas lipoiladas.

15 De este modo, un incremento en la cantidad y/o actividad de *lpIA* permite una mejor incorporación de ácido lipoico añadido externamente, mientras que un incremento en la cantidad, tipo y/o actividad de *lipA* y/o *lipB* incrementa la cantidad de ácido lipoico sintetizada internamente que se transfiere a *GcvH*.

En SEQ ID NO. 15 se representa una secuencia de ácido nucleico de *lpIA* de *E. coli*. En SEQ ID NO. 16 se representa la secuencia de aminoácidos. El número de acceso de gene bank es EG11796.

En SEQ ID NO. 17 se representa la secuencia codificante de *lipA* de *C. jeikeium*. En SEQ ID NO. 18 se representa la secuencia de aminoácidos. El número de acceso de gene bank es GeneID:3433570.

20 En SEQ ID NO. 19 se representa la secuencia de ácido nucleico para *lipB* de *C. jeikeium*. En SEQ ID NO. 20 se representa la secuencia de aminoácidos. El número de acceso de gene bank es GeneID:3433571.

Para los fines de la presente invención, se puede preferir usar las secuencias anteriores que derivaron de *C. jeikeium*.

25 Un microorganismo que presenta una mayor cantidad y/o actividad de los factores *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* del sistema de escisión de glicina se puede así optimizar adicionalmente con respecto a la síntesis de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF y de metionina al incrementar la cantidad y/o actividad de *lpIA*. Para este fin, se puede incrementar la expresión de *lpIA* haciendo uso de SEQ ID NOS. 15, o sus homólogos y fragmentos funcionales. Tal microorganismo mostrará una mejor incorporación de ácido lipoico y/o lipoamida añadidos externamente, y de este modo puede ser particularmente adecuado para aquellos métodos según la presente invención en los que los microorganismos se cultivan en el medio que se suplementa con ácido lipoico y/o lipoamida.

30 La presente invención se refiere a un microorganismo que, además del incremento en la cantidad y/o actividad de los factores *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* del sistema de escisión de glicina, presenta una mayor cantidad y/o actividad de *lipA*, *lipB* o *lpA* y *lpB*. Se prefiere particularmente un microorganismo que, además de una mayor cantidad y/o actividad de *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*, presente una mayor cantidad y/o actividad de *lpA* y *lipB*. Estos microorganismos pueden mostrar una mejor formación y acomodación de ácido lipoico y/o lipoamida sintetizados endógenamente, y de este modo contribuirán a la producción de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF y metionina.

35 Por supuesto, estos microorganismos también se pueden usar en los métodos según la presente invención que pertenecen al cultivo de organismos genéticamente modificados con mayor actividad de sistema de escisión de glicina en medio suplementado con ácido lipoico y/o lipoamida. En una elaboración adicional de este aspecto, se pueden producir y usar microorganismos que, además de una mayor cantidad y/o actividad de *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*, muestran una mayor cantidad y/o actividad de *lpIA*, *lpA* y *lipB*.

40 Un aspecto particularmente se refiere de nuevo a microorganismos de *C. glutamicum* que por medio de modificación genética de un organismo de *C. glutamicum* de partida presentan una mayor cantidad y/o actividad de los factores *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* del sistema de escisión de glicina, que presentan una acomodación mejorada del ácido lipoico y/o lipoamida proporcionados externamente, y/o una formación y acomodación mejoradas de ácido lipoico y/o lipoamida producidos internamente, al ser modificados genéticamente a fin de presentar una mayor cantidad y/o actividad de *lpIA*, *lpA* y/o *lipB*. De este modo, aspectos preferidos se refieren a microorganismos de *C. glutamicum* en los que la cantidad y/o actividad de *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* y *lpIA* están incrementadas en comparación con el organismo de partida. En una realización, el microorganismo de *C. glutamicum* presenta una mayor cantidad y/o actividad de *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* y *lpA* o *lipB*. Incluso es más preferido un microorganismo de *C. glutamicum* que presenta una mayor cantidad y/o actividad de *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*, *lpA* y *lipB*. Se prefiere particularmente un microorganismo de *C. glutamicum* que presenta una mayor cantidad y/o actividad de *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*, *lpA*, *lpA* y *lipB*.

Se entiende por la persona experta que el organismo de partida de *C. glutamicum* que se usa para introducir la

- modificación genética mencionada anteriormente puede ser una cepa de tipo salvaje tal como ATCC13032. Sin embargo, se puede preferir usar un organismo de partida que ya se ha modificado genéticamente para asegurar una mayor producción de metionina. Tal organismo puede presentar las características de DSM17323, y de este modo presenta una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>* y *metH*. Una cepa de partida preferida también puede tener las características de M2014, y presenta una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, y *hsk<sup>mutado</sup>*. Otros organismos de partida preferidos pueden tener las características de OM469, y presentan una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, *hsk<sup>mutado</sup>* y *metF* y presentan una reducción de la cantidad y/o actividad de *mcbR* y *metQ*.
- La persona experta en la técnica está además claramente al tanto de que, en todas las realizaciones mencionadas anteriormente que se refieren a un incremento en el sistema de escisión de glicina y la captación, formación y acomodación mejoradas de ácido lipoico y/o lipoamida, el microorganismo de partida, que preferiblemente es una de las cepas de *C. glutamicum* mencionadas anteriormente, presenta modificaciones genéticas adicionales con respecto a enzimas que están implicadas en la ruta biosintética de serina como se describe anteriormente.
- De este modo, una cepa de partida preferida puede tener las características de OM264C y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, y *hsk<sup>mutado</sup>* y presentar una menor cantidad y/o actividad de *serA*. Otra cepa de partida preferida puede tener las características de GK1259, y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, *hsk<sup>mutado</sup>*, *metF*, *tkl*, *tal*, *zwf* y *6pgl*, y presentar una menor cantidad y/o actividad de *mcbR*, *metQ* y *sda*.
- Microorganismos con una mayor cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa y del sistema de escisión de glicina
- Se describen aquí además microorganismos que combinan las propiedades de los organismos mencionados anteriormente, es decir, incremento de la cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa y una mayor actividad del sistema de escisión de glicina. Se entiende que los aspectos particularmente preferidos descritos anteriormente también se han de combinar.
- De este modo, un microorganismo se modificará genéticamente de manera que presentará una mayor cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa, *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*.
- En un aspecto preferido adicional, el microorganismo se modificará genéticamente además para presentar una mayor cantidad y/o actividad de *lipA*.
- Un aspecto preferido también se refiere a un microorganismo que presenta una mayor actividad de formiato-THF-sintetasa, *gcvP*, *gcvH* y *gcvT* y *lipA* o *lipB*. Incluso son más preferidos los microorganismos que presentan una mayor cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa, *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*, *lipA* y *lipB*.
- Otro aspecto preferido se refiere a un microorganismo que presenta una mayor cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa, *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*, *lipA*, *lipA* y *lipB*.
- Por supuesto, los microorganismos también pueden presentar una mayor cantidad y/o actividad de *lpd*.
- Se entiende que los aspectos mencionados anteriormente se alcanzan preferentemente en un microorganismo de *C. glutamicum*. Tal cepa de *C. glutamicum* puede ser una cepa de tipo salvaje tal como ATCC13032. Sin embargo, se puede preferir usar un organismo de partida que ya se ha modificado genéticamente para asegurar una mayor producción de metionina. Tal organismo puede presentar las características de DSM17323, y de este modo presenta una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>* y *metH*. Una cepa de partida preferida también puede tener las características de M2014, y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, y *hsk<sup>mutado</sup>*. Otros organismos de partida preferidos pueden tener las características de OM469, y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, *hsk<sup>mutado</sup>* y *metF*, y presentar una menor cantidad y/o actividad de *mcbR* y *metQ*, o de las características de M2616, y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, *hsk<sup>mutado</sup>*, *tkl* (y opcionalmente *g6pdh*, *zwf* y *6pgl*) y *metF*, y presentar una menor cantidad y/o actividad de *mcbR*, *metQ* y *serA*.
- La persona experta en la técnica está además claramente al tanto de que, en todos los aspectos mencionados anteriormente que se refieren a un incremento en el sistema de escisión de glicina y la captación, formación y acomodación mejoradas de ácido lipoico y/o lipoamida, el microorganismo de partida, que preferiblemente es una de las cepas de *C. glutamicum* mencionadas anteriormente, presenta modificaciones genéticas adicionales con respecto a enzimas que están implicadas en la ruta biosintética de serina como se describe anteriormente, y/o enzimas implicadas en la metabolización de formilo, tales como formil-THF-desformilasa, N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-THF-ciclosintetasa, N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-THF-reductasa y/o N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF-reductasa.
- De este modo, una cepa de partida preferida puede tener las características de OM264C y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, y *hsk<sup>mutado</sup>* y presentar una menor cantidad y/o actividad de *serA*. Otra cepa de partida preferida puede tener las características de GK1259, y presentar una mayor cantidad y/o actividad de *ask<sup>fbr</sup>*, *hom<sup>fbr</sup>*, *metH*, *metA*, *metY*, *hsk<sup>mutado</sup>*, *metF*, *tkl*, *tal*, *zwf* y *6pgl*, y presentar una menor cantidad

y/o actividad de *mcbR*, *metQ* y *sda*.

Para incrementar la cantidad y/o actividad de las enzimas mencionadas anteriormente, se puede depender de las secuencias de ácido nucleico endógenas que codifican estas enzimas, o se pueden usar secuencias exógenas, dependiendo de si el organismo de partida respectivo proporciona la actividad requerida.

- 5 En caso de un microorganismo de *C. glutamicum*, se preferirá usar las secuencias codificantes de *C. jeikeium* para incrementar la cantidad y/o actividad de formiato-THF-sintetasa, *gcvP*, *gcvH* y *gcvT*, *lplA*, *lipA*, *lipA* y/o *lpd*. Las secuencias para estas enzimas se representan en SEQ ID NOS. 1 y 2 y 9 a 20. La persona experta en la técnica está, por supuesto, al tanto de que también se pueden usar secuencias que codifican homólogos o fragmentos funcionales de los números de SEQ ID mencionados anteriormente. Tales homólogos funcionales pueden incluir secuencias de otras fuentes, tales como *E. coli*. La Tabla 1 proporciona un resumen de posibles secuencias citando números de acceso de gene bank correspondientes.

- 15 Los microorganismos, y particularmente microorganismos de *C. glutamicum*, se pueden usar en la producción de metionina al cultivarlos y opcionalmente aislar la metionina. Como se menciona anteriormente, los organismos modificados se pueden cultivar en un medio suplementado con mayores cantidades de formiato y ácido lipoico y/o lipoamida.

La siguiente tabla proporciona un resumen de algunas de las enzimas que se han discutido anteriormente con más detalle. Los números de acceso de gene bank citados se refieren al gene bank que se puede encontrar en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
formiato-THF-sintetasa	NP_939608, jk0881 DIP1253 SA1553 SAV1732 MW1675 SAR1810 SAS1658 SAOUHSC_01845 SAUSA300_1678 SAB1592c SACOL1782 LSA0947 SH1190 SP_1229 Arth_2901 SPD_1087 spr1109 SE1408 SERP1295 SAK_1144 M6_Spy0916 SpyM3_0853 MGAS2096_Spy0986 SPs1053 M5005_Spy_0927 SPy1213 MGAS9429_Spy1030 M28_Spy0899 MGAS10270_Spy1041 L159505 EF1725 stu0791 MGAS10750_Spy1076 STER_0837 spyM18_1165 gbs1089 SMU.1073 str0791 LSEI_1460 SAG1055 LBA1562 lp_1779 LACR_1007 CHY_2385 LVIS_0834 BCE_2187 BCZK1914 BT9727_1938 BALH_1871 BC2101 lin1990	<i>C. jeikeum</i> y otros
formil-THF-desformilasa	ADD13491 NCgl0371 cgl0382 cg0457 CE0400 RHA1_ro02096 nfa52050 Pfl_4436 PSEEN1152 PP_1367 PFL_4786 PA4314 PA14_56060 HCH_04985 P̄SPPH_4024 PSPTO_4314 Psyr_4018 Tcr_2051 Csal_2073 Noc_1789 Daro_0056 ebA3467 Patl_0486	<i>C. glutamicum</i> y otros
N5-formil-THF-ciclosintetasa	NCgl0845 cgl0881 cg1003 CE0955 DIP0861 SAV3674 SCO3183 SCE87.34 Tfu_0372 nfa49540 MSMEG_5472 Lxx05900 Mmcs_4291 Francci3_4041 ML0181 MAV_1101 RHA1_ro05631 FRAAL6398 MAP0923c Acel_0164 jk1526 aq_1731	<i>C. glutamicum</i> y otros

ES 2 517 394 T3

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
N5,N10-metenil-THF-reductasa	NCg12091, NP_601375 NCgl0620 cgl0648 cg0750 CE0659 jk1697 DIP0620 MAV_4323 MAP3463c MSMEG_1647 Rv3356c Mb3391c MT3464 ML0674 RHA1_ro06234 Tfu_2571 SCO4824 SAV3442 Mmcs_1204 Acel_0385 PPA1743 Lxx18630 Arth_1116	<i>C. glutamicum</i> y otros
N5,N10-metilen-THF-reductasa	NCgl2091, NP_601375	<i>C. glutamicum</i>
glicina descarboxilasa dependiente de PLP (gcvP)	GeneID:3433827, Q8FE66, P0A6T9, EG11810, g1789269;	<i>C. jeikeum</i> , <i>E. coli</i> y otros
aminometiltransferasa que contiene lipoamida (gcvH)	GeneID:3433826, CAA52144.1, P0A6T9, EG10371, g1789271	<i>C. jeikeum</i> , <i>E. coli</i> y otros
Enzima sintetizadora de N5,N10-metilen-THF (gcvT)	GeneID:3433828, EG11442, g1789272	<i>C. jeikeum</i> , <i>E. coli</i> y otros
lipoamida deshidrogenasa (lpd)	GeneID:3433577, CAA52144, Q8FE66, P0A9P0, P0A6T9, EG10545, g1786307	<i>C. jeikeum</i> , <i>E. coli</i> y otros
Lip A	GeneID:343570, EG11306, g1786846	<i>C. jeikeum</i> , <i>E. coli</i> y otros
Lip B	GeneID:343571, EG11591, g1786848	<i>C. jeikeum</i> , <i>E. coli</i> y otros
D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (serA)	NCg11235, CE1379, DIP1104, jk1291, nfa42210, MAP3033c, Mb3020c, MT3074, Rv2996c, ML1692, Tfu_0614, SAV2730, SCO5515, Francci3_3637, Lxx13140, CC3215, Jann_0261, CHY_2698, MMP1588, VNG2424G, RSP_1352, CYB_1383, AGR_L_2264, Atu3706, ZMO1685, tlr0325, NP0272A, Mbur_2385, Moth_0020, Adeh_1262, SMc00641, RHE_CH03454, rmAC2696, MJ1018, TTE2613, amb3193, AF0813, MK0297, DET0599, CYA_1354, Synpcc7942_1501, syc2486_c, Saro_2680, ELI_01970, MM1753, cdb_A580, BR1685, MTH970, Mbar_A1431, SPO3355, BruAb1_1670, BAB1_1697, BMEI0349, SYNW0533, Syncc9605_2150, Ava_3759, MA0592, alr1890, Mhun_3063, Syncc9902_0527, RPB_1315, glr2139, RPD_3905, Nwi_2968, RPA4308, SYN_00123, ABC1843, Nham_1119, STH9, bli7401, sli1908, CTC00694, BH1602, GK2247, RPC_4106, SH1200, Pcar_3115, Gmet_2378, SSP1039, BLi02446, BL00647, OB2626, BG10509, Acid345_0115, Dgeo_0710, Pro1436, SAR1801, SAB1582, SAV1724, SA1545, SERP1288, SE1401, SAS1650, MW1666, SAOUHSC_01833, SAUSA300_1670, SACOL1773, mll3875, GSU1198, HH0135, WS1313, Tmden_0875, PMT1431, DR1291,	<i>C. glutamicum</i> y otros

ES 2 517 394 T3

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
	<p>PMT9312_1452, TTC0586, Msp_1145, At1g17745, TTHA0952, PMM1354, At4g34200, RB6248, PMN2A_0926, CJE0970, Cj0891c, Pcar_0417, CMC149C, At3g19480, aq_1905, jhp0984, HP0397, PH1387, PAB0514, TK1966, C31C9.2, PF1394, Cag_1377, TM1401, Afu2g04490, CG6287-PA, rrmAC1762, AGR_pAT_578, PF0319, Atu5399, PAB2374, OB2286, Adeh_1858, BLi03698, BL03435, TK0683, PH0597, Reut_B3530, GK1954, ABC0220, MK0320, DSY0969, BP0155, Bxe_B1896, BB4474, BPP4001, STH3215, OB2844, CAC0015, RPC_3076, rrmAC2056, RPC_1162, AGR_pAT_470, Atu5328, PP3376, PAE3320, Bd1461, Pfl_2987, Rmet_4234, CNA07520, GK2965, MS1743, VV11546, LA1911, mll1021, MS0068, lp_0785, lin0070, VV2851, ebA6869, RPA2975, Tcr_0627, LIC11992, TTE1946, MA1334, LMOF2365_0095, Sde_3388, lmo0078, LmjF03.0030, SH0752, Rmet_4537, orf19.5263, VP2593, BCE1535, RPD_2906, CPE0054, OB2357, bli7965, BAS1325, BA_1955, GBAA1434, BA1434, Reut_B4747, PFL_2717, PA2263, YPTB3189, YP3611, y3301, YPO0914, GOX0218, ACL032C, RSP_3407, VC2481, BT9727_1298, BCZK1299, BMEII0813, BTH_12298, Reut_B4615, ECA3905, YPTB3910, YP3988, YPO4078, RPB_2550, BruAb2_0769, BRA0453, BAB2_0783, Pfl_2904, plu3605, PAE1038, DSY1673, Sden_3097, NTHI0596, SERP1888, blr4558, Rfer_1867, YER081W, BC1415, Pcar_0629, VF2106, y4096, SPCC4G3.01, SE1879, SAR2389, BB4731, Psysc_0369, TK0551, SCO3478, Csal_1770, XCV1890, Bcep18194_A5027, PM1671, SAOUHSC_02577, SAUSA300_2254, SACOL2296, SAS2196, MW2224, BLi03415, BL02138, Mfla_0724, PSPTO5294, XOO3260, XC_1568, XCC2550, SAB2178, SAV2305, SA2098, PSPPH_4885, XCV2876, SH2023, Adeh_2960, BURPS1710b_2286, BPSL1577, Pcryo_0410, NE1688, YPTB1320, YP1303, t2980, STY3218, Mbar_A2220, Psyr_4852, HI0465, y2896, YPO1288, STM3062, SPA2933, YIL074C, SERP0516, Bxe_A1982, XAC2724, SC3003, BB1050, Afu5g05500, SSP0606, SG2009, SE0622, XCC1825, SBO_2700, PF0370, SBO_3080,</p>	

ES 2 517 394 T3

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
	<p>SSO_3065, S3098, SF2898, UTI89_C3299, c3494, ECs3784, Z4251, JW2880, b2913, SRU_0653, SAB0796, SAR0892, Bd2892, ACIAD3302, Saci_1368, SSP1845, Bcep18194_A4216, Psyr_1043, Csal_0273, PPA2251, DVU0339, PFL_5911, SDY_3169, DDB0230052, SAS0800, MW0812, IL2104, PA4626, XC_2364, SAUSA300_0834, SACOL0932, SAV0930, SA0791, Bpro_1736, SMc01622, amb0136, PSPPH_1099, XOO2143, XAC1844, PAB1008, RB6394, LBA0942, MCA1407, PSPTO1215, PH0520, TM0327, SAOUHSC_00866, BG12409, Reut_A2281, ELI_06720, SMc01943, SDY_4350, TTC0431, all8087, GSU1672, Nmul_A0428, BTH_12885, BURPS1710b_1481, BPSL1250, Ta0779, DSY4020, BLi03716, BL03603, amb0195, RSP_3447, UTI89_C4093, ECs4438, Z4978, PSHAa0666, PFL_1001, SBO_3555, Rru_A2456, Dde_1681, BTH_11700, Pfl_5387, XF2206, S4182, SF3587, c4372, Reut_C5898, CPS_2082, SSO_3835, VNG0104G, TTHA0786, Pfl_2771, APE1831, SO0862, PD1255, ST1218, Moth_1954, BB1529, Csal_0096, SAV7481, Bxe_A1055, PP5155, UTI89_C3212, CG1236-PA, SSO0905, SAK_1826, gbs1847, SAG1806, blr3173, PA0316, ECA0078, DDB0231445, SMa2137, JW5656, b3553, GOX0065, BURPS1710b_2926, BPSL2459, BMA0513, Rmet_2446, SAOUHSC_00142, SAUSA300_0179, SACOL0162, SAS0152, SAR0178, MW0151, SAV0177, SA0171, BPP2132, RSc1034, PP1261, c3405, Dde_3689, CAC0089, SMc02849, mlr7269, PTO0372, BR2177, RSc3131, Mb0749c, MT0753, Rv0728c, DSY3442, SAB0117, Gmet_2695, Noc_2032, SC3578, BruAb1_2150, BAB1_2178, BMEI1952, BTH_11402</p>	
fosfoserina fosfatasa (serB)	<p>NCg12436, cg2779, CE2417, DIP1863, jk0483, nfa42930, MAP3090c, ML1727, Mb3068c, MT3127, Rv3042c, SCO1808, SAV6470, Tfu_0136, CT0173, Psyr_0557, PSPTO4957, PP4909, Sde_1075, HCH_05403, Plut_1948, PSPPH_0550, PA4960, ACIAD3567, Pfl_0506, Pcar_2283, BF2389, BF2300, RB8037, Cag_0409, PFL_0551, PG0653, BT0832, CMI086C,</p>	<p><i>C. glutamicum</i> y otros</p>

ES 2 517 394 T3

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
	<p>Csal_2542, Acid345_2803, AF2138, Lxx11750, Rmet_1368, Psyc_1857, AO090020000345, Afu3g06550, SPBC3H7.07c, Pcryo_2146, SMU.1269, stu1519, str1519, Reut_A1357, PBPRA0635, Mfla_1890, Rru_A0465, ACL130C, Daro_1962, VV2674, VP2431, YGR208W, Bxe_A2331, VV11730, RSc1640, blr6505, VF0509, CMQ250C, IL1876, Nwi_2345, Bcep18194_A5077, L0085, Z5989, NMB0981, SBO_4451, SSO_4538, S4691, SF4420, ECs5346, JW4351, b4388, SDY_4649, UT189_C5159, c5473, SAK_0710, gbs0605, SAG0625, MJ1594, ECA0465, BL1792, RPB_3347, NMA1179, GOX1085, RSP_1350, Tcr_1620, SC4423, orf19.5838, NGO1468, YPTB0586, YP3740, y3738, YPO0442, STM4578, SPA4388, t4617, STY4925, RPA2029, VC2345, ZMO1137, CC2097, PPA2051, ebA6034, BURPS1710b_2322, BPSL1543, BMA1313, MTH1626, CV3516, CPS_1107, RHE_CH02794, AGR_C_3697, Atu2040, RPD_2096, Nmul_A0636, BTH_I2264, Msp_1096, BB3819, BPP3368, MK0121, SPO3353, BP0863, PM1657, SG0398, Mbur_0935, HI1033, NTHI1192, RPC_3257, Nham_2724, Noc_2504, mlr1449, NE0439, BR1391, BMEI0615, BAB1_1410, BruAb1_1387, plu0551, SMc01494, MMP0541, SO1223, Jann_0252, Bpro_2720, MS1758, amb3479, PSHAa0661, MA4429, MM1107, LIC11775, LA2145, Sden_1032, Mbar_A1094, Rfer_1329, MCA1267, ELI_05525, Saro_2259, WS2081, SPO2363, STM2197, NP0274A, SC2213, SPA0654, t0658, STY2431, PG1170, rmAC2717, DDB0230054, CJE0330, Cj0282c, VNG2423G, Tmden_1665, HP0652, jhp0597, CMP085C, PAB1207, CMT542C, TK0052</p>	
<p>fosfoserina aminotransferasa (serC)</p>	<p>NCg10794, cg0948, NCg10794, CE0903, DIP0784, jk0425, nfa6550, SAV3883, MAP0823c, ML2136, Tfu_0246, SCO4366, Mb0908c, MT0907, Rv0884c, Francci3_0082, Lxx17890, BL1660, PPA0483, Jann_0260, SPO3354, GSU3260, ZMO1684, Gmet_3173, Saro_2679, RSP_1351, Rru_A1104, Sde_1332, CG11899-PA, CPE0053, lp_0204, Pcar_2772, BT1153, DSY4684, amb3194, rmAC3046, mll3876, NP0884A, Adeh_2622, BF2072, BF2018, Nham_1118, Moth_0019, PG1278, Ava_1171, RHE_CH03455, LMOF2365_2816, BT9727_3023, SMc00640, Mbur_0514, AGR_L_2260, Atu3707, all1683, BCE3285, CC3216, 30.100047, lmo2825, Nwi_2969, BruAb1_1672, BR1687, BAB1_1699, SG0990, lin2957, BMEI0347, Tbd_0949, NTHI1335, BCZK2969, PSPPH_3666, CAC0014, CMT252C, GOX1446, RPC_4107, CV2301,</p>	<p><i>C. glutamicum</i> y otros</p>

ES 2 517 394 T3

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
	<p>BCI_0252, Psyr_3646, AF1417, MM2911, BC3249; BH1188, RPA4309, bli7402, DDB0230053, BAS3079, BA_3823, RPB_1314, HI1167, Nmul_A2190, STH3178, L0083, Daro_0984, Pfl_4077, PP1768, HD1382, 253.t00001; LSL_0091, ECA2594, PTO0371, Mbar_A1294, BH03780, PFL_4313, PSPTO1746, GBAA3321, BA3321, Bfl383, BQ02790, Mfla_1687, y2784, YPO1389, CNL05470, RPD_3906, YPTB1414, MA2304, SRU_2207, Daro_1231, RSc0903, ELI_01955, HP0736, Rfer_1570, PA3167, plu1619, MJ0959, ST0602, BG12673, FTT0560c, MS1573, jhp0673, FTL_1018, LIC10315, LA0366, lpp1373, RB6246, BLi01082, BL05093, NE0333, F26H9.5, DP1933, Noc_0172, HCH_04982, PM0837, PMT9312_0035, ebA907, Rmet_0715, Reut_A2576, lpg1418, PBPRA2455, VF0899, str1529, Adeh_2994, BTH_11966, lpl1369, MM0246, Mbar_A2080, Bcep18194_A4155, Csal_2167, DR1350, gbs1621, BURPS1710b_2651, BPEN_394, rmAC1999, Mhun_2475, Cj0326, Tmden_0073, BPSL2219, Pcryo_1434, YP1204, MTH1601, GK0649, Tcr_1192, Psyc_1036, PBPRA3292, stu1529, SYN_00124, STM0977, SPA1821, MA1816, SC0931, t1957, STY0977, TK1548, CJE0371, BMA1625, Dgeo_1114, XOO2388, SSO2597, BURPS1710b_2998, BMA0433, VV11425, UTI89_C0978, c1045, MK0633, HH0909, ACIAD2647, ABC1531, MCA1420, SSO_0908, S0966, SF0902, BPSL2519, WGLp486, bbp289, SBO_2193, AO090023000099, Bxe_A0976, IL1359, SDY_2354, ECs0990, Z1253, JW0890, b0907, VV21664, Syncc9605_0044, VP2714, VP1247, XC_2645, XCC1589, SMa1495, BTH_11634, PSHAa1422, VC1159, cbdb_A581, STH8, VVA0476, SPAC1F12.07, PAB1801, WS0024, VV2958, TTHA0582, CT0070, PMM0035, NMA1894, VV1451, VV12813, VPA0235, BU312, At4g35630, TTC1813, RHE_PB00131, NMB1640, CPS_2190, XAC1648, TTC0213, Bpro_1793, Sden_0404, XF2326, At2g17630, PH1308, MMP0391, DET0600, Tbd_2509, VF0339, TTHA0173, NP2578A, VCA0604, Saci_0249, NGO1283, VC0392, SMU.1656</p>	
serina deshidratasa (sdaA)	NCg11583, NCg10939	<i>C. glutamicum</i>

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
serina hidroximetiltransferasa (shmt)	<p>Q93PM7, BA000035, Q8FQR1, Q6NI47, Q4JU69, Q5YQ76, Q73WG1, Q4NIE8, O53441, P59953, Q6ADF0, Q9X794, Q40XZ1, Q82JI0, O86565, Q47MD6, Q4NM56, ORF, Q4NGB0, BX251412, O53615, P66806, Q7U2X3, Q24MM6, Q2ZEP1, Q65DW5, Q426V7, Q5KUI2, Q2RFW7, Q3A934, Q3CJJ0, Q8R887, Q8Y4B2, Q4EPI3, Q71WN9, Q67N41, Q927V4, P39148, Q5HE87, Q2YUJ1, Q9K6G4, Q7SIB6, Q2FF15, Q5WB66, Q4CID1, Q2BG18, Q40L42, Q3AN03, Q8YMW8, O66776, Q1YINI, Q41G88, Q74CR5, Q3GAC7, Q3MBD8, Q2DMQ8, Q7U9J7, Q39V87, Q630T3, Q72XD7, Q2D1V8, Q6HAW9, AE017221, Q5SI56, Q72IH2, Q814V2, Q5HMB0, Q8XJ32, AE017225, Q81JY4, Q3WZQ2, CP000360, Q5NN85, Q3AW18, Q4L7Z4, Q3A4L9, Q26LA5, Q7V4U3, Q6FA66, Q2S9R4, Q3G5N8, Q2SF17, Q3N8U1, Q6N693, Q82UP9, Q2JT50, Q31CS4, Q5P7P1, Q9HTE9, Q3KDV1, Q26XG3, Q3SGX5, Q5FNK4, Q2ILI1, S30382, Q2YD58, Q4BPZ9, Q2LOM6, Q5N2P9, Q37615, Q46HB6, P50435, Q37NB6, Q7ND67, Q72CT0, Q2WMW5, Q2CH39, Q7VDS8, Q8U7Y5, Q88AD1, O85718, Q48CP3, Q2JI36, Q8DH33, Q7V335, Q214H7, Q6MLK1, Q3QXZ6, Q2DFI0, Q9WZH9, CP000283, Q37FB0, Q3N0F7, Q4ZM83, Q44AR5, Q8EM73, Q1WTR3, Q2CP12, Q3SRV3, Q3CCS2, Q2W4T2, Q35IU4, Q2IWS4, Q2CQJ5, Q4J3C4, Q49Z60, CT573326, Q4C6H0, Q3IZN2, Q607U4, P24060, Q4BQS8, Q41LQ8, Q7UQN2, Q2YN95, Q2RTB8, Q3P773, Q46RR4, Ser, Q47IH1, Q3JGP5, CT573326, Q21NP8, Q3F809, Q2T437, Q3F764, Q88R12, S15203, Q4K4P6, Q5X722, Q8YGG7, Q3VCK5, Q5WYH4, CP000271, Q1UEA8, Q4LV45, Q8G1F1, Q9I138, P77962, P34895, Q62D15, Q1QMB9, Q1V9T1, Q2BLZ4, Q30YL7, Q8XTQ1, Q92QU6, Q97GV1, Q39A26, Q45D73, AM180252, Q3WQZ9, Q9KMP4, Q2KA25, Q4LY56, Q2S4G9, Q8D7G5, Q36MR4, Q28N04, Q3K5K9, CP000254, BA000038, Q4B4P5, Q2FLH5, Q7NYI8, Q7MEH7, Q6N622, Q2RVA2, Q3XRF3, Q303B4, Q7N216, Q47WY2, Q4UQT6, Q481S6, Q4BM61, Q4BA21, Q3FFQ1, Q3HGC4, Q87I03, Q3FB08, Q5LPA8, Q88UT5, Q92XS8, Q3QH38, Q34W82, Q39J72, Q8Y1G1, CP000152, AM236080, H97501, Q391K1, Q8UG75, Q21V29, Q474L3, Q8KC36, Q3APN5, CP000124, Q3BXI8, Q62I16, Q831F9, Q1QE01, Q3CX04, Q2NZ83, Q8PPE3, CP000352, Q3S0V7, Q2AFR6, Q8TK94, CP000086, Q2BI80, Q2G646, Q3J9K8, Q47XG4, Q2SYS4, Q1YWG2, Q73GC3, Q44LK7, Q33Y20, Q2NS25, Q2CGY4, Q5GTS7, Q36D93, AE008384, Q8PZQ0, Q9HVI7, Q983B6, CP000270, Q3R0R3, Q2Z5R9, Q1VX33, Q4ZNH2, Q4FUZ8, Q72PY2, Q48DU7, Q3VPD3,</p>	<i>C. glutamicum</i> y otros

ES 2 517 394 T3

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
	<p>Q6LHN7, AE009442, Q87AS2, Q3B2I7, Q87WC1, Q7WFD2, Q4K5R9, Q1R8I4, P0A826, CT573326, Q3WKF8, Q2ZQD2, Q8EBN8, Q8XA55, Q3ZZG3, Q2J6M3, Q2DUP7, Q9XAZ1, Q3K6J0, Q3Q439, Q9A8J6, Q7W400, Q3YZ04, Q32D21, Q5F8C0, Q4AMK6, Q6D246, Q3R828, E82743, Q9PET2, Q3P6F8, Q9XAY7, Q3NK51, Q3Z9B9, Q6G3L3, Q88Q27, Q1ZIE9, Q31FS6, P56990, Q9XB01, Q3DHL3, Q6LU17, Q7W116, H82258, Q9KTG1, Q8E5C6, Q57LF7, Q3IRX5, Q3K122, Q7WPH6, AP008231, Q1YU48, Q3D8P3, Q8DPZ0, Q97R16, Q46A52, Q6F211, Q1PZE1, Q8L372, B48427, Q2KV15, Q1RGX5, Q43K52, Q3VUL2, Q3II23, Q1ZPS2, Q2NAR9, Q8DU67, Q9CHW7, Q6CZV5, Q3XBK9, H84295, Q4FLT4, Q1UZA1, Q8DFC9, Q74LC1, Q488N6, Q2C6B3, Q65T08, Q1Z7P1, F75567, Q9HPY5, Q9RYB2, Q1V311, Q87RR2, Q3GI80, Q6G009, Q8ZCR1, Q5QXT4, Q5V3D7, Q2ST43, Q5E706, Q8Z2Z9, Q1XXG3, Q5PBM8, Q6MS85, Q3EFW1, Q7QM11, Q2BUE3, Q48TK6, Q5FMC0, BA000034, Q1U7W2, Q8P122, Q8K7H8, Q99ZP1, Q5M0B4, Q5XC65, Q83BT3, Q2GEI3, Q4QM19, CP000262, Q84FT0, Q5M4W1, CP000260, Q1QU94, Q4HIU1, P43844, Q40IP4, Q5NFI3, Q2A498, Q92GH7, Q2GLH3, O08370, AY871942, Q68W07, Q4UK96, Q4HBL3, Q30P60, Q26C95, Q38WJ7, Q3YRD1, P59432, Q7P9P7, JQ1016, P57830, P24531, P34894, Q5HW65, Q2X6F1, Q2JFD4, Q2NIT8, Q30R29, CP000238, Q6YR37, Q8A9S7, Q5LD58, Q5FG30, O51547, Q4HNY8, Q4HFT7, Q8K9P2, P57376, Q6AM21, Q3W273, Q660S1, P78011, Q6KHH3, Q4A6A3, Q98QM2, Q492D5, Q2DZD3, Q89HS7, Q7MAR0, Q7MXW0, Q8D253, Q8EWD1, Q7NBH8, Q7VFL1, Q4QTL5, P56089, Q3W5W4, Q601P7, Q2E435, Q7VRR4, Q4A8E1, P47634, Q4AAB2, Q9ZMP7, Q82J74, Q1VNH3, Q50LF3, Q3WZI8, Q9K4E0, Q8KJG9, Q98A81, I40886, P50434, Q9W457, Q30K91, Q30K95, Q30K92, Q30K98, Q30K94, Q30K93, Q5H888, Q29H49, Q1UKA7, Q3KLR8, Q6U9U4, Q56F03, Q268J4, Q275S8, Q4I358, Q758F0, Q6CLQ5, CH476726, Q94JQ3, T05362, Q5L6P4, AJ438778, Q5B0U5, S24342, P07511, Q7SXXN1, Q2KIP4, Q5E9P9, S65688</p>	
metilen tetrahidrofolato reductasa (metF)	Cgl2171, EG11585, g1790377	<i>C. glutamicum</i> , <i>E. coli</i> y otros

ES 2 517 394 T3

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
<p>metionina sintasa I dependiente de cob(l)alamina (metH)</p>	<p>Cg11139, cg1701, CE1637, DIP1259, nfa31930, Rv2124c, Mb2148c, ML1307, SCO1657, Tfu_1825, SAV6667, MT2183, GOX2074, tll1027, syc0184_c, alr0308, slr0212, gll0477, SYNW1238, TTC0253, TTHA0618, PMT0729, Pro0959, PMN2A_0333, PMM0877, WS1234, BH1630, GK0716, BCE4332, ABC1869, BC4250, BCZK4005, BT9727_3995, BA_4925, GBAA4478, BA4478, BAS4156, BLi01192, BL01308, MAP1859c, BruAb1_0184, BMEI1759, BR0188, SMc03112, MCA1545, AGR_C_3907, Atu2155, DR0966, RB9857, ebA3184, VC0390, RPA3702, VV11423, VV2960, VP2717, NE1623, VF0337, LIC20085, LB108, YPTB3653, YPO3722, y0020, YP3084, CV0203, SPA4026, MS1009, SC4067, SO1030, DP2202, STM4188, STY4405, t4115, PP2375, PFL_3662, Z5610, ECs4937, c4976, JW3979, b4019, SF4085, S3645, BB4456, BPP3983, BP3594, bli1418, CPS_1101, Psyr_2464, PSPTO2732, R03D7.1, PSPPH_2620, PBPRA3294, Daro_0046, PA1843, ECA3987, CT1857, CAC0578, ACIAD1045, Psyc_0403, 4548, DDB0230138, BF3039, BF3199, BT0180, 238505, GSU2921, STH2500, XC_2725, XCC1511, XOO2073, TTE1803, RSc0294, XAC1559, BPSL0385, DVU1585, CTC01806, CC2137, TM0268, ZMO1745, FN0163, BG13115, lin1786, SAG2048, gbs2004, LMOF2365_1702, lmo1678, SE2381, SERP0035, MW0333, SAS0333, SMU.874, SA0345, SAV0357, SACOL0429, SAR0354, SH2637</p>	
<p>O-acetilhomoserina sulfhidrolasa</p>	<p>NCg10625, cg0755, CE0679, DIP0630, jk1694, MAP3457, Mb3372, MT3443, Rv3340, nfa35960, Lxx18930, Tfu_2823, CAC2783, GK0284, BH2603, lmo0595, lin0604, LMOF2365_0624, ABC0432, TTE2151, BT2387, STH2782, str0987, stu0987, BF1406, SH0593, BF1342, lp_2536, L75975, OB3048, BL0933, LIC11852, LA2062, BMAA1890, BPSS0190, SMU.1173, BB1055, PP2528, PA5025, PBPRB1415, GSU1183, RPA2763, WS1015, TM0882, VP0629, BruAb1_0807, BMEI1166, BR0793, CPS_2546, XC_1090, XCC3068, plu3517, PMT0875, SYNW0851, Pro0800, CT0604, NE1697, RB8221, bli1235, syc1143_c, ACIAD3382, ebA6307, RSc1562, Daro_2851, DP2506, DR0873, MA2715, PMM0642, PMN2A_0083, IL2014, SPO1431, ECA0820, AGR_C_2311, Atu1251, mlr8465,</p>	

ES 2 517 394 T3

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
	<p>SMc01809, CV1934, SPBC428.11, PM0738, SO1095, SAR11_1030, PFL_0498, CTC01153, BA_0514, BCE5535, BAS5258, GBAA5656, BA5656, BCZK5104, TTHA0760, TTC0408, BC5406, BT9727_5087, HH0636, YLR303W, ADL031W, CJE1895, spr1095, rrmAC2716, orf19.5645, Cj1727c, VNG2421G, PSPPH_1663, XOO1390, Psyr_1669, PSPTO3810, MCA2488, TDE2200, FN1419, PG0343, Psysc_0792, MS1347, CC3168, Bd3795, MM3085, 389.t00003, NMB1609, SAV3305, NMA1808, GOX1671, APE1226, XAC3602, NGO1149, ZMO0676, SCO4958, lpl0921, lpg0890, lpp0951, EF0290, BPP2532, CBU2025, BP3528, BLi02853, BL02018, BG12291, CG5345-PA, HP0106, ML0275, jhp0098, At3g57050, 107869, HI0086, NTHI0100, SpyM3_0133, SPs0136, spyM18_0170, M6_Spy0192, SE2323, SERP0095, SPy0172, PAB0605, DDB0191318, ST0506, F22B8.6, PTO1102, CPE0176, PD1812, XF0864, SAR0460, SACOL0503, SA0419, Ta0080, PF1266, MW0415, SAS0418, SSO2368, PAE2420, TK1449, 1491, TVN0174, PH1093, VF2267, Saci_0971, VV11364, CMT389C, VV3008</p>	
Aspartato cinasa (ask)	<p>Cgl0251, NCgl0247, CE0220, DIP0277, jk1998, nfa3180, Mb3736c, MT3812, Rv3709c, ML2323, MAP0311c, Tfu_0043, Francci3_0262, SCO3615, SAV4559, Lxx03450, PPA2148, CHY_1909, MCA0390, cdb_A1731, TWT708, TW725, Gmet_1880, DET1633, GSU1799, Moth_1304, Tcr_1589, Mfla_0567, HCH_05208, PSPPH_3511, Psyr_3555, PSPTO1843, CV1018, STH1686, NMA1701, Tbd_0969, NMB1498, Pcar_1006, Daro_2515, Csa1_0626, Tmden_1650, PA0904, PP4473, Sde_1300, HH0618, NGO0956, ACIAD1252, PFL_4505, ebA637, Noc_0927, WS1729, Pcryo_1639, Psysc_1461, Pfl_4274, LIC12909, LA0693, Rru_A0743, NE2132, RB8926, Cj0582, Nmul_A1941, SYN_02781, TTHA0534, CJE0685, BURPS1710b_2677, BPSL2239, BMA1652, RSc1171, TTC0166, RPA0604, BTH_11945, Bpro_2860, Rmet_1089, Reut_A1126, RPD_0099, Bxe_A1630, Bcep18194_A5380_aq_1152, RPB_0077, Rfer_1353, RPC_0514, BH3096, BLi02996, BL00324, amb1612, tlr1833, jhp1150, blr0216, Dde_2048, BB1739, BPP2287, BP1913, DVU1913, Nwi_0379, ZMO1653, Jamm_3191, HP1229, Saro_3304, Nham_0472, CBU_1051, slr0657, SPO3035, Synpcc7942_1001, BG10350, BruAb1_1850, BAB1_1874, BMEI0189,</p>	

ES 2 517 394 T3

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
	<p>BT9727_1658, syc0544_d, BR1871, gll1774, BC1748, mll3437, BCE1883, ELI_14545, RSP_1849, BCZK1623, BAS1676, BA_2315, GBAA1811, BA1811, Ava_3642, alr3644, PSHAa0533, AGR_L_1357, Atu4172, lin1198, BH04030, PMT9312_1740, SMc02438, CYA_1747, RHE_CH03758, lmo1235, LMOF2365_1244, PMN2A_1246, CC0843, Pro1808, BQ03060, PMT0073, Syncc9902_0068, GOX0037, CYB_0217</p>	
<p>homoserina deshidrogenasa (hom)</p>	<p>Cgl1183, cg1337, NCgl1136, CE1289, DIP1036, jk1352, nfa10490, SAV2918, Mb1326, MT1333, Rv1294, SCO5354, MAP2468c, ML1129, Francci3_3725, Tfu_2424, Lxx06870, PPA1258, Moth_1307, BL1274, CHY_1912, DSY1363, GK2964, CAC0998, BLi03414, BL02137, BC5404, STH2739, BCZK5102, BT9727_5085, Gmet_1629, BCE5533, BB1926, BP2784, CTC02355, BG10460, BPP2479, BAS5256, BA_0512, GBAA5654, BA5654, Syncc7942_2090, syc2003_c, Adeh_1638, CYA_1100, Pcar_1451, Mfla_1048, Mfla_0904, TW329, TWT439, BH3422, all4120, Daro_2386, gll4295, ebA4952, Ava_0783, Syncc9605_1957, LSL_1519, OB0466, lmo2547, PMT1143, Bpro_2190, SYNW0711, LMOF2365_2520, lin2691, sll0455, CV0996, RSc1327, PMT9312_1062, ABC2942, Bcep18194_A5155, BURPS1710b_2396, BPSL1477, BMA1385, NMA1395, NMB1228, ill0277, Syncc9902_0704, GSU1693, Bxe_A2381, MCA0597, NGO0779, CYB_1425, BTH_12198, BMEI0725, Rmet_1966, Rfer_1912, SMc00293, BruAb1_1275, BAB1_1293, SYN_00890, Reut_A1993, RHE_CH01878, BR1274, aq_1812, TTE2620, ACIAD0264, PFL_1103, stu0469, str0469, Pfl_1027, Psyr_1290, PMN2A_0702, MTH1232, Csal_3010, AGR_C_2919, Atu1588, PSPPH_1360, PP1470, NE2369, PSPTO1480, Tcr_1251, BC1964, Nmul_A1551, Saro_0019, mll0934, WS0450, spr1219, SP1361, Noc_2454, BT9727_1799, BCZK1782, BCE2051, Tbd_0843, PA3736, DET1206, amb3728, Rru_A2410, LIC10571, LA3638, SMU.965, BAS1825, BA_2468, GBAA1968, BA1968, cbdb_A1123, GOX1517, PMM1051, HCH_01779, RB8510, DVU0890, Pro1150, Nham_2309, Tmden_1904, Sde_1209, Psyc_0253, ELI_13775, RSP_0403, L0090, Dde_2731, Pcryo_0279, Nwi_1647, lp_0571, BH10030, SPO1734, Jann_2998, blr4362,</p>	

ES 2 517 394 T3

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
	<p>RPA2504, EF2422, DP1732, LBA1212, RPD_2495, RPC_2816, CC1383, RPB_2966, CJE0145, Cj0149c, Acid345_1481, ZMO0483, Bpro_5333, SAK_1205, gbs1187, jhp0761, SH1579, SAG1120, HP0822, SE1009, SERP0897, SAOUHSC_01320, SAUSA300_1226, SAB1186, SACOL1362, SAS1268, SAR1338, MW1215, SAV1328, SA1164, HH1750, SSP1438, lp_2535, TTE2152, SAR11_1025, DR1278, PFL_3809, Dgeo_0610, Mhun_2292, DSY3981, PP0664, MA2572, ABC1578, Mbar_A1898, TTHA0489, TTC0115, MM2713, Mbur_1087, BH1737, AF0935, MK1554, MTH417, VNG2650G, Msp_0487, ABC0023, rnaC2408, TK1627, TM0547, MJ1602, NP0302A, BH1253, MMP1702, BCE2626, LmjF07.0260, BCZK2354, BT9727_2388, BAS2433, BA_3119, GBAA2608, BA2608, BC2548, Acid345_4165, CTC00886, ST1519, Saci_1636, APE1144, SSO0657, PF1104, Adeh_3931, PAB0610, PH1075, Cag_0142, PAE2868, YJR139C, XOO1820, Plut_1983, XAC3038, Adeh_1400, XCV3175, PTO1417, SCO0420, SRU_0482, XC_1253, XCC2855, SO4055, CT2030, SPBC776.03, AO090003000721, TVN0385, ABL080W, AO090009000136, CPS_0456, HI0089, orf19.2951, Sden_0616, UTI89_C4525, Afu3g11640, MS1703, SBO_3960, SSO_4114, STM4101, SC3992, t3517, STY3768, c4893, ECs4869, Z5495, JW3911, b3940, AN2882.2, ECA4251, CMN129C, NTHI0167, plu4755, ECA3891, YPTB0602, YP3723, y3718, YPO0459, PM0113, S3729, SF4018, SPA3944, Mfla_1298, PSHAa2379, PBPRA0262, XOO2242, STM0002, SC0002, SPA0002, t0002, STY0002, c0003, SRU_0691, XCC1800, PD1273, BPEN_115, SDY_3775, VC2684, SDY_0002, SBO_0001, YPTB0106, YP0118, y0303, YPO0116, UTI89_C0002, ECs0002, Z0002, JW0001, b0002, VV3007, VV11365, XC_2389, VP2764, XF2225, SSO_0002, S0002, SF0002</p>	
Serina desaminasa (sda)	GeneID: 1019614, NCgl1583, EG10930, g178116	<i>C. glutamicum</i> , <i>E. coli</i> , y otros
Homoserina cinasa (hsk)	Cgl1184, cg0307, CE0221, DIP0279, jk1997, RHA1_r o04292, nfa3190, Mmcs_4888, MSMEG_6256, MAP0310c, MAV_0394, Mb3735c, MT3811, Rv3708c, Ace1_2011, ML2322, PPA0318, Lxx03460, SCO2640, SAV5397, CC3485	<i>C. glutamicum</i> y otros

ES 2 517 394 T3

Enzima	Número de acceso de Gene bank	Organismo
lipoproteína de unión a D-metionina (metQ)	YP_224930,NP_599871,NP_737241,NP_938985, NP_938984,YP_701727,YP_251505,YP_120623, YP_062481,YP_056445,ZP_00121548,NP_696133 ,YP_034633,YP_034633,YP_081895,ZP_0039069 6,YP_016928,YP_026579,NP_842863,YP_081895 ,ZP_00240243,NP_976671	<i>C. glutamicum</i> y otros
mcbR	cg3253,CE2788,DIP2274,jk0101,nfa21280,MSME G_4517Lxx16190,SCO4454,Bcep18194_A3587,B amb_0404,Bcen2424_0499,Bcen_2606,Ava_4037, BTH_I2940,RHA1_ro02712,BMA10299_A1735,B MASAVP1_A0031,BMA2807,BURPS1710b_361 4	<i>C. glutamicum</i> y otros
Glucosa-6-fosfato- deshidrogenasa	Cgl1576,BAB98969,NCgl1514,NCgl1514,cg1778, CE1696,DIP1304,jk0994,RHA1_ro07184,nfa3575 0,MSMEG_3101,Mmcs_2412,MAP1176c,Mb1482 c,MT1494,Rv1447c,SAV6313,Acel_1124,SCO193 7,MAV_3329,Lxx11590,BL0440,Arth_2094,Tfu_2 005, por favor, indicar otros	<i>Corynebacterium glutamicum</i> y otros
proteína OPCA	Cgl1577,NP_738307.1,NP_939658.1,YP_250777. 1,YP_707105.1,YP_119788.1,ZP_01192082.1,NP_ 335942.1,ZP_01276169.1,NP_215962.1,ZP_01684 361.1,YP_887415.1,ZP_01130849.1,YP_062111.1, ZP_00615668.1,YP_953530.1,ZP_00995403.1,YP_ 882512.1,NP_960109.1,YP_290062.1,YP_83157 3.1,NP_827488.1,YP_947837.1,NP_822945.1,NP_ 626203.1,NP_630735.1,CAH10103.1,ZP_0012091 0.2,NP_695642.1,YP_909493.1,YP_872881.1,YP_ 923728.1,YP_056265.1,ZP_01648612.1,ZP_01430 762.1,ZP_00569428.1,YP_714762.1,YP_480751.1, NP_301492.1,YP_642845.1,ZP_00767699.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> y otros
Transaldolasa	Cgl1575,cg1776,CE1695,DIP1303,jk0993,Mmcs_ 2413,MSMEG_3102,MAP1177c,RHA1_ro07185, MAV_3328,Mb1483c,Rv1448c,MT1495,nfa35740 ,ML0582,Arth_2096,Lxx11610,SAV1767,Tfu_200 3,SCO1936,Francci3_1648	<i>Corynebacterium glutamicum</i> y otros
6-fosfogluconolactonasa	Cgl1578,NCgl1516,NCgl1516,cg1780,CE1698,DI P1306,Mmcs_2410,MSMEG_3099,Mb1480c,MT1 492,Rv1445c,MAV_3331,RHA1_ro07182,nfa3577 0,MAP1174c,ML0579,jk0996,Tfu_2007,FRAAL4 578,SAV6311,SCO1939,SCC22.21,TW464	<i>Corynebacterium glutamicum</i> y otros
Transcetolasa	Cgl1574,YP_225858,cg1774,CE1694,DIP1302,jk0 992,nfa35730,RHA1_ro07186,MSMEG_3103,MA P1178c,ML0583,MAV_3327,Mb1484c,MT1496,R v1449c,Mmcs_2414,Tfu_2002,Arth_2097,Lxx116 20.SAV1766,SCO1935,Acel_1127	<i>Corynebacterium glutamicum</i> y otros

Los números de acceso anteriores son los números de acceso oficiales de Genbank, o son sinónimos para números de acceso que tiene referencias cruzadas en Genbank. Estos números se pueden buscar y encontrar en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Más abajo se da un resumen general sobre cómo incrementar y disminuir la cantidad y/o actividad de polipéptidos y genes en *C. glutamicum*. No obstante, la persona experta en la técnica estará al tanto de otras tecnologías y enfoques para identificar nuevos homólogos de las enzimas de la Tabla 1 al realizar búsquedas en las bases de datos apropiadas, y/o para alterar la expresión de estas enzimas en organismos distintos de bacterias corineformes.

## 5 Incremento o introducción de la cantidad y/o actividad

Con respecto al incremento de la cantidad, se pueden diferenciar dos escenarios básicos. En el primer escenario, la cantidad de la enzima se incrementa mediante expresión de una versión exógena de la proteína respectiva. En el otro escenario, la expresión de la proteína endógena se incrementa influyendo sobre la actividad de, por ejemplo, el promotor y/o elemento potenciador y/u otras actividades reguladoras que regulan las actividades de las proteínas respectivas ya sea a nivel transcripcional, traduccional o post-traduccional.

De este modo, el incremento de la actividad y la cantidad de una proteína se pueden lograr vía diferentes rutas, por ejemplo cambiando mecanismos reguladores inhibidores a nivel transcripcional, traduccional, y proteico, o mediante incremento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica estas proteínas en comparación con el organismo de partida, por ejemplo induciendo transcetolasa endógena mediante un promotor fuerte y/o introduciendo ácidos nucleicos que codifican transcetolasa.

En una realización, el incremento de la cantidad y/o actividad de las enzimas de la Tabla 1 se logra introduciendo ácidos nucleicos que codifican las enzimas de la Tabla 1 en un microorganismo tal como *C. glutamicum*.

En principio, se puede usar cualquier proteína de diferentes organismos con una actividad enzimática de las proteínas enumeradas en la Tabla 1. Con secuencias de ácido nucleico genómicas de tales enzimas procedentes de fuentes eucariotas que contienen intrones, se han de usar secuencias de ácido nucleico ya procesadas, como los ADNc correspondientes, en el caso de que el organismo hospedante no sea capaz o no se pueda hacer que sea capaz del ajuste de los ARNm correspondientes. Todos los ácidos nucleicos mencionados en la descripción pueden ser, por ejemplo, una secuencia de ARN, ADN o ADNc.

Según la presente invención, el incremento o introducción de la cantidad de una proteína comprende típicamente las siguientes etapas:

a) producir un vector que comprende las siguientes secuencias de ácido nucleico, preferiblemente secuencias de ADN, en orientación 5'-3':

- una secuencia promotora funcional en un organismo de la invención
- enlazada operativamente a ella una secuencia de ADN que codifica una proteína de por ejemplo la Tabla 1, sus homólogos funcionales, fragmentos funcionales o versiones mutadas funcionales
- opcionalmente, una secuencia de terminación funcional en los organismos de la invención

b) transferir el vector de la etapa a) a un organismo de la invención, tal como *C. glutamicum*, y, opcionalmente, integrarlo en los genomas respectivos.

Como se expone anteriormente, fragmentos funcionales se refiere a fragmentos de secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas de por ejemplo la Tabla 1, cuya expresión todavía conduce a proteínas que tiene la actividad enzimática sustancialmente similar a la de la proteína de longitud completa respectiva.

El método mencionado anteriormente se puede usar para incrementar la expresión de secuencias de ADN que codifican enzimas de por ejemplo la Tabla 1, o sus fragmentos funcionales. El uso de tales vectores, que comprenden secuencias reguladoras, como secuencias promotoras y de terminación, es conocido por la persona experta en la técnica. Además, la persona experta en la técnica sabe cómo se puede transferir un vector de la etapa a) a organismos tales como *C. glutamicum* o *E. coli*, y qué propiedades debe tener un vector para ser capaz de ser integrado en sus genomas.

Si el contenido enzimático en un organismo tal como *C. glutamicum* se incrementa mediante transferencia de un ácido nucleico que codifica una enzima de otro organismo, como por ejemplo *E. coli*, es aconsejable transferir la secuencia de aminoácidos, codificada por la secuencia de ácido nucleico de por ejemplo *E. coli* mediante retrotraducción de la secuencia polipeptídica según el código genético, en una secuencia de ácido nucleico que comprende principalmente esos codones, que se usan más a menudo debido al uso de codones específico del organismo. El uso de codones se puede determinar por medio de evaluaciones de ordenador de otros genes conocidos de los organismos pertinentes.

Según la presente invención, un incremento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una enzima de la Tabla 1 también se entiende que es la manipulación de la expresión de las enzimas endógenas respectivas de un organismo, en particular de *C. glutamicum*. Esto se puede lograr, por ejemplo, alterando la secuencia de ADN promotora para genes que codifican estas enzimas. Tal alteración, que provoca una velocidad de expresión alterada, preferiblemente incrementada, de estas enzimas, se puede lograr mediante sustitución con promotores fuertes y

mediante supresión y/o inserción de secuencias de ADN.

Una alteración de la secuencia promotora de genes endógenos provoca habitualmente una alteración de la cantidad expresada del gen, y por lo tanto también una alteración de la actividad detectable en la célula o en el organismo.

5 Además, una expresión alterada e incrementada, respectivamente, de un gen endógeno se puede lograr mediante una proteína reguladora, que no aparece o que se ha eliminado en el organismo transformado, y que interactúa con el promotor de estos genes. Tal regulador puede ser una proteína quimérica que consiste en un dominio de unión de ADN y un dominio activador de la transcripción, tal como se describe por ejemplo en el documento WO 96/06166.

10 Una posibilidad adicional para incrementar la actividad y el contenido de genes endógenos es aumentar los factores de transcripción implicados en la transcripción de los genes endógenos, por ejemplo por medio de la sobreexpresión. Las medidas para sobreexpresar factores de transcripción son conocidas por la persona experta en la técnica.

15 La expresión de enzimas endógenas tales como aquellas de la Tabla 1 se puede regular, por ejemplo, vía la expresión de aptámeros que se unen específicamente a las secuencias promotoras de los genes. Dependiendo de la unión del aptámero a regiones promotoras estimulantes o represoras, se puede incrementar, por ejemplo, la cantidad de las enzimas de la Tabla 1.

Además, una alteración de la actividad de genes endógenos se puede lograr mediante mutagénesis dirigida de las copias de genes endógenos.

20 Una alteración de los genes endógenos que codifican las enzimas de por ejemplo la Tabla 1 también se puede lograr influyendo en las modificaciones post-traduccionales de las enzimas. Esto puede ocurrir, por ejemplo, regulando la actividad de enzimas como cinasas o fosfatasas implicadas en la modificación post-traducciona de las enzimas, por medio de medidas correspondientes como sobreexpresión o silenciamiento génico.

25 En otra realización, se puede mejorar la eficiencia de una enzima, o se puede destruir su región de control alostérico, de manera que se evita la inhibición por retroalimentación de la producción del compuesto. De forma similar, una enzima degradativa se puede suprimir o modificar mediante sustitución, supresión, o adición, de manera que su actividad degradativa se reduzca para la enzima deseada de la Tabla 1 sin alterar la viabilidad de la célula. En cada caso, se incrementará el rendimiento global, velocidad de producción, o cantidad de metionina.

Estas estrategias mencionadas anteriormente para incrementar o introducir la cantidad y/o actividad de las enzimas de la Tabla 1 no quieren ser limitantes; las variaciones de estas estrategias serán fácilmente manifiestas para aquel de pericia normal en la técnica.

30 Reduciendo la cantidad y o actividad de enzimas

Se ha expuesto anteriormente que se puede preferir usar un organismo de partida que ya se haya manipulado mediante ingeniería para la producción de metionina. En *C. glutamicum*, por ejemplo, se puede disminuir la actividad de *metQ*.

Para reducir la cantidad y/o actividad de enzimas, existen diversas estrategias.

35 La expresión de enzimas endógenas tales como aquellas de la Tabla 1 se puede regular por ejemplo vía la expresión de aptámeros que se une específicamente a las secuencias promotoras de los genes. Dependiendo de la unión del aptámero a regiones promotoras estimulantes o represoras, se puede reducir por ejemplo la cantidad y de este modo, en este caso, la actividad de las enzimas de la Tabla 1.

40 Los aptámeros también se pueden diseñar de una manera para unirse específicamente a las propias enzimas y para reducir la actividad de las enzimas mediante, por ejemplo, la unión al centro catalítico de las enzimas respectivas. La expresión de aptámeros se logra habitualmente mediante sobreexpresión a base de vectores (véase anteriormente), y, así como el diseño y la selección de aptámeros, es bien conocida por la persona experta en la técnica (Famulok et al., (1999) Curr Top Microbiol Immunol., 243,123-36).

45 Además, una disminución de la cantidad y de la actividad de las enzimas endógenas de la Tabla 1 se puede lograr por medio de diversas medidas experimentales, que son bien conocidas por la persona experta en la técnica. Estas medidas se resumen habitualmente bajo la expresión "silenciamiento génico". Por ejemplo, la expresión de un gen endógeno se puede silenciar transfiriendo un vector mencionado anteriormente, que tiene una secuencia de ADN que codifica la enzima o partes de la misma en orden antisentido, a organismos tales como *C. glutamicum*. Esto se basa en el hecho de que la transcripción de tal vector en la célula conduce a un ARN, que se puede hibridar con el ARNm transcrito por el gen endógeno, y por lo tanto evita su traducción.

50 En principio, la estrategia antisentido se puede acoplar con un método de ribozima. Las ribozimas son secuencias de ARN catalíticamente activas, que, si se acoplan a las secuencias antisentido, escinden catalíticamente las secuencias diana (Tanner et al., (1999) FEMS Microbiol Rev. 23 (3), 257-75). Esto puede potenciar la eficiencia de una estrategia antisentido.

Para crear un microorganismo recombinante homólogo, se prepara un vector que contiene al menos una porción de gen que codifica una enzima de la Tabla 1 en el que se ha introducido una supresión, adición o sustitución para alterar de ese modo, por ejemplo interrumpir funcionalmente, el gen endógeno.

5 En una realización, el vector se diseña de manera que, con la recombinación homóloga, se interrumpa funcionalmente el gen endógeno (es decir, ya no codifica una proteína funcional). Como alternativa, el vector se puede diseñar de manera que, con la recombinación homóloga, se mute o se altere de otro modo el gen endógeno, pero todavía codifica proteína funcional; por ejemplo, la región reguladora en dirección 5' se puede alterar para alterar de ese modo la expresión de las enzimas endógenas de la Tabla 1. Este enfoque puede tener la ventaja de que no se anula completamente la expresión de una enzima, pero se reduce hasta el nivel mínimo requerido. La persona experta sabe qué vectores se pueden usar para sustituir o suprimir secuencias endógenas. Más abajo se proporciona una descripción específica para interrumpir secuencias cromosómicas en *C. glutamicum*.

Además, es posible la represión génica al reducir la cantidad de factores de transcripción.

15 También se pueden introducir en una célula factores que inhiben a la propia proteína diana. Los factores que se unen a la proteína pueden ser, por ejemplo, los aptámeros mencionados anteriormente (Famulok et al., (1999) Curr Top Microbiol Immunol. 243, 123-36).

20 Como factores adicionales que se unen a la proteína, cuya expresión puede provocar una reducción de la cantidad y/o de la actividad de las enzimas de la tabla 1, se pueden considerar anticuerpos específicos de las enzimas. La producción de anticuerpos recombinantes específicos de las enzimas, tales como anticuerpos monocatenarios, es conocido en la técnica. La expresión de anticuerpos es también conocida en la bibliografía (Fiedler et al., (1997) Immunotechnolgy 3, 205-216; Maynard y Georgiou (2000) Annu. Rev. Biomed. Eng. 2, 339-76).

25 Las técnicas mencionadas son bien conocidas por la persona experta en la técnica. Por lo tanto, el experto conoce también el tamaño típico que debe tener un constructo de ácido nucleico usado por ejemplo para métodos antisentido, y qué complementariedad, homología o identidad deben tener las secuencias de ácido nucleico respectivas. Los términos complementariedad, homología e identidad son conocidos por la persona experta en la técnica.

30 El término complementariedad describe la capacidad de una molécula de ácido nucleico para hibridarse con otra molécula de ácido nucleico debido a enlaces de hidrógeno entre dos bases complementarias. La persona experta en la técnica sabe que dos moléculas de ácido nucleico no tienen que presentar una complementariedad de 100% a fin de ser capaces de hibridarse entre sí. Una secuencia de ácido nucleico, que se va a hibridar con otra secuencia de ácido nucleico, es preferiblemente al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, particularmente preferido al menos 80%, también particularmente preferido al menos 90%, en particular preferido al menos 95%, y lo más preferible al menos 98 ó 100%, respectivamente, complementaria con dicha otra secuencia de ácido nucleico.

35 La hibridación de una secuencia antisentido con una secuencia de ARNm endógena ocurre típicamente *in vivo* en condiciones celulares o *in vitro*. Según la presente invención, la hibridación se lleva a cabo *in vivo* o *in vitro* en condiciones que son suficientemente restrictivas para asegurar una hibridación específica.

40 Las condiciones de hibridación *in vitro* restrictivas son conocidas por la persona experta en la técnica, y se pueden tomar de la bibliografía (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press (2001)). La expresión "hibridación específica" se refiere al caso en el que una molécula se une preferentemente a cierta secuencia de ácido nucleico en condiciones restrictivas, si esta secuencia de ácido nucleico es parte de una mezcla compleja de por ejemplo moléculas de ADN o ARN.

La expresión "condiciones restrictivas" se refiere por lo tanto a condiciones bajo las cuales una secuencia de ácido nucleico se une preferentemente a una secuencia diana, pero no, o al menos hasta un grado significativamente reducido, a otras secuencias.

45 Las condiciones restrictivas dependen de las circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a mayores temperaturas. En general, las condiciones restrictivas se escogen de manera que la temperatura de hibridación está a alrededor de 5°C por debajo del punto de fusión (T<sub>m</sub>) de la secuencia específica con una fuerza iónica definida y un valor de pH definido. T<sub>m</sub> es la temperatura (con un valor de pH definido, una fuerza iónica definida y una concentración de ácido nucleico definida) a la que el 50% de las moléculas, que son complementarias a una secuencia diana, se hibridan con dicha secuencia diana. Típicamente, las condiciones restrictivas comprenden concentraciones salinas entre 0,01 y 1,0 M de iones sodio (o iones de otra sal), y un valor de pH entre 7,0 y 8,3. La temperatura es al menos 30°C para moléculas cortas (por ejemplo, para tales moléculas que comprenden entre 10 y 50 ácidos nucleicos). Además, las condiciones restrictivas pueden comprender la adición de agentes desestabilizantes, como por ejemplo formamida. Los tampones típicos de hibridación y de lavado son de la siguiente composición.

## ES 2 517 394 T3

<i>Disolución de pre-hibridación:</i>	SDS al 0,5% 5x SSC NaPO <sub>4</sub> 50 mM, pH 6,8 pirofosfato de Na al 0,1% 5x reactivo de Denhardt 100 µg/esperma de salmón
<i>Disolución de hibridación:</i>	Disolución de pre-hibridación 1x10 <sup>6</sup> cpm/ml sonda (5-10 min. 95°C)
20x SSC	NaCl 3 M citrato sódico 0,3 M hasta pH 7 con HCl
50x reactivo de Denhardt:	5 g de Ficoll 5 g de polivinilpirolidona 5 g de seroalbúmina bovina hasta 500 ml A dest

Un procedimiento típico para la hibridación es como sigue

<i>Opcional:</i>	lavar la transferencia 30 min. en 1x SSC/ 0,1% SDS a 65°C		
<i>Pre-hibridación:</i>	al menos 2 h a 50-55°C		
<i>Hibridación:</i>	toda la noche a 55-60°C		
<i>Lavado:</i>	05 min.	2x SSC/ 0,1% SDS	
		Temperatura de hibridación	
	30 min	2x SSC/0,1% SDS	
		Temperatura de hibridación	
	30 min	1x SSC/0,1% SDS	
		Temperatura de hibridación	
	45 min	0,2x SSC/0,1% SDS	65°C
	5 min	0,1x SSC	temperatura ambiente

Para los fines antisentido, puede ser suficiente una complementariedad a lo largo de las longitudes de secuencia de 100 ácidos nucleicos, 80 ácidos nucleicos, 60 ácidos nucleicos, 40 ácidos nucleicos, y 20 ácidos nucleicos. Ciertamente también serán suficientes longitudes más largas de ácidos nucleicos. También es concebible una aplicación combinada de los métodos mencionados anteriormente.

- 5 Si, según la presente invención, se usan secuencias de ADN, que están enlazadas operativamente en orientación 5'-3' a un promotor activo en el organismo, se pueden construir en general vectores que, después de la transferencia a las células del organismo, permiten la sobreexpresión de la secuencia codificante o provocan la supresión o competición y bloqueo de secuencias de ácido nucleico endógenas y las proteínas expresadas a partir de ellas, respectivamente.
- 10 La actividad de una enzima particular también se puede reducir sobreexpresando un mutante no funcional de la misma en el organismo. De este modo, un mutante no funcional que no es capaz de catalizar la reacción en cuestión, pero que es capaz de unirse por ejemplo al sustrato o cofactor, puede, por medio de la sobreexpresión, superar a la enzima endógena y por lo tanto inhibir la reacción. Otros métodos para reducir la cantidad y/o actividad de una enzima en una célula hospedante son bien conocidos por la persona experta en la técnica.
- 15 Según la presente invención, las enzimas no funcionales tienen esencialmente las mismas secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos, respectivamente, que las enzimas funcionales y sus fragmentos funcionales, pero tienen, en algunas posiciones, mutaciones de punto, inserciones o supresiones de ácidos nucleicos o aminoácidos, que tienen el efecto de que la enzima no funcional no sea capaz, o solamente sea capaz en un grado muy limitado, de catalizar la reacción respectiva. Estas enzimas no funcionales se pueden entremezclar con enzimas que todavía son capaces de catalizar la reacción respectiva, pero que ya no están reguladas por retroalimentación.
- 20 Según la presente invención, la expresión "enzima no funcional" no comprende tales proteínas que no tienen homología de secuencias sustancial con las enzimas funcionales respectivas a nivel de aminoácidos y a nivel de ácidos nucleicos, respectivamente. Las proteínas incapaces de catalizar las reacciones respectivas y que no tienen homología de secuencias sustancial con la enzima respectiva no están por lo tanto, por definición, abarcadas por la expresión "enzima no funcional" de la presente invención. Las enzimas no funcionales también se denominan,
- 25 dentro del alcance de la presente invención, como enzimas inactivadas o inactivas.

Por lo tanto, las enzimas no funcionales de por ejemplo la Tabla 1 según la presente invención, que poseen las mutaciones de punto, inserciones, y/o supresiones mencionadas anteriormente, se caracterizan por una homología de secuencias sustancial con las enzimas de tipo salvaje de por ejemplo la Tabla 1 según la presente invención, o sus partes funcionalmente equivalentes. Para determinar una homología de secuencias sustancial, se han de aplicar los grados de identidad descritos anteriormente.

30

#### Vectores y células hospedantes

Se describen aquí vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen secuencias de ácido nucleico modificadas como se menciona anteriormente. Como se usa aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado.

35

Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral.

40 Ciertos vectores son capaces de replicarse autónomamente en una célula hospedante en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación, y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) se integran en el genoma de una célula hospedante al introducirlos en la célula hospedante, y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedante. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se enlazan operativamente.

Tales vectores se denominan aquí como "vectores de expresión".

45 En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar de forma intercambiable, ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos en la replicación, adenovirus, y virus adenoasociados), que tienen funciones equivalentes.

50 Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender un ácido nucleico modificado como se menciona anteriormente en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico respectivo en una célula hospedante, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en base a las células hospedantes a usar para la expresión, que está enlazado operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar.

55 Dentro de un vector de expresión recombinante, "enlazado operablemente" pretende significar que la secuencia de ácido nucleico de interés está enlazada a la secuencia o secuencias reguladoras de una manera que permite la

expresión de la secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción in vitro, o en una célula hospedante cuando el vector se introduce en la célula hospedante). La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, sitios de unión represores, sitios de unión activadores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, terminadores, señales de poliadenilación, u otros elementos de la estructura secundaria del ARNm). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de ácido nucleico en muchos tipos de célula hospedante, y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de ácido nucleico solamente en ciertas células hospedantes. Las secuencias reguladoras preferidas son, por ejemplo, promotores tales como *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-*, *tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacIq-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*, *arny*, *SP02*,  $\lambda$ <sub>PR</sub> de fago,  $\lambda$ <sub>PL</sub> de fago, *SP01 P<sub>15</sub>* de fago, *SP01 P<sub>26</sub>* de fago, *pSOD*, *EFTu*, *EFTs*, *GroEL*, *MetZ* (5 últimos de *C. glutamicum*), que se usan preferiblemente en bacterias. Las secuencias reguladoras adicionales son, por ejemplo, promotores procedentes de levaduras y hongos, tales como *ADC1*, *MFA*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH*, *ENO2*, promotores procedentes de plantas tales como *CaMV/35S*, *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, nos o promotores de ubiquitina o faseolina. También es posible usar promotores artificiales. Aquel de pericia normal en la técnica apreciará que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedante a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión se pueden introducir en células hospedantes para producir de ese modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por las secuencias de ácido nucleico modificadas mencionadas anteriormente.

La expresión de proteínas en procariotas se lleva a cabo muy a menudo con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no de fusión.

Los vectores de fusión añaden un número de aminoácidos a una proteína codificada en ellos, habitualmente al término amino de la proteína recombinante, pero también al término C, o fusionados con regiones adecuadas en las proteínas. Tales vectores de fusión sirven típicamente a cuatro fines: 1) incrementar la expresión de proteína recombinante; 2) incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar a la purificación de la proteína recombinante al actuar como un ligando en la purificación por afinidad; 4) proporcionar una "etiqueta" para la detección posterior de la proteína. A menudo, en vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante, para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión tras la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognadas, incluyen Factor Xa, trombina y enterocinasa.

Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen *pGEX* (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. y Johnson, K. S. (1988) Gene 67: 31-40), *pMAL* (New England Biolabs, Beverly, MA) y *pRIT5* (Pharmacia, Piscataway, NJ) que se fusiona a glutatión S-transferasa (*GST*), proteína de unión a maltosa *E*, o proteína *A*, respectivamente.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* no de fusión inducibles adecuados incluyen *pTrc* (Amann et al., (1988) Gene 69: 301-315), *pLG338*, *pACYC184*, *pBR322*, *pUC18*, *pUC19*, *pKC30*, *pRep4*, *pHSI*, *pHS2*, *pPLc236*, *pMBL24*, *pLG200*, *pUR290*, *pIN-III113-B1*, *egtlI*, *pBdCl*, y *pET 11d* (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; y Pouwels et al., eds. (1985) Cloning Vectors. Elsevier: Nueva York ISBN 0 444 904018). La expresión del gen diana a partir del vector *pTrc* se basa en la transcripción de ARN polimerasa del hospedante a partir de un promotor de fusión *trp-lac* híbrido. La expresión del gen diana a partir del vector *pET 11d* se basa en la transcripción a partir de un promotor de fusión *T7 gnIO-lac* mediada por una ARN polimerasa viral coexpresada (*T7gnl*). Esta polimerasa viral se suministra por las cepas hospedantes *BL21 (DE3)* o *HMS 174 (DE3)* de un profago X residente que posee un gen *T7gnl* bajo el control transcripcional del promotor *lacUV 5*. Para la transformación de otras variedades de bacterias, se pueden seleccionar vectores apropiados. Por ejemplo, se sabe que los plásmidos *pIJ101*, *pIJ364*, *pIJ702* y *pIJ361* son útiles en la transformación de *Streptomyces*, mientras que los plásmidos *pUB110*, *pC 194* o *pBD214* son adecuados para la transformación de la especie *Bacillus*. Varios plásmidos de uso en la transferencia de información genética a *Corynebacterium* incluyen *pHM1519*, *pBL1*, *pSA77* o *pAJ667* (Pouwels et al., eds. (1985) Cloning Vectors. Elsevier: Nueva York ISBN 0 444 904018).

Los ejemplos de vectores lanzadera de *C. glutamicum* y de *E. coli* adecuados son, por ejemplo, *pClik5aMCS* (documento WO2005059093), o se pueden encontrar en Eikmanns et al (Gene. (1991) 102, 93-8).

Los ejemplos de vectores adecuados para manipular corinebacterias se pueden encontrar en el Handbook of Corynebacterium (editado por Eggeling y Bott, ISBN 0-8493-1821-1, 2005). Se puede encontrar una lista de vectores lanzadera de *E. coli* - *C. glutamicum* (tabla 23.1), una lista de vectores de expresión lanzadera de *E. coli* - *C. glutamicum* (tabla 23.2), una lista de vectores que se puede usar para la integración de ADN en el cromosoma de *C. glutamicum* (tabla 23.3), una lista de vectores de expresión para la integración en el cromosoma de *C. glutamicum* (tabla 23.4.) así como una lista de vectores para la integración en el cromosoma de *C. glutamicum* específica del sitio (tabla 23.6).

Como alternativa, el vector de expresión de proteína es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen *pYepSecl* (Baldari, et al., (1987) Embo J. 6: 229-234), *2i*, *pAG-1*, *Yep6*, *Yep13*, *pEMBLYe23*, *pMFA* (Kurjan y Herskowitz, (1982) Cell 30: 933-943), *pJRY88* (Schultz et al.,

(1987) Gene 54: 113-123), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los vectores y métodos para la construcción de vectores apropiados para uso en otros hongos, tales como los hongos filamentosos, incluyen aquellos detallados en: van den Hondel, C. A. M. J. J. y Punt, P. J. (1991) en: Applied Molecular Genetics of Fungi, J. F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, y Pouwels et al., eds. (1985) Cloning Vectors. Elsevier: Nueva York (ISBN 0 444 904018).

Se entiende que un enlace operativo es la disposición secuencial de promotor, secuencia codificante, terminador y, opcionalmente, elementos reguladores adicionales, de tal manera que cada uno de los elementos reguladores puede cumplir su función, según su determinación, cuando se expresa la secuencia codificante.

Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, véanse los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2003.

El ADN del vector se puede introducir en el procarionta vía técnicas de transformación o transfección convencionales. Como se usa aquí, los términos “transformación” y “transfección”, “conjugación” y “transducción” pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN o ARN lineal (por ejemplo, un vector linealizado o un constructo génico solo sin un vector), o ácido nucleico en forma de un vector (por ejemplo, un plásmido, fago, fásmido, fagómido, transposón u otro ADN en una célula hospedante, incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, competencia natural, transferencia mediada químicamente, o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedantes se pueden encontrar en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2003), y otros manuales de laboratorio.

A fin de identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células hospedantes, junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como, pero sin limitarse a, G418, higromicina, canamicina, tetraciclina, neomicina, ampicilina (y otras penicilinas), cefalosporinas, fluoroquinonas, ácido naladixico, cloranfenicol, espectinomomicina, eritromicina, estreptomomicina y metotrexato. Otros marcadores seleccionables incluyen genes de tipo salvaje que pueden complementar versiones mutadas del gen equivalente en una cepa hospedante o de partida. Por ejemplo, un gen esencial para el crecimiento en un medio mínimo, tal como *serA*, se puede mutar o suprimir del genoma de una cepa de partida u hospedante de *C. glutamicum* de la invención como se describe aquí anteriormente, para crear un auxótrofo de serina. Después, se puede usar un vector que contiene una copia de tipo salvaje u otra copia funcional de un gen *serA* para seleccionar transformantes o integrantes. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable se puede introducir en una célula hospedante en el mismo vector que aquel que codifica las secuencias de ácido nucleico modificadas mencionadas anteriormente, o se puede introducir en un vector distinto. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido se pueden identificar mediante selección con fármacos (por ejemplo, células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Cuando se usan plásmidos sin un origen de replicación y dos genes marcadores diferentes (por ejemplo pClik int sacB), también es posible generar cepas libres de marcadores que tienen insertado en el genoma parte del inserto. Esto se logra mediante dos sucesos consecutivos de recombinación homóloga (véase también Becker et al., Applied and Environmental Microbiology, 71 (12), p. 8587-8596). La secuencia del plásmido pClik int sacB se puede encontrar en el documento WO2005059093; SEC ID 24; en este documento, el plásmido se denomina pCIS.

Como alternativa, se pueden producir microorganismos recombinantes que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del gen introducido. Por ejemplo, la inclusión de una de las secuencias de ácido nucleico mencionadas anteriormente en un vector al colocarla bajo el control del operón lac permite la expresión del gen solamente en presencia de IPTG. Tales sistemas reguladores son bien conocidos en la técnica.

También se describen organismos o células hospedantes en los que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Las expresiones “célula hospedante” y “célula hospedante recombinante” se usan aquí de forma intercambiable. Se entiende que tales expresiones se refieren no sólo a la célula objeto particular sino también a la progenie o progenie potencial de tal célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias medioambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula progenitora, pero todavía se incluye dentro del alcance de la expresión como se usa aquí.

#### Crecimiento de *E. coli* y *C. glutamicum* – Medios y condiciones de cultivo

La persona experta en la técnica está familiarizada con el cultivo de microorganismos habituales tales como *C. glutamicum* y *E. coli*. De este modo, más abajo se dará una enseñanza general en cuanto al cultivo de *C. glutamicum*. La información correspondiente se puede recuperar de libros de texto estándar para el cultivo de *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* se hacen crecer habitualmente en caldo MB y LB, respectivamente (Follettie et al. (1993) J. Bacteriol. 175, 4096-4103). Varios medios mínimos para bacterias, incluyendo *E. coli* y *C. glutamicum*, son bien conocidos en la técnica. Los medios mínimos para *E. coli* incluyen, pero no se limitan a, medio E, medio M9 y MCGC

modificado (Yoshihama et al. (1985) J. Bacteriol. 162,591-507), respectivamente. Se puede añadir glucosa a una concentración final de entre alrededor de 0,2% y 1%. Se pueden añadir antibióticos en las siguientes cantidades (microgramos por mililitro): ampicilina, 5 a 1000; kanamicina, 25; ácido nalidíxico, 25; cloranfenicol, 5 a 120, espectinomicina 50 a 100, tetraciclina 5 a 120. Se pueden añadir aminoácidos, vitaminas, y otros suplementos, por ejemplo, en las siguientes cantidades: metionina, 9,3 mM; arginina, 9,3 mM; histidina, 9,3 mM; tiamina, 0,05 mM. Las células de *E. coli* se hacen crecer de forma habitual a 18 a 37 44°C, respectivamente, dependiendo del experimento o procedimiento particular que se esté realizando.

Las *Corynebacteria* genéticamente modificadas se cultivan típicamente en medios de crecimiento sintéticos o naturales. Un número de medios de crecimiento diferentes para *Corynebacteria* son tanto bien conocidos como fácilmente disponibles (Lieb et al. (1989) Appl. Microbiol. Biotechnol., 32: 205-210; von der Osten et al. (1998) Biotechnology Letters, 11: 11-16; patente DE 4.120.867; Liebl (1992) "The Genus Corynebacterium, en: The Prokaryotes, Volumen II, Balows, A. et al., eds. Springer-Verlag). También se pueden encontrar instrucciones en el Handbook of Corynebacterium (editado por Eggeling y Bott, ISBN 0-8493-1821-1, 2005).

Estos medios consisten en una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y oligoelementos. Las fuentes de carbono preferidas son azúcares, tales como mono-, di- o polisacáridos. Por ejemplo, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribosa, lactosa, maltosa, sacarosa, glicerol, rafinosa, almidón o celulosa sirven como fuentes de carbono muy buenas.

También es posible suministrar azúcar a los medios vía compuestos complejos tales como molasas u otros subproductos del refinado del azúcar. También puede ser ventajoso suministrar mezclas de diferentes fuentes de carbono. Otras fuentes de carbono posibles son alcoholes y ácidos orgánicos, tales como metanol, etanol, ácido acético o ácido láctico. Las fuentes de nitrógeno son habitualmente compuestos nitrogenados orgánicos o inorgánicos, o materiales que contienen estos compuestos. Las fuentes de nitrógeno ejemplares incluyen amoníaco gaseoso o sales de amoníaco, tales como NH<sub>4</sub>Cl o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>OH, nitratos, urea, aminoácidos, o fuentes de nitrógeno complejas como licor de maceración del maíz, harina de haba de soja, proteína de haba de soja, extracto de levadura, extracto de carne, y otros.

La sobreproducción de metionina es posible usando diferentes fuentes de azufre. Se pueden usar sulfatos, tiosulfatos, sulfitos, y también fuentes de azufre más reducido, como H<sub>2</sub>S y sulfuros, y derivados. Para lograr la producción eficiente de metionina, se pueden usar también fuentes de azufre orgánico, como metilmercaptano, tioglicolatos, tiocianatos, y tiourea, aminoácidos que contienen azufre, como cisteína, y otros compuestos que contienen azufre. También puede ser posible el formiato como suplemento, como lo son otras fuentes de C1 tales como metanol o formaldehído.

Los compuestos de sales inorgánicas que se pueden incluir en los medios incluyen las sales de cloruro, fosforosas o de sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, cinc, cobre y hierro. Se pueden añadir compuestos quelantes al medio, para mantener a los iones metálicos en disolución. Los compuestos quelantes particularmente útiles incluyen dihidroxifenoles, como catecol o protocatecuato, o ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico. Es típico que los medios también contengan otros factores de crecimiento, tales como vitaminas o promotores del crecimiento, cuyos ejemplos incluyen cianocobalamina (u otra forma de vitamina B12), biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y las sales se originan frecuentemente a partir de componentes de medios complejos tales como extracto de levadura, molasas, licor de maceración del maíz, y otros. La composición exacta de los compuestos de los medios depende fuertemente del experimento inmediato, y se decide individualmente para cada caso específico. En el libro de texto "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach (Eds. P. M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) p. 53-73, ISBN 0 19 963577 3) existe información sobre la optimización de los medios. También es posible seleccionar medios de crecimiento a partir de proveedores comerciales, como standar 1 (Merck) o BHI (infusión de corazón de grano, DIFCO), u otros.

Todos los componentes del medio se deberían estabilizar, ya sea por calor (20 minutos a 1,5 bares y 121 C) o mediante filtración estéril. Los componentes se pueden esterilizar juntos o, si es necesario, separadamente.

Todos los componentes de los medios pueden estar presentes al comienzo del crecimiento, o se pueden añadir opcionalmente de forma continua o por lotes. Las condiciones de cultivo se definen separadamente para cada experimento.

La temperatura debería estar habitualmente en un intervalo entre 15°C y 45°C, pero el intervalo puede ser mayor, hasta 105°C para organismos termófilos. La temperatura se puede mantener constante, o se puede alterar durante el experimento. El pH del medio puede estar en el intervalo de 5 a 8,5, preferiblemente alrededor de 7,0, y se puede mantener mediante la adición de tampones a los medios. Un tampón ejemplar para este fin es un tampón de fosfato de potasio. Como alternativa o simultáneamente, se pueden usar tampones sintéticos tales como MOPS, HEPES, ACES, y otros. También es posible mantener un pH de cultivo constante a través de la adición de un ácido o base, tal como ácido acético, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, NaOH, KOH o NH<sub>4</sub>OH, durante el crecimiento. Si se utilizan componentes del medio complejos, tales como extracto de levadura, se puede reducir la necesidad de tampones adicionales, debido al hecho de que muchos compuestos complejos tienen capacidades tamponantes elevadas. Si

se utiliza un fermentador para cultivar los microorganismos, el pH se puede controlar también usando amoníaco gaseoso.

5 El tiempo de incubación está habitualmente en un intervalo desde varias horas a varios días. Este tiempo se selecciona a fin de permitir que se acumule la cantidad máxima de producto en el caldo. Los experimentos de crecimiento descritos se pueden llevar a cabo en una variedad de vasijas, tales como placas de microtitulación, tubos de vidrio, matraces de vidrio, o fermentadores de vidrio o metálicos de diferentes tamaños. Para el cribado de un gran número de clones, los microorganismos se deberían de cultivar en placas de microtitulación, tubos de vidrio o matraces de agitación, ya sea con o sin deflectores. Preferiblemente, se usan matraces de agitación de 100 ó 250 ml, llenos con alrededor de 10% (en volumen) del medio de crecimiento requerido. Los matraces se deberían de agitar en un agitador giratorio (amplitud de alrededor de 25 mm) usando un intervalo de velocidades de alrededor de 100-300 rpm. Las pérdidas por evaporación se pueden reducir mediante el mantenimiento de una atmósfera húmeda; como alternativa, se debería realizar una corrección matemática para las pérdidas por evaporación.

15 Si se ensayan clones genéticamente modificados, también se debería ensayar un clon de control sin modificar, o un clon de control que contiene el plásmido básico sin ningún inserto. El medio se inocula hasta una OD600 de 0,5-1,5 usando células que se hacen crecer en placas de agar, tales como placas CM (10 g/l de glucosa, 2,5 g/l de NaCl, 2 g/l de urea, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de extracto de carne, 22 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g/l de urea, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de extracto de carne, 22 g/l de agar, pH alrededor de 6,8 a 7,2 con NaOH 2M) que se han incubado a 30°C. La inoculación de los medios se logra mediante introducción de una suspensión salina de células de *C. glutamicum* a partir de placas CM, o mediante adición de un precultivo líquido de esta bacteria.

#### 20 Métodos generales

En Handbook on *Corynebacterium glutamicum*, (2005) eds.: L. Eggeling, M. Bott., Boca Raton, CRC Press, at Martin et al. (Biotechnology (1987) 5, 137-146 ), Guerrero et al. (Gene (1994), 138, 35-41), Tsuchiya y Morinaga (Biotechnology (1988), 6, 428-430), Eikmanns et al. (Gene (1991), 102, 93-98), documento EP 0.472.869, US 4.601.893, Schwarzer y Pühler (Biotechnology (1991), 9, 84-87, Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology (1994), 60,126-132), LaBarre et al (Journal of Bacteriology (1993), 175, 1001-1007), documento WO 96/15246, Malumbres et al. (Gene (1993), 134, 15-24), en documento JP-A-10-229891, en Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering (1998), 58,191-195), Makrides (Microbiological Reviews (1996), 60, 512-538), y en libros de texto bien conocidos de biología genética y molecular, se pueden encontrar protocolos para métodos generales.

#### 30 Cepas, medios y plásmidos

Las cepas se pueden tomar, por ejemplo, pero sin limitarse a, de la siguiente lista

- Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032,
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806,
- 35 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870,
- Corynebacterium thermoaminognes* FERM BP-1539,
- Corynebacterium melassecola* ATCC 17965,
- Brevibacterium flavum* ATCC 14067,
- Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, y
- 40 *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020

o cepas que han derivado de ellas tales como

- Corynebacterium glutamicum* KFCC10065, DSM 17322 o
- Corynebacterium glutamicum* ATCC21608
- Corynebacterium efficiens* DSMZ44547, 44548, 44549

#### 45 Tecnología de ADN recombinante

En Sambrook, J, Fritsch, E F, y Maniatis, T, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3, y en Handbook on *Corynebacterium glutamicum* (2005) eds. L. Eggeling, M. Bott, Boca Raton, CRC Press, se pueden encontrar protocolos.

Quantificación de aminoácidos e intermedios de metionina

El análisis se realizó mediante HPLC (Agilent 1100, Agilent, Waldbronn, Alemania) con un cartucho de guarda y una columna Synergi 4  $\mu\text{m}$  (MAX-RP 80 Å, 150 \* 4 6 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania). Antes de la inyección, los analitos se derivatizaron usando o-ftaldialdehído (OPA) y mercaptoetanol como agente reductor (2-MCE). Adicionalmente, los grupos sulfhidrilo se bloquearon con ácido yodoacético. La separación se lleva a cabo a un caudal de 1 ml/min. usando 40 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (eluyente A, pH = 7,8, ajustado con NaOH) como fase polar, y una mezcla de metanol con agua (100/1) como fase no polar (eluyente B). Se aplica el siguiente gradiente: comienzo 0% de B; 39 min. 39% de B; 70 min. 64% de B; 100% de B durante 3,5 min.; 2 min. 0% de B para el equilibrio. La derivatización a temperatura ambiente se automatiza como se describe más abajo. Inicialmente, se mezclan 0,5  $\mu\text{l}$  de 2-MCE al 0,5% en bicina (0,5M, pH 8,5) con 0,5  $\mu\text{l}$  de extracto celular. Subsiguientemente, se añaden 1,5  $\mu\text{l}$  de ácido yodoacético 50 mg/ml en bicina (0,5 M, pH 8,5), seguido de la adición de 2,5  $\mu\text{l}$  de tampón de bicina (0,5 M, pH 8,5). La derivatización se realiza añadiendo 0,5  $\mu\text{l}$  de reactivo OPA 10 mg/ml disuelto en 1/45/54 v/v/v de 2-MCE/MeOH/bicina (0,5 M, pH 8,5). Finalmente, la mezcla se diluye con 32  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Entre cada una de las etapas de pipeteado anteriores, hay un tiempo de espera de 1 min. Entonces se inyecta en la columna un volumen total de 37  $\mu\text{l}$ . Obsérvese que los resultados analíticos se pueden mejorar significativamente si la aguja automuestreadora se limpia periódicamente durante (por ejemplo dentro del tiempo de espera) y después de la separación de la muestra. La detección se lleva a cabo mediante un detector de fluorescencia (excitación 340 nm, emisión 450 nm, Agilent, Waldbronn, Alemania). Para la cuantificación, se usa ácido  $\alpha$ -aminobutírico (ABA) como patrón interno.

#### Definición del protocolo de recombinación

En lo siguiente se describirá cómo se puede construir una cepa de *C. glutamicum* con mayor eficiencia de producción de metionina implementando los hallazgos de las predicciones anteriores. Antes de que se describa la construcción de la cepa, se da una definición de un suceso/protocolo de recombinación, que se usará en lo siguiente.

“Campbell in”, como se usa aquí, se refiere a un transformante de una célula hospedante original en la que se ha integrado en un cromosoma una molécula de ADN bicatenario circular completa (por ejemplo, un plásmido que se basa en pCLIK int sacB) mediante un suceso de recombinación homóloga individual (un suceso *cross-in*), y que da eficazmente como resultado la inserción de una versión linealizada de dicha molécula de ADN circular en una primera secuencia de ADN del cromosoma que es homóloga a una primera secuencia de ADN de la mencionada molécula de ADN circular. “Campbelled in”, se refiere a la secuencia de ADN linealizada que se ha integrado en el cromosoma de un transformante “Campbell in”. Un “Campbell in” contiene una duplicación de la primera secuencia de ADN homóloga, cada copia de la cual incluye y rodea a una copia del punto de intercambio genético de recombinación homóloga. El nombre procede del Profesor Alan Campbell, quien propuso primeramente este tipo de recombinación.

“Campbell out”, como se usa aquí, se refiere a una célula que desciende de un transformante “Campbell in”, en la que se ha producido un segundo suceso de recombinación homóloga (un suceso de *cross out*) entre una segunda secuencia de ADN que está contenida en el ADN insertado linealizado del ADN “Campbelled in”, y una segunda secuencia de ADN de origen cromosómico, que es homóloga a la segunda secuencia de ADN de dicho inserto linealizado, dando el segundo suceso de recombinación como resultado la supresión (el descarte) de una porción de la secuencia de ADN integrada, pero, de forma importante, dando también como resultado que una porción (esta puede ser tan pequeña como una única base) del ADN Campbelled in integrado permanezca en el cromosoma, de manera que, comparada con la célula hospedante original, la célula “Campbell out” contiene uno o más cambios intencionados en el cromosoma (por ejemplo, una única sustitución de una base, múltiples sustituciones de bases, inserción de un gen o secuencia de ADN heteróloga, inserción de una copia o copias adicionales de un gen homólogo o de un gen homólogo modificado, o inserción de una secuencia de ADN que comprende más de uno de estos ejemplos mencionados anteriormente enumerados anteriormente).

Una célula o cepa “Campbell out” se obtiene habitualmente, pero no necesariamente, mediante una contraselección frente a un gen que está contenido en una porción (la porción que se desea descartar) de la secuencia de ADN “Campbelled in”, por ejemplo el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que es letal cuando se expresa en una célula que se hace crecer en presencia de alrededor de 5% a 10% de sacarosa. Ya sea con o sin una contraselección, una célula “Campbell out” deseada se puede obtener o identificar cribando la célula deseada, usando cualquier fenotipo cribable, tal como, pero sin limitarse a, morfología de la colonia, color de la colonia, presencia o ausencia de resistencia a antibióticos, presencia o ausencia de una secuencia de ADN dada mediante reacción en cadena de la polimerasa, presencia o ausencia de una auxotrofia, presencia o ausencia de una enzima, hibridación de ácidos nucleicos de la colonia, cribado con anticuerpos, etc. Las expresiones “Campbell in” y “Campbell out” también se pueden usar como verbos en diversos tiempos para referirse al método o procedimiento descrito anteriormente.

Se entiende que los sucesos de recombinación homóloga que conducen a un “Campbell in” o “Campbell out” pueden ocurrir a lo largo de un intervalo de bases de ADN dentro de la secuencia de ADN homóloga, y puesto que las secuencias homólogas serán idénticas entre sí para al menos parte de este intervalo, habitualmente no es posible especificar exactamente dónde se produjo el suceso de intercambio genético. En otras palabras, no es posible especificar de forma precisa cuál secuencia procedió originalmente del ADN insertado, y cuál procedió originalmente del ADN cromosómico. Además, la primera secuencia de ADN homóloga y la segunda secuencia de ADN homóloga

están separadas habitualmente por una región de falta de homología parcial, y es esta región de falta de homología la que permanece depositada en un cromosoma de la célula “Campbell out”.

5 Por utilidad, en *C. glutamicum*, la primera y segunda secuencia de ADN homóloga típica tienen al menos alrededor de 200 pares de bases de longitud, y pueden tener hasta varios miles de pares de bases de longitud; sin embargo, se puede hacer que el procedimiento trabaje con secuencias más cortas o más largas. Por ejemplo, una longitud para las secuencias homólogas primera y segunda puede oscilar desde alrededor de 500 hasta 2000 bases, y la obtención de un “Campbell out” a partir de un “Campbell in” se facilita haciendo que las secuencias homólogas primera y segunda tengan aproximadamente la misma longitud, preferiblemente con una diferencia menor que 200 pares de bases, y muy preferiblemente, teniendo la más corta de las dos al menos 70% de la longitud de la más larga en pares de bases. El “método de Campbell in y out” se describe en el documento WO2007012078.

### Ejemplos

Los siguientes experimentos demuestran cómo la sobreexpresión de formiato-THF-sintetasa y gcvHTP así como *lipB* o *lpl* de *C. jeikeium* conduce a una mayor producción de metionina. Estos ejemplos sin embargo no pretenden limitar de ningún modo la invención.

#### 15 Experimentos con matraces de agitación y ensayo de HPLC

Se realizaron experimentos con matraces de agitación, con el medio de molasas estándar, con cepas por duplicado o cuadruplicado. El medio de molasas contenía, en un litro de medio: 40 g de glucosa; 60 g de molasas; 20 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 10 g de extracto de levadura (DIFCO); 5 ml de 400 mM de treonina; 2 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; y 50 g de  $\text{CaCO}_3$  (Riedel-de Haen), completando el volumen con  $\text{ddH}_2\text{O}$ . El pH se ajustó hasta 7,8 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 20%. Se añadieron 20 ml de medio agitado continuamente (a fin de mantener suspendido el  $\text{CaCO}_3$ ) a 250 ml de matraces de agitación Bellco con deflectores, y los matraces se sometieron a autoclave durante 20 min. Tras el autoclave, se añadieron 4 ml de “disolución 4B” por litro del medio base (u 80  $\mu\text{l}$ /matraz). La “disolución 4B” contenía por litro: 0,25 g de hidrocloreto de tiamina (vitamina B1), 50 mg de cianocobalamina (vitamina B12), 25 mg de biotina, 1,25 g de hidrocloreto de piridoxina (vitamina B6), y se tamponó con 12,5 mM de  $\text{KPO}_4$ , pH 7,0, para disolver la biotina, y se esterilizó mediante filtración. Los cultivos se hicieron crecer en matraces con deflectores cubiertos con papel Bioshield sujeto con bandas de caucho, durante alrededor de 48 horas a alrededor de 28°C o 30°C y a 200 ó 300 rpm en un agitador de suelo New Brunswick Scientific. Las muestras se tomaron típicamente a alrededor de 24 horas y/o alrededor de 48 horas. Las células se eliminaron mediante centrifugación, seguido de la dilución del sobrenadante con un volumen igual de 60% de acetonitrilo o 60% de etanol, y después filtrando con membrana la mezcla de la disolución usando columnas de giro Centricon 0,45  $\mu\text{m}$ . Los filtrados se evaluaron usando HPLC para determinar las concentraciones de metionina, glicina más homoserina, O-acetilhomoserina, treonina, isoleucina, lisina, y otros aminoácidos indicados.

Para el ensayo de HPLC, los sobrenadantes filtrados se diluyeron 1:100 con 1 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  filtrado con 0,45  $\mu\text{m}$ , y 1  $\mu\text{l}$  de la disolución se derivatizó con el reactivo OPA (AGILENT) en tampón de borato (80 mM de  $\text{NaBO}_3$ , 2,5 mM de EDTA, pH 10,2) y se inyectó en una columna 200 x 4,1 mm Hypersil 5 $\mu$  AA-ODS, que se hace correr en un HPLC Agilent serie 1100 equipada con un detector de fluorescencia G1321A (AGILENT). La longitud de onda de excitación fue 338 nm, y la longitud de onda de emisión monitorizada fue 425 nm. Las disoluciones patrón de aminoácidos se cromatografiaron y se usaron para determinar los tiempos de retención y las áreas de los picos estándar para los diversos aminoácidos. Para el control del instrumento, la adquisición de datos y la manipulación de datos, se usó Chem Station, el paquete de software adjunto proporcionado por Agilent. El hardware fue un ordenador HP Pentium 4 que soporta Microsoft Windows NT 4.0 actualizado con un Microsoft Service Pack (SP6a).

#### Experimento 1: Generación de la cepa M2014

La cepa de *C. glutamicum* ATCC 13032 se transformó con ADN A (también denominado como pH273) (SEC ID NO: 21) y se sometió a “Campbell in” para producir una cepa “Campbell in”. La cepa “Campbell in” se sometió entonces a “Campbell out” para producir una cepa “Campbell out”, M440, que contiene un gen que codifica una enzima homoserina deshidrogenasa resistente a retroalimentación ( $\text{hom}^{\text{fb}}$ ). La proteína de homoserina deshidrogenasa resultante incluyó un cambio de aminoácido en el que se cambió S393 a F393 (denominado *Hsdh* S393F).

La cepa M440 se transformó subsiguientemente con ADN B (también denominado como pH373) (SEC ID NO: 22) para producir una cepa “Campbell in”. La cepa “Campbell in” se sometió entonces a “Campbell out” para producir una cepa “Campbell out”, M603, que contiene un gen que codifica la enzima aspartato cinasa resistente a retroalimentación (*Ask<sup>fb</sup>*) (codificada por *lysC*). En la proteína de aspartato cinasa resultante, T311 se cambió a I311 (denominado *LysC* T311I).

Se encontró que la cepa M603 produjo alrededor de 17,4 mM de lisina, mientras que la cepa ATCC13032 no produjo ninguna cantidad medible de lisina. Adicionalmente, la cepa M603 produjo alrededor de 0,5 mM de homoserina, en comparación con la cantidad no medible producida por la cepa ATCC 13032, según se resume en la Tabla 2.

Tabla 2: Cantidades de homoserina, O-acetilhomoserina, metionina y lisina producidas por las cepas ATCC13032 y M603

Cepa	Homoserina (mM)	O-acetil homoserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
ATCC13032	0,0	0,4	0,0	0,0
M603	0,5	0,7	0,0	17,4

5 La cepa M603 se transformó con ADN C (también denominado como pH304) (SEC ID NO:23) para producir una cepa "Campbell in", que entonces se sometió a "Campbell out" para producir una cepa "Campbell out", M690. La cepa M690 contenía un promotor P<sub>497</sub>ES en dirección 5' del gen *metH* (denominado P<sub>497</sub> *metH*). La secuencia del promotor P<sub>497</sub> se representa en SEC ID NO: 4. La cepa M690 produjo alrededor de 77,2 mM de lisina y alrededor de 41,6 mM de homoserina, como se muestra más abajo en la Tabla 3.

10 Tabla 3: Cantidades de homoserina, O-acetilhomoserina, metionina y lisina producidas por las cepas M603 y M690

Cepa	Homoserina (mM)	O-acetil homoserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
M603	0,5	0,7	0,0	17,4
M690	41,6	0,0	0,0	77,2

15 La cepa M690 se mutageneizó subsiguientemente como sigue: un cultivo durante toda la noche de M603, que se hizo crecer en medio BHI (BECTON DICKINSON), se lavó en 50 mM de tampón de citrato pH 5,5, se trató durante 20 min. a 30°C con N-metil-N-nitrosoguanidina (10 mg/ml en 50 mM de citrato pH 5,5). Después del tratamiento, las células se lavaron nuevamente en 50 mM de tampón de citrato pH 5,5 y se colocaron en placas sobre un medio que contiene los siguientes ingredientes: (todas las cantidades mencionadas se calculan para 500 ml de medio) 10g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,125 g de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O; 21 g de MOPS; 50 mg de CaCl<sub>2</sub>; 15 mg de ácido protocatecuico; 0,5 mg de biotina; 1 mg de tiamina; y 5 g/l de D,L-etionina (SIGMA CHEMICALS, n° de CATÁLOGO E5139), ajustado a pH 7,0 con KOH. Además, el medio contenía 0,5 ml de una disolución de oligometales compuesta de: 10 g/l de FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O; 1 g/l de MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O; 0,1 g/l de ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O; 0,02 g/l de CuSO<sub>4</sub>; y 0,002 g/l de NiCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, todos disueltos en HCl 0,1 M. El medio final se esterilizó mediante filtración, y se añadieron al medio 40 ml de disolución de glucosa al 50% estéril (40 ml) y agar estéril hasta una concentración final de 1,5%. El medio final que contiene agar se vertió a placas de agar y se etiquetó como medio de etionina mínima. Las cepas mutageneizadas se extendieron sobre las placas (etionina mínima) y se incubaron durante 3-7 días a 30°C. Los clones que crecieron en el medio se aislaron y se volvieron a estriar sobre el mismo medio de etionina mínima. Se seleccionaron varios clones para el análisis de la producción de metionina.

20 La producción de metionina se analizó según lo siguiente. Se hicieron crecer cepas en medio CM-agar durante dos días a 30°C, que contenía: 10 g/l de D-glucosa, 2,5 g/l de NaCl; 2 g/l de urea; 10 g/l de bactopectona (DIFCO); 5 g/l de extracto de levadura (DIFCO); 5 g/l de extracto de carne de res (DIFCO); 22 g/l de agar (DIFCO); y que se sometió a autoclave durante 20 min. a alrededor de 121°C.

25 Después de que se hicieron crecer las cepas, las células se retiraron mediante raspado y se resuspendieron en NaCl 0,15 M. Para el cultivo principal, se añadió una suspensión de células raspadas a una OD de partida de 600 nm a alrededor de 1,5 a 10 ml de Medio II (véase más abajo) junto con 0,5 g de CaCO<sub>3</sub> sólido y sometido a autoclave (RIEDEL DE HAEN), y las células se incubaron en un matraz de agitación de 100 ml sin deflectores durante 72 h en una plataforma de agitación orbital a alrededor de 200 rpm a 30°C. El Medio II contenía: 40 g/l de sacarosa; 60 g/l de azúcar total procedente de molasas (calculado para el contenido de azúcar); 10 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,4 g/l de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O; 0,6 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3 mg/l de tiamina\*HCl; 1 mg/l de biotina; 2 mg/l de FeSO<sub>4</sub>; y 2 mg/l de MnSO<sub>4</sub>. El medio se ajustó hasta pH 7,8 con NH<sub>4</sub>OH y se sometió a autoclave a alrededor de 121°C durante alrededor de 20 min.). Después de someter a autoclave y de enfriar, se añadió vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina (SIGMA CHEMICALS) a partir de una disolución madre esterilizada mediante filtración (200 µg/ml) hasta una concentración final de 100 µg/l.

30 Las muestras se tomaron del medio y se evaluaron para determinar el contenido de aminoácidos. Los aminoácidos producidos, incluyendo metionina, se determinaron usando el método de aminoácidos de Agilent en un aparato Agilent 1100 Serie LC System HPLC (AGILENT). Una derivatización pre-columna de la muestra con orto-ftalaldehído permitió la cuantificación de los aminoácidos producidos tras la separación en una columna Hypersil AA (AGILENT).

35 Se aislaron clones que mostraron un título de metionina que fue al menos doble de aquel en M690. Uno de tales

clones, usado en experimentos posteriores, se denominó M1197 y se depositó el 18 de mayo de 2005 en la colección de cepas DSMZ como número de cepa DSM 17322. La producción de aminoácidos por esta cepa se comparó con aquella por la cepa M690, como se resume más abajo en la Tabla 4.

Tabla 4: Cantidades de homoserina, O-acetilhomoserina, metionina y lisina producidas por las cepas M690 y M1197

Cepa	Homoserina (mM)	O-acetil-homoserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
M690	41,6	0,0	0,0	77,2
M1197	26,4	1,9	0,7	79,2

5

La cepa M1197 se transformó con ADN F (también denominado como pH399, SEC ID NO: 24) para producir una cepa "Campbell in", que subsiguientemente se sometió a "Campbell out" para producir una cepa M1494. Esta cepa contiene una mutación en el gen para la homoserina cinasa, que da como resultado un cambio de aminoácidos en la enzima homoserina cinasa resultante de T190 a A190 (denominado HskT190A). La producción de aminoácidos por la cepa M1494 se comparó con la producción por la cepa M1197, como se resume más abajo en la Tabla 5.

10

Tabla 5: Cantidades de homoserina, O-acetilhomoserina, metionina y lisina producidas por las cepas M1197 y M1494

Cepa	Homoserina (mM)	O-acetil-homoserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
M1197	26,4	1,9	0,7	79,2
M1494	18,3	0,2	2,5	50,1

La cepa M1494 se transformó con ADN D (también denominado pH484, SEC ID NO:25) para producir una cepa "Campbell in", que subsiguientemente se sometió a "Campbell out" para producir la cepa M1990. La cepa M1990 sobreexpresa un alelo *metY* usando tanto un promotor groES como un promotor EFTU (factor de alargamiento Tu) (denominado P<sub>497</sub> P<sub>1284</sub> *metY*). La secuencia del promotor P<sub>497</sub>P<sub>1284</sub> se expone en SEC ID NO:26. La producción de aminoácidos por la cepa M1494 se comparó con la producción por la cepa M1990, como se resume más abajo en la Tabla 6.

15

Tabla 6: Cantidades de homoserina, O-acetilhomoserina, metionina y lisina producidas por las cepas M1494 y M1990

Cepa	Homoserina (mM)	O-acetil-homoserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
M1494	18,3	0,2	2,5	50,1
M1990	18,2	0,3	5,6	48,9

20

La cepa M1990 se transformó con ADN E (también denominado pH 491, SEC ID NO: 27) para producir una cepa "Campbell in", que subsiguientemente se sometió a "Campbell out" para producir la cepa M2014. La cepa M2014 sobreexpresa un alelo *metA* usando un promotor de superóxido dismutasa (denominado P<sub>3119</sub> *metA*). La secuencia del promotor P<sub>3119</sub> se expone en SEC ID NO:3. La producción de aminoácidos por la cepa M2014 se comparó con la producción por la cepa M1990, como se resume más abajo en la Tabla 7.

25

Tabla 7: Cantidades de homoserina, O-acetilhomoserina, metionina y lisina producidas por las cepas M1494 y M1990

Cepa	Homoserina (mM)	O-acetil-homoserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
M1990	18,2	0,3	5,6	48,9
M2014	12,3	1,2	5,7	49,2

30

#### Experimento 2 – Supresión de *mcbR* de M2014

El plásmido pH429 que contiene una supresión RXA00655, (SEC ID NO:28) se usó para introducir la supresión *mcbR* en *C. glutamicum* vía integración y escisión (véase el documento WO 2004/050694 A1).

5 El plásmido pH429 se transformó en la cepa M2014 con selección para resistencia a canamicina (Campbell in). Usando contraselección de *sacB*, se aislaron derivados sensibles a kanamicina de la cepa transformada, que presumiblemente habían perdido el plásmido integrado por escisión (Campbell out). La cepa transformada produjo derivados sensibles a kanamicina que formaron colonias pequeñas y colonias más grandes. Las colonias de ambos tamaños se cribaron mediante PCR para detectar la presencia de la supresión *mcbR*. Ninguna de las colonias más grandes contenía la supresión, mientras que 60-70% de las colonias más pequeñas contenían la supresión *mcbR* esperada.

10 Cuando un aislado original se volvió a estriar para colonias individuales en placas de BHI, apareció una mezcla de colonias minúsculas y pequeñas. Cuando las colonias minúsculas se volvieron a estriar sobre BHI, una vez más apareció una mezcla de colonias minúsculas y pequeñas. Cuando las colonias pequeñas se volvieron a estriar sobre BHI, el tamaño de la colonia fue habitualmente pequeño y uniforme. Se seleccionaron dos aislados de colonia individual pequeña, denominados OM403-4 y OM403-8, para estudio posterior.

15 Los experimentos en matraces de agitación (Tabla 8) mostraron que OM403-8 produjo al menos el doble de la cantidad de metionina que el progenitor M2014. Esta cepa también produjo menos de un quinto de la cantidad de lisina que M2014, sugiriendo una diversión del flujo de carbono desde semialdehído de aspartato hacia homoserina. Una tercera diferencia llamativa fue un incremento mayor de 10 veces en la acumulación de isoleucina por OM403 con respecto a M2014. Los cultivos se hicieron crecer durante 48 horas en medio de molasas estándar.

Tabla 8: Producción de aminoácidos por aislados de la cepa OM403 en cultivos de matraces de agitación inoculados con células que se hicieron crecer recientemente

Cepa	Tamaño de la colonia	Supresión $\Delta mcbR$	Met (g/l)	Lys (g/l)	Hse+Gly (g/l)	Ile (g/l)
M2014	Grande	ninguna	0,2	2,4	0,3	0,04
			0,2	2,5	0,3	0,03
			0,2	2,4	0,3	0,03
			0,4	3,1	0,4	0,03
OM403-8	Pequeño	$\Delta RXA0655$	1,0	0,3	0,8	0,8
			1,0	0,3	0,8	0,8
			0,9	0,3	0,8	0,8
			1,0	0,3	0,8	0,6

20 También como se muestra en la Tabla 9, hubo una disminución mayor de 15 veces en la acumulación de O-acetilhomoserina por OM403 con respecto a M2014. La explicación más probable para este resultado es que la mayoría de la O-acetilhomoserina que se acumula en M2014 se convierte en metionina, homocisteína, e isoleucina en OM403. Los cultivos se hicieron crecer durante 48 horas en medio de molasas estándar.

25 Tabla 9: Producción de aminoácidos por dos aislados de OM403 en cultivos de matraces de agitación inoculados con células que se hicieron crecer recientemente

Cepa	Supresión $\Delta mcbR$	Met (g/l)	OAc-Hse (g/l)	Ile (g/l)
M2014	Ninguna	0,4	3,4	0,1
		0,4	3,2	0,1
OM403-4	$\Delta RXA0655$	1,7	0,2	0,3
		1,5	0,1	0,3
OM-403-8	$\Delta RXA0655$	2,2	<0,05	0,6
		2,5	<0,05	0,6

- 5 A fin de disminuir el importe de metionina en OM403-8, se suprimió el promotor y una porción de 5' del gen *metQ*. El gen *metQ* codifica una subunidad de un complejo de importación de metionina que es necesaria para que el complejo funcione. Esto se logró usando la técnica Campbelling in y Campbelling out estándar con el plásmido pH449 (SEC ID NO: 29). OM403-8 y OM456-2 se evaluaron para determinar la producción de metionina en ensayos con matraces de agitación. Los resultados (Tabla 10) muestran que OM456-2 produjo más metionina que OM403-8. Los cultivos se hicieron crecer durante 48 horas en medio de molasas estándar.

Tabla 10: Ensayos de OM456-2 en matraces de agitación

Cepa	vector	[Met] (g/l)	[Lys] (g/l)	[Gly/Hse] (g/l)	[OAcHS] (g/l)	[Ile] (g/l)
OM403-8	ninguno	4,0	0,8	2,2	0,4	1,9
		3,9	0,6	2,2	0,4	1,9
OM456-2	ninguno	4,2	0,4	2,3	0,4	2,3
		4,3	0,5	2,4	0,4	2,3

Experimento 4 Construcción de OM469

- 10 Se construyó una cepa, denominada OM469, que incluyó tanto la supresión de *metQ* como la sobreexpresión de *metF* al sustituir el promotor de *metF* por el promotor  $\lambda P_R$  fágico en OM456-2. Esto se logró usando la técnica de Campbelling in y Campbelling out estándar con el plásmido pOM427 (SEC ID NO: 30). Se evaluaron cuatro aislados de OM469 para determinar la producción de metionina en ensayos de cultivo con matraces de agitación, en los que produjeron todos ellos más metionina que OM456-2, como se muestra en la Tabla 11. Los cultivos se hicieron crecer durante 48 horas en medio de molasas estándar que contiene 2 mM de treonina.
- 15

Tabla 11: Ensayos en matraces estándar de OM469, un derivado de OM456-2 que contiene el promotor fágico lambda P<sub>R</sub> en lugar del promotor de *metF*

Cepa	Promotor de <i>metF</i>	MetQ	[Met] (g/l)	[Lys] (g/l)	[Gly/Hse] (g/l)	[OAcHS] (g/l)	[Ile] (g/l)
OM428-2	$\lambda P_R$	nativo	4,5	0,5	2,6	0,4	2,6
			4,6	0,4	2,6	0,3	2,5
OM456-2	nativo	$\Delta metQ$	4,2	0,4	2,4	0,3	2,5
			4,2	0,5	2,4	0,3	2,5
OM469-1	$\lambda P_R$	$\Delta metQ$	5,0	0,5	2,7	0,4	3,1
-2			4,9	0,5	2,7	0,4	2,8
-3			4,8	0,4	2,6	0,4	2,7
-4			4,7	0,5	2,6	0,4	2,8

Experimento 5 – Construcción de M2543

- 20 La cepa OM469-2 se transformó mediante electroporación con el plásmido pCLIK5A PSOD TKT, como se representa en SEC ID NO. 31. Esto se logró usando la técnica de Campbelling in y Campbelling out estándar.
- Los aislados de OM 469 PSOD TKT, que se etiquetaron como M2543, se evaluaron para determinar la producción

de metionina en ensayos de cultivo con matraces de agitación, en los que produjeron más metionina que OM469-2. Los resultados de la cepa M2543 se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Ensayos de OM469 y M2543 en matraces de agitación

Cepa	plásmido	genes met en el plásmido	[Met] (mm)	[Lys] (mm)	[Gly] (mm)	[Hse] (mm)	[AHs] (mm)	[Ile] (mm)
OM469-2		Ninguno	14	3,4	16	1,7	0,3	11,8
M2543#		Ninguno	20,4	1,9	21,8	0,8	<0,1	12,4

5 Experimento 6 – Construcción de GK1259

A fin de disminuir la expresión de serina desaminasa (*sda*), se suprimió una porción del gen *sda*. Esto se logró usando la técnica de Campbelling in y Campbelling out estándar con el plásmido pH626 int SacB delta *sdaA* (SEC ID No. 32). Para este fin, la cepa M2543 se transformó mediante electroporación con el plásmido pH626 int SacB delta *sdaA*. La cepa resultante se denominó GK1259.

10 Experimento 7 – Construcción de OM264C

El plásmido pOM253 (SEC ID No. 33) se usó para suprimir *serA* y sustituirlo por resistencia a espectinomicina en la cepa M2014 de *C. glutamicum*. La cepa “Campbelled out” resultante, M2014  $\Delta serA::spec$ , se denominó OM264C. OM264C es un auxótrofo de serina. Puesto que también carece de un GCS funcional, OM264C no puede crecer en un medio mínimo que carezca de serina pero que contiene glicina. Sin embargo, si se instala en OM264C un sistema GCS funcional, entonces ganará la capacidad para crecer en medio mínimo que contenga glicina.

15

La receta para las placas mínimas (químicamente definidas) fue como sigue:

Nombre de la disolución madre	Concentración del lote	Volumen del lote para 1 litro
10 X sales de Spizizen	Véase más abajo	100 ml
Glucosa	50% w/v	10 ml
Disolución de 4B	Véase más abajo	4 ml
Treonina	400 mM	5 ml
Cisteína HCl	4 g/l	10 ml
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5% p/v	5 ml
Citrato de sodio	1,0 M	20 ml
Timidina	1% p/v	10 ml
Fenilalanina	1% p/v	10 ml
Isoleucina	1% p/v	10 ml
Tiamina HCl	0,1% p/v	5 ml
Metionina	1% p/v	5 ml
Succinato de sodio	1,0 M	3 ml
Acetato de potasio	5,0 M	1,2 ml
Glicina (cuando se añade)	10% p/v	5 ml
Serina (cuando se añade)	10% p/v	2 ml
Ácido lipoico (cuando se añade)	1 g/l en fosfato de potasio 20 mM, pH 7,0	1 ml

Todos los lotes se esterilizaron mediante filtración. Para las placas de Petri con agar, se suspendieron 15 g de agar en 800 ml de agua destilada, y se sometieron a autoclave.

- 10 X sales de Spizizen
- 5 20 g de sulfato de amonio
- 174 g de fosfato potásico dibásico (trihidratado)
- 60 g de fosfato potásico monobásico (anhidro)
- 10 g de citrato de sodio (dihidratado)
- 2 g de sulfato de magnesio (heptahidratado)
- 10 Agua destilada hasta un litro

Añádanse 3,5 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 0,4%, esterilizado mediante filtración y 1 ml de Disolución de micronutrientes (véase más abajo). El pH final debería ser alrededor de 7,2. Esterilícese mediante filtración.

Disolución de micronutrientes: cantidad para 1 litro

- 0,15 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 15 2,5 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- 0,7 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,25 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 1,6 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 0,3 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 20 Agua destilada hasta un litro.
- Esterilizar mediante filtración.
- Disolución 4B: cantidad para un litro
- 0,25 g de tiamina HCl (vitamina B<sub>1</sub>)
- 50 mg de cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>)
- 25 25 a 28 mg de biotina
- 1,25 g de piridoxina HCl (vitamina B<sub>6</sub>)
- Disolver en fosfato potásico 50 mM, pH 7,0
- Esterilícese mediante filtración. Almacénese en la oscuridad.

Experimento 8 – Construcción de cepas que expresan los genes de *C. jeikeium* gcvPTH en *C. glutamicum*

- 30 A diferencia de *C. glutamicum*, un pariente cercano, denominado *C. jeikeium*, sí contiene un GCS. En el cromosoma de *C. jeikeium*, los genes *gcvP*, *T*, y *H* están agrupados juntos en un operón (Tauch et al., 2005, J. Bacteriol., vol 187, p. 4671-4682). Este agrupamiento se clonó en cuatro piezas de subconjuntos solapantes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como molde ADN cromosómico de la cepa K411 de *C. jeikeium*.

- 35 El ADN necesario se obtuvo dividiendo la secuencia en cuatro regiones más pequeñas y obteniendo cuatro fragmentos de PCR más pequeños independientes. Las cuatro piezas se amplificaron con cuatro conjuntos de cebadores. Se manipularon mediante ingeniería un sitio *Xba*I artificial y un sitio de unión al ribosoma artificial justo en dirección 5' del codón de partida de *gcvP* en el cebador de sentido respectivo, y se manipuló mediante ingeniería un sitio *Bam*HI artificial justo en dirección 3' a partir del codón de parada de *gcvH* en el cebador antisentido respectivo. Esto permitió que las secuencias codificantes del agrupamiento gcvPTH se reconstituyeran y fueran portadas en un fragmento *Xba*I a *Bam*HI.
- 40

El fragmento *Xba*I a *Bam*HI resultante que contiene el agrupamiento de *gcvPTH* reconstituido se clonó a continuación en plásmidos replicantes de *C. glutamicum* diseñados para expresar genes a partir del promotor

*groESL* de *C. glutamicum*, denominado aquí P<sub>497</sub>, o un promotor fágico SPO 1 de *B. subtilis*, denominado aquí P<sub>15</sub> (SEC ID No. 42). Los plásmidos resultantes se denominan pOM615 (SEC ID No. 34) y pOM616 (SEC ID No. 35), respectivamente. Los promotores P<sub>497</sub> y P<sub>15</sub> se usaron debido a que promueven la expresión constitutiva de genes situados en dirección 3'. En particular, estos promotores no están regulados significativamente por ningún metabolito relacionado con la glicina, tal como glicina, serina, metionina, timidina, purina, etc.

Experimento 9 – Los genes *gcvP7H* de *C. jeikeium* funcionan en *C. glutamicum*

Los plásmidos pOM615, pOM616, y el vector vacío pCLIK se transformaron cada uno separadamente en la cepa probadora cepa OM264C de *C. glutamicum* y la cepa GK1259 de *C. glutamicum* productora de metionina, usando selección en placas de agar con Infusión de Cerebro Corazón (anteriormente Difco, ahora Becton Dickenson) que contienen sulfato de kanamicina (25 mg/l). Los transformantes OM264C se rallaron en placas mínimas que carecen de serina pero que contienen glicina. Se añadió ácido lipoico al medio para dar una concentración final de 1 mg/l para asegurar que había cantidades suficientes de este cofactor de GcvH.

Ambas cepas derivadas de pOM615 y pOM616, OM264C(pOM615) y OM264C(pOM616) así como GK1259(pOM615) y GK1259(pOM616) crecieron, mientras que el transformante de pCLIK (OM264C(pCLIK)) no lo hizo.

Experimento 10 – Los genes *lipBA* de *C. jeikeium* funcionan en *C. glutamicum*

*C. glutamicum* es un prototrofo de ácido lipoico, y *C. glutamicum* tiene presuntamente una lipoil sintetasa, puesto que piruvato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa están activas.

En *E. coli*, hay dos rutas diferentes para la unión (ligación) de ácido lipoico a proteínas diana, la ruta dependiente de LipB para ácido lipoico sintetizado endógenamente, y la ruta de LplA para ácido lipoico alimentado (Morris et al., 1995, J. Bacteriol. Vol 177, p. 1-10).

Mediante comparación de secuencias, parece que *C. glutamicum* tiene buenos homólogos tanto para LipB como para LplA. De este modo, el gen *lipB* y su promotor nativo, junto con el gen *lipA*, se clonó mediante PCR a partir de ADN cromosómico de la cepa K411 de *C. jeikeium* como molde. El fragmento de PCR como resultante se ligó en el sitio Swal único de pOM615 o pOM616 para dar pOM620AF (SEC ID No 36) y pOM621AR (SEC ID No 37), respectivamente.

Los plásmidos pOM620AF y pOM621AR se transformaron cada uno en la cepa OM264C dando como resultado OM264C(pOM620AF) y OM264C(pOM621AR) respectivamente, y en la cepa GK1259 productora de metionina, dando como resultado GK1259(pOM620AF) y GK1259(pOM621AR), respectivamente. Los transformantes de OM264C se rallaron en las placas de glicina mínima descritas anteriormente (pero sin ácido lipoico), y ambos transformantes crecieron, mientras que OM264C(pCLIK) no lo hizo, demostrando que la ruta de LipB de *C. jeikeium* podría lipoilar la proteína GcvH de *C. jeikeium* cuando los dos se expresan juntos en *C. glutamicum*.

Los transformantes de GK1259 de pOM615, pOM616, pOM620AF, pOM621AR, y pCLIK se ensayaron para determinar la producción de metionina y de glicina en matraces de agitación usando medio de molasas, sin ácido lipoico o con ácido lipoico añadido hasta una concentración final de alrededor de 10 mg/ml. Los resultados se muestran en las Tablas 13 y 14 más abajo.

Tabla 13: Producción de metionina y de glicina por GK1259 transformado con diversos plásmidos diseñados para expresar *gcvPTH* de *C. jeikeium* con *lipBA* y que se hacen crecer en matraces de agitación en medio de molasas.

Plásmido	Promotor para <i>gcvPTH</i>	<i>lipBA</i>	Ácido lipoico	Glicina g/l	Metionina g/l
pCLIK	-	-	-	2,5	4,3
pOM615	P <sub>497</sub>	-	+	0,1	4,7
pOM620AF	P <sub>497</sub>	+	-	0,0	5,0

Tabla 14: Producción de metionina y de glicina por O264C transformado con diversos plásmidos diseñados para expresar *gcvPTH* de *C. jeikeium* con *lipBA* y que se hacen crecer en matraces de agitación en medio de molasas.

Plásmido	Promotor para <i>gcvPTH</i>	<i>lipBA</i>	Ácido lipoico añadido	Glicina* g/l	Metionina* g/l
pCLIK	-	-	-	2,1	3,8

Plásmido	Promotor para <i>gcvPTH</i>	<i>lipBA</i>	Ácido lipoico añadido	Glicina* g/l	Metionina* g/l
pOM616	<i>P<sub>15</sub></i>	-	+	0,0	4,1
POM621AR	<i>P<sub>15</sub></i>	+	-	0,0	3,9

\* Los títulos de metionina y de glicina son promedios de muestras duplicadas, excepto para la muestra de pOM616 más ácido lipoico, que es una única muestra.

5 A partir de estos resultados, está claro que el subproducto de glicina en exceso se consume y el título de metionina mejora al expresar el operón *gcvPTH* de *C. jeikeium*. Se logra una mejora adicional al expresar el operón *gcvPTH* de *C. jeikeium* y el operón *lipBA* de *C. jeikeium* a partir del mismo plásmido.

Experimento 11 – Expresión de *gcvPTH* y *lipBA* a partir de casetes integrados

10 En los ejemplos dados anteriormente, los genes *gcv* y *lip* se instalaron en plásmidos que se replican en la *C. glutamicum*. Sin embargo, estos genes también se pueden instalar a través de un vector integrante. Por ejemplo, el operón *gcvPTH* de *C. jeikeium* expresado a partir del promotor *P<sub>15</sub>* se ha ligado en un vector integrante para dar pOM627 (SEC ID No. 38), que se diseña para integrarse en el locus *bioB* de *C. glutamicum*.

pOM627 se puede obtener a partir de “Campbell in” y “Campbell out” de las cepas OM469 y GK1259. Como en el ejemplo anterior, se observa producción mejorada de metionina y una reducción de la acumulación de glicina como se muestra en la Tabla 15.

15 Tabla 15: Producción de metionina y glicina por transformantes de OM469 y GK1259 usando pOM627 diseñado para expresar *gcvPTH* de *C. jeikeium* a partir de *P<sub>15</sub>* tras la integración en *bioB*, y que se hacen crecer en matraces de agitación en medio de molasas con o sin ácido lipoico 10 mg/l añadido.

Cepa	Ácido lipoico	Glicina g/l	Metionina g/l
OM469(pOM627)K	-	2,7	3,8
OM469(pOM627)K	+	2,0	4,0
GK1259(pOM627)K	-	2,8	3,9
GK1259(pOM627)K	+	2,0	4,1

El efecto del plásmido integrante pOM627 sobre la producción de glicina y metionina se puede mejorar instalando múltiples copias o incrementando la fuerza del promotor.

20 También se puede añadir el operón *lipBA* de *C. jeikeium* (ya sea en vectores replicantes o integrantes). Un ejemplo de un plásmido integrante que expresa *lipBA* a partir del promotor *P<sub>497</sub>* tras la integración en el locus *bioAD* de *C. glutamicum* es pOM180 (SEC ID No 39).

Experimento 12 – El sistema GCS de *E. coli* también funciona en *C. glutamicum*

25 El gen *lpd* de *E. coli* se amplificó mediante PCR y se instaló en un plásmido integrante para dar pOM331 (SEQ ID No 40). El sitio de integración es un gen denominado aquí *metE2*, un gen que es homólogo a una porción de *metE*, pero que no parece que es esencial para el crecimiento o producción de metionina en *C. glutamicum*.

30 En pOM331, el gen *lpd* de *E. coli* se expresa a partir del promotor *P<sub>497</sub>*. pOM331 se transformó en y se sometió a Campbell out de OM264C para dar una nueva cepa OM197, que se confirmó mediante una PCR de diagnóstico apropiada que contiene el casete *P<sub>497</sub> lpd* integrado. Además, el operón *gcvTHP* de *E. coli* se amplificó mediante PCR y se ligó justamente en dirección 3' del promotor *P<sub>497</sub>* en un vector replicante, para dar pOM344 (SEC ID No. 41). pOM344 y pCLIK se transformaron cada uno separadamente en la cepa OM197, y las cepas resultantes se ralaron sobre placas de glicina mínima que contienen glicina y ácido lipoico, pero que carecen de serina (véase anteriormente).

35 Después de varios días a 30°C, OM197/pOM344 había crecido, pero OM197/pCLIK no lo hizo, demostrando que el sistema GCS de *E. coli* estaba funcionando en *C. glutamicum*.

En los ejemplos anteriores, se muestra que los genes que codifican las subunidades P, T y H del GCS, y los genes que codifican enzimas que catalizan la ligación o síntesis de ácido lipoico, clonados a partir de cualesquiera de dos organismos “donantes” (que no están relacionados entre sí de forma parentésca), son capaces cada uno de funcionar para dar actividad de GCS medible en *C. glutamicum*, ya sea mostrando complementación de una

auxotrofia de serina en placas que contienen glicina pero no serina, o mostrando una disminución en la producción de glicina mediante una cepa productora de metionina en comparación con la producción de glicina de la cepa parental o precursora pertinente transformada con un vector vacío como control.

- 5 Por extensión, parece razonable suponer que un experto en la técnica será capaz de seguir los ejemplos descritos aquí y reconstruir otros sistemas GCS en *C. glutamicum*, y que la actividad de GCS se puede establecer y/o incrementar en otros microorganismos al clonar los genes pertinentes de los mismos (es decir, *E. coli* y *C. jeikeium*) o de otros organismos donantes. La mejora también se puede lograr alimentando ácido lipoico, por ejemplo a alrededor de 0,1 a 10 mg/l.

#### Experimento 13 – Construcción de M2616

- 10 Se construyó M2616 de *C. glutamicum*. Esta cepa, que muestra actividad de serA suprimida, permite ensayar la función de formiato THF sintetasa.

15 El plásmido pHF96 (SEC ID 43) es un plásmido integrante diseñado para crear una supresión-sustitución en el gen serA de cepas de *C. glutamicum* relacionadas con *C. glutamicum* ATCC 13032. Para suprimir serA en M2543, se usó el plásmido pHF96 int sacB delta serA. El plásmido se transformó en M2543 de *C. glutamicum* mediante electroporación, y se aislaron los clones resistentes a kanamicina. Después de determinar estas cepas “Campbellled in” resistentes a kanamicina como exitosas mediante PCR, las cepas se hicieron crecer toda la noche en medio CM líquido y se colocaron en placas en Medio CM que contiene sacarosa (concentración 10%). La cepa “Campbellled out” resultante, M2543 delta serA, se denominó M2616. Como se esperaba, M2616 es un auxótrofo de serina cuando se ensaya en medio mínimo. También como se esperaba, puesto que carece de una formiato THF sintetasa funcional, M2616 no puede crecer en un medio mínimo que carezca de serina pero que contenga glicina y formiato (véase el Ejemplo para la receta para el medio mínimo (químicamente definido)). Si se instala en M2616 un sistema de formiato THF sintetasa funcional, entonces ganará la capacidad para crecer en medio mínimo que contiene glicina.

- 25 Experimento 14 – Clonación de dos genes de formil-THF sintetasa a partir de dos fuentes de *Corynebacterium jeikeium*

A diferencia de *C. glutamicum*, un pariente cercano denominado *Corynebacterium jeikeium* sí contiene una proteína formil-THF sintetasa con el número de acceso NP\_939608, y un gen correspondiente con el número de acceso GenID: 2649808.

- 30 Se utilizaron dos fuentes de moldes para la clonación de la formil-THF sintetasa a partir de *Corynebacterium jeikeium*. Se usó ADN derivado de la cepa de la NCTC National Collection of Type Cultures Londres, UK, número 11915 con la denominación de cepa K411, y de la cepa 7171 de DSMZ. El ADN cromosómico se preparó usando el kit de ADN de Quiagen, como se describe por el fabricante. Los oligonucleótidos HS1304 (SEC ID No: 44) y HS1305 (SEC ID No. 45) se usaron para amplificar las secuencias genómicas del gen de formiato-THF sintetasa de las dos fuentes de ADN genómico (NCTC 11915 y DSMZ 7171). Se usó la Pwo polimerasa de Roche Mannheim en las siguientes condiciones: hibridación a 52°C durante 30” y alargamiento a 72°C durante 120” que produjeron un fragmento de PCR de alrededor de 1700 pb.

- 40 Además, los cebadores HS1302 (SEC ID No. 46) y HS1303 (SEC ID No. 47) se usaron para amplificar la unidad de expresión del promotor con la secuencia como se describe a partir de ADN cromosómico derivado de la cepa ATCC13032. Se usó la Pwo polimerasa de Roche Mannheim en las siguientes condiciones: hibridación a 53°C durante 30” y alargamiento a 72°C durante 30” que produjeron un fragmento de PCR de alrededor de 200 pb.

- 45 Ambos fragmentos se añadieron en una tercera PCR, en la que se añadieron los cebadores HS13032 y HS1305. La tercera PCR se llevó a cabo con cantidades limitantes de los fragmentos I y II de PCR en cantidades suficientes de los cebadores extremo a extremo, y se fusionó usando los cebadores extremo a extremo. HS1302+HS1305 se usaron para amplificar un constructo de fusión de los fragmentos de PCR que resultan de los cebadores HS1302+HS1303 y HS1304+HS1305. Se usó la Pwo polimerasa de Roche Mannheim en las siguientes condiciones: hibridación a 55°C durante 30” y alargamiento a 72°C durante 120” que produjeron un fragmento de PCR de alrededor de 1900 pb.

El fragmento se purificó con el kit de purificación de PCR GFX, y se digirió usando las enzimas de restricción MluI y XbaI. Se secuenciaron plásmidos positivos que contienen el inserto del gen de formil-THF sintetasa.

- 50 Se secuenció el gen derivado de NCTC K11915 de *C. jeikeium*. La secuenciación de este gen reveló que la secuencia era como se esperaba. Se secuenció el gen derivado de DSMZ 7171 de *C. jeikeium*. La secuenciación de este gen reveló una secuencia como se describe en la secuencia del plásmido pH657.

- 55 El plásmido pH655 (SEC ID No. 48) que comprende formiato-THF-sintetasa de NCTC K11915, y pH657 (SEC ID No. 49), que comprende formiato-THF-sintetasa de DSMZ7171, se transformaron mediante electroporación en la cepa M2616 que carece del gen serA funcional.

5 Las cepas M2616(pH655) y M2616(pH657) resultantes, así como la cepa que carece de un plásmido, se rallaron sobre medio mínimo que contiene 10 mM de treonina, 20 mM de formiato de Na, y 20 mM de glicina +- 10 mM de serina. Las cepas que contienen los plásmidos pH655 y pH657 pero no pCLIK5a formaron colonias en medio mínimo que contiene formiato y glicina, mientras que, incluso tras la incubación prolongada, la cepa M2616 no produjo colonias en este medio que carece de serina. En el mismo medio mínimo con treonina añadida, formiato de Na y glicina, pero con serina añadida (20 mM), todas las cepas formaron colonias, incluyendo M2616.

Este resultado mostró la expresión funcional con éxito de la formiato THF sintetasa derivada de *Corynebacterium jeikeium* NCTC y DSMZ 7171 en *Corynebacterium glutamicum*, para proporcionar una cepa que utiliza formiato en la síntesis de serina.

10 Experimento 15 – Construcción de una cepa sobreproductora de metionina que expresa genes de formiato-THF sintetasa

15 Los plásmidos pH655 y pH657 se transformaron en la cepa GK1259 mediante electroporación. Las cepas resultantes GK1259(pH655) y GK1259(pH657), así como la cepa que no contiene plásmido, se incubaron en ensayos con matraces de agitación como se describe previamente. Además, se añadió formiato 20 mM al medio de crecimiento. Se observó que la expresión del gen de formiato THF sintetasa mejoró la productividad de metionina de la cepa con respecto a la cepa que carece del gen de formiato THF sintetasa. En la tabla 16 se encuentran los datos.

Tabla 16: Ensayos en matraces de agitación de GK1259, y GK1259(pH655) que sobreexpresa formiato-THF sintetasa

Cepa	Plásmido	Gen sobreexpresado	[Met] (mM/l)
GK1259	Ninguno	ninguno	23,3
GK1259	pH655	formiato THF sintetasa	24,6

20 Experimento 16 – Supresión de formil-THF-desformilasa en la cepa M2543.

25 Se detectó mediante comparación de secuencias que *C. glutamicum* contiene un gen, que se ha anotado como una formil-THF desformilasa (nº de Acceso Ncgl0371). Este gen se ha anotado como codificante de una enzima con la actividad enzimática de formil-THF desformilasa, que escinde formiato del metabolito formil-tetrahidrofolato (Annual review of plant physiology and plant molecular biology (2001) 52. 119-137).

30 La genosupresión de la formil-THF deformilasa (número de acceso Ncgl0371) se llevó a cabo clonando un fragmento de ADN en el que la región en dirección 5' del gen que codifica N<sub>Cg</sub>0371 (aproximadamente 500 pb de longitud) y su región en dirección 3' (aproximadamente 500 pb de longitud) del mismo gen se amplificaron, se fusionaron mediante PCR de fusión, y se clonaron en un vector, dando como resultado pH670 int sacB delta deformilasa (SEC ID No. 50). El plásmido se transforma en la cepa M2543 para producir primeros recombinantes ("etapa de Campbell in"). Tras el cribado con éxito de los primeros recombinantes correctos mediante PCR, la cepa se hizo crecer toda la noche en cultivo líquido, y se colocó en medio de crecimiento que contiene 10% de sacarosa. Este tratamiento ("etapa de Campbell out") conduce a una cepa denominada GK1546, en la que el marcador de resistencia a kanamicina y el gen de sacarosa de levano codificado por el plásmido pH670 se intercambian genéticamente con éxito en el cromosoma y subsiguientemente se pierden del cromosoma y la célula. Las cepas sucesivas de la etapa de Campbell out se identifican como supresiones de la formil-THF deformilasa mediante cribado por PCR utilizando cebadores que codifican secuencias en las regiones de 5' y de 3' de la formil-THF deformilasa descrita. Los clones positivos muestran un fragmento de PCR que es aproximadamente 900 pb más corto que el producto de la PCR procedente de una cepa de tipo salvaje de formil-THF deformilasa. La cepa resultante se denominó GK1546.

Experimento 17 – Construcción de una cepa a la que se le ha suprimido formil-THF deformilasa y que sobreexpresa formiato-THF-sintetasa

45 La cepa GK1546 se transforma con los plásmidos pH655 y pH657. Las cepas resultantes GK1546(pH655) y GK1546(pH657) muestran un comportamiento de crecimiento significativamente mejorado cuando se hacen crecer en un medio mínimo que contiene formiato, glicina y treonina, pero no serina, con respecto a la cepa M2543.

Experimento 18 – Expresión de formiato-THF-sintetasa funcional para la producción de metionina

La cepa M2616 se transformó con pH655 (formiato-THF-sintetasa NCTC 11915) y pH657 (formiato-THF-sintetasa DSMZ 7171). Las cepas resultantes M2616(pH655) y M2616(pH657) se analizaron en ensayos con matraces de agitación como se describe previamente.

50 El medio se suministró con 20 mM de glicina así como 20 mM de formiato de Na, además de la composición normal

5 descrita anteriormente. Los matraces de agitación se incubaron a 30°C con una velocidad de agitación de 200 RPM. Después de 48 h, se determinó la metionina. Se encontró que la cepa progenitora M2616 sin el plásmido que expresa formiato-THF sintetasa no creció hasta una OD medible, y no utilizó la fuente de carbono dada. Los sobrenadantes se ensayaron para determinar formiato en el sobrenadante mediante HPLC. Las cepas que contienen los plásmidos pH655 y pH657 muestran una utilización de todo el formiato añadido al medio. Además, se observa que las cepas que se hicieron crecer en formiato, glicina y que expresan el gen de formiato THF-sintetasa produjeron cantidades medibles de metionina, mientras que la cepa M2616 no produjo metionina en absoluto. Los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17: Producción de metionina en M2616 y en transformantes plasmídicos de M2616

Cepa	plásmido	Gen sobreexpresado	[Met](mM/l)
M2616	Ninguno	ninguno	0
M2616	pH655	formiato-THF-sintetasa NCTC	4,1
M2616	pH657	formiato THF-sintetasa DSMZ	5,5

10 En otro experimento, se añadió serina 20 mM al medio de cultivo descrito en el Experimento 18. M2616 y M2616 que expresa el gen de formiato-THF-sintetasa DSMZ 7171 se hicieron crecer en presencia de serina, y se evaluaron para determinar la metionina producida. Se encontró que los títulos de metionina resultantes en el caso de sobreexpresión son mayores en el caso de las cepas M2616, que expresaron el gen de formiato-THF-sintetasa DSMZ, en comparación con la cepa que no contiene un gen de formiato-THF-sintetasa. El dato se encuentra en la tabla 18.

Tabla 18: Sobreproducción de metionina en cepas que sobreexpresan formiato-THF-sintetasa

Cepa	Serina añadida	Gen sobreexpresado	[Met] (mM/l)
M2616	+	ninguno	6,6
M2616 pH657	+	formiato-THF-sintetasa DSMZ	8,9

#### LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Evonik Degussa GmbH  
 <120> Bacterias corineformes con actividad de escisión de glicina  
 <130> 2007P00927WE01  
 <160> 52  
 <170> PatentIn version 3.3

25 <210> 1  
 <211> 1689  
 <212> ADN  
 <213> *Corynebacterium jeikeium*

30 <400> 1

ES 2 517 394 T3

atgactaact cttctgcaac cagcaatccc caaccacagcg acgtcgaaat cgcacaggcc 60  
cacaccctgg agcccatcac cacgatcgcg gagecgcgcg gcatcccgga ggccgctttg 120  
attccctacg gccgtacaaa ggccaagatc gacgttcccc ctctgcgggc ggagcgtgag 180  
ggcgtcaata aaaagggcaa gctcgtgctc gtgaccgcaa tgagcccagc ccccgcgggt 240  
gaaggcaagt ccacgggtgct gatcggcttg gcggacgcgg tgcgcacggc agggcgccag 300  
acgatggtgg cgatccgca gccgtcccag gggccagtca tgggcatcaa gggcgcgct 360  
gctggcggcg gttatgcgca gatcgtgccg atggaagaca tcaacctgca cttcacaggc 420  
gacatgcacg ccataccgc gcgcacgaac actctggcgg cgatggtgga caaccacgtg 480  
cagcacggca atgctctggg catcgaccgc cggcgggtga cgtggcgacg ctgccttgac 540  
gtcaacgacc gctcgtgcg ccatgtagtc acaggcctag gcggtcctgg tcagggcacg 600  
ccccgcgagg gcggattcga tatcacggcg gccagcgaga tcatggctat cctctgtctg 660  
gccaccgacc tggaggatct aaagaagcgc atcgggcgca tcgtggtggg ccagacctac 720  
gaccgtcgac cagtcaccgc gggcgacctg aagtgcgcgg gcgctatcac cgccctgctg 780  
cgcgacgcga tcaaccgaa cctggtgcag accctgggcg gcaactcccgc cctggtgcac 840  
ggcgggcctt tcgccaacat cgcgcacggc tgtaactctc tgatcgcaac caccacggcg 900  
ctggatctat cagaagttgt gctgaccgag gctggtttcg gcagcgacct gggcgcgag 960  
aagttcttcg acatcaagtc ccgcgctggc gacctcgacg tcgcccgaac ggttggtggtg 1020  
gccaccatcc gttcgtgaa gcacaacggc gattccgtgt tgaaggccgg tctggccaac 1080  
ctggagcgcc acgtcagtaa catccgcaag ttcggcgtgg aaccctggtt ggcgctgaa 1140  
ctgtttagct ccgataaccgc cgcggagcgc tctatggtcg ccgattgggg cgagcagttc 1200  
ggtgtgcgcg tggaggagtg cagcgtgtgg gctgagggcg gtgccggcgc ggcggatctg 1260  
gccactgcgg tgetggaggt cgttgatggt gtttctgatg aggacgcctc cagctccagc 1320  
caccagatct atcagcccgt cgatggcgtg gaagccacc tgcacacact tgccacggaa 1380  
atctacggcg cggcggatgt gcagttcggc ccgcaggtc tgaaggacct ggcgtttctg 1440  
aaggacaacg gctgggacaa gctgccagtg tgcgtgctga agacacagta ctccttcagc 1500  
gatgaccca gcgcgctggg cgcgccgagc ggccacacc tgcatgtccg cgagctggtg 1560  
ccacgcatcg gcgccggatt cgtggtggct ctcaccggcg acgtgatgac tctgccgggt 1620  
ctgccgaaga aaccgcgagc cgagcgtatt gatgtgaac gcaggggggt tatctcgggg 1680  
ctgttctaa 1689

<210> 2

<211> 562

5 <212> PRT

<213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 2

ES 2 517 394 T3

Met Thr Asn Ser Ser Ala Thr Ser Asn Pro Gln Pro Ser Asp Val Glu  
 1 5 10 15

Ile Ala Gln Ala His Thr Leu Glu Pro Ile Thr Thr Ile Ala Glu Arg  
 20 25 30

Ala Gly Ile Pro Glu Ala Ala Leu Ile Pro Tyr Gly Arg Thr Lys Ala  
 35 40 45

Lys Ile Asp Val Pro Ala Leu Arg Ala Glu Arg Glu Gly Val Asn Lys  
 50 55 60

Lys Gly Lys Leu Val Leu Val Thr Ala Met Ser Pro Thr Pro Ala Gly  
 65 70 75 80

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

Ala Gly Arg Gln Thr Met Val Ala Ile Arg Glu Pro Ser Gln Gly Pro  
 100 105 110

Val Met Gly Ile Lys Gly Gly Ala Ala Gly Gly Gly Tyr Ala Gln Ile  
 115 120 125

Val Pro Met Glu Asp Ile Asn Leu His Phe Thr Gly Asp Met His Ala  
 130 135 140

Ile Thr Ala Ala Thr Asn Thr Leu Ala Ala Met Val Asp Asn His Val  
 145 150 155 160

Gln His Gly Asn Ala Leu Gly Ile Asp Pro Arg Arg Val Thr Trp Arg  
 165 170 175

Arg Cys Leu Asp Val Asn Asp Arg Ser Leu Arg His Val Val Thr Gly  
 180 185 190

ES 2 517 394 T3

Leu Gly Gly Pro Gly Gln Gly Thr Pro Arg Glu Gly Gly Phe Asp Ile  
 195 200 205

Thr Ala Ala Ser Glu Ile Met Ala Ile Leu Cys Leu Ala Thr Asp Leu  
 210 215 220

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

Asp Arg Arg Pro Val Thr Ala Gly Asp Leu Lys Cys Ala Gly Ala Ile  
 245 250 255

Thr Ala Leu Leu Arg Asp Ala Ile Asn Pro Asn Leu Val Gln Thr Leu  
 260 265 270

Gly Gly Thr Pro Ala Leu Val His Gly Gly Pro Phe Ala Asn Ile Ala  
 275 280 285

His Gly Cys Asn Ser Leu Ile Ala Thr Thr Thr Ala Leu Asp Leu Ser  
 290 295 300

Glu Val Val Leu Thr Glu Ala Gly Phe Gly Ser Asp Leu Gly Ala Glu  
 305 310 315 320

Lys Phe Phe Asp Ile Lys Ser Arg Ala Gly Asp Leu Asp Val Ala Ala  
 325 330 335

Thr Val Val Val Ala Thr Ile Arg Ser Leu Lys His Asn Gly Asp Ser  
 340 345 350

Val Leu Lys Ala Gly Leu Ala Asn Leu Glu Arg His Val Ser Asn Ile  
 355 360 365

Arg Lys Phe Gly Val Glu Pro Val Val Ala Leu Asn Leu Phe Ser Ser  
 370 375 380

Asp Thr Ala Ala Glu Arg Ser Met Val Ala Asp Trp Gly Glu Gln Phe  
 385 390 395 400

Gly Val Arg Val Val Glu Cys Ser Val Trp Ala Glu Gly Gly Ala Gly  
 405 410 415

Ala Ala Asp Leu Ala Thr Ala Val Leu Glu Val Val Asp Gly Val Ser  
 420 425 430

Asp Glu Asp Ala Ser Ser Ser Ser His Gln Ile Tyr Gln Pro Val Asp  
 435 440 445

ES 2 517 394 T3

Gly Val Glu Ala Thr Leu His Thr Leu Ala Thr Glu Ile Tyr Gly Ala  
 450 455 460

Ala Asp Val Gln Phe Gly Pro Gln Ala Leu Lys Asp Leu Ala Phe Leu  
 465 470 475 480

Lys Asp Asn Gly Trp Asp Lys Leu Pro Val Cys Val Ser Lys Thr Gln  
 485 490 495

Tyr Ser Phe Ser Asp Asp Pro Ser Ala Leu Gly Ala Pro Ser Gly His  
 500 505 510

Thr Leu His Val Arg Glu Leu Val Pro Arg Ile Gly Ala Gly Phe Val  
 515 520 525

Val Ala Leu Thr Gly Asp Val Met Thr Leu Pro Gly Leu Pro Lys Lys  
 530 535 540

Pro Ala Ala Glu Arg Ile Asp Val Asn Ala Gln Gly Val Ile Ser Gly  
 545 550 555 560

Leu Phe

<210> 3

<211> 192

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> promotor P3119 = PSOD

<400> 3

gagctgccaa ttattccggg cttgtgaccc gctaccgat aaataggtcg gctgaaaaat 60

ttcgttgcaa tatcaacaaa aaggcctatc attgggaggt gtcgcaccaa gtacttttgc 120

gaagcgccat ctgacggatt ttcaaaagat gtatatgctc ggtgcggaag cctacgaaag 180

gattttttac cc 192

10 <210> 4

<211> 184

<212> ADN

<213> artificial

<220>

15 <223> promotor P497 = PgroES

<400> 4

ggctcgagcgg cttaaagttt ggctgccatg tgaattttta gcaccctcaa cagttgagtg 60

ctggcactct cgggggtaga gtgccaaata ggttgtttga cacacagttg ttcacccgcg 120

acgacggctg tgctggaaac ccacaaccgg cacacacaaa atttttctca tggagggatt 180

catc 184

ES 2 517 394 T3

<210> 5  
 <211> 199  
 <212> ADN  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> promotor P1284 = PEFTU  
 <400> 5

ggccgttacc ctgcgaatgt ccacagggta gctggtagtt tgaaatcaa cgccgttgcc	60
cttaggattc agtaactggc acattttgta atgcgctaga tctgtgtgct cagtcttcca	120
ggctgcttat cacagtgaaa gcaaaaccaa ttcgtggctg cgaaagtcgt agccaccacg	180
aagtccagga ggacataca	199

<210> 6

10 <211> 114  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> promotor ... = lpR

15 <400> 6

gtcgactcat acgttaaate taccaccgca agggataaat atctaaccacc gtgcgtggtg	60
actatatttac ctctggcggg gataatgggt gcatgtacta aggaggatta atta	114

<210> 7

<211> 915  
 <212> ADN

20 <213> *Corynebacterium glutamicum*  
 <400> 7

atgaccccga gttctcctga agttcgtaat cgtccgagcg ctgocgctga agagcgtcag	60
tttgtgctca cttttggctg ccctgactcc actggaattg tggcgaagt gtcgtcgttc	120
ctagctgagc gtggggggtg gattactgag gctggatatt tcacggatcc tgattcgaat	180
tggttcttta ctgctcaggc gattcgcgct gagtcgattg ataccacgat tgagcagttg	240
cgggaggagt tcgctccgct tgcggaggag ttccggcccga gggctaagtg gagtttact	300
gacactgcgc aggtgaagaa ggctgtggtt ttggtgtcta aggagggcca ctgcttgcac	360
gatttgtagt gtcgtgtggc tgagaatgat tatccgatgg aagttgttgc ggttggggg	420
aacctgaga acttgcgta tattgcggag aaccataatg ttccgttttt ccatgtgccg	480
tttcctaagg atgcggttgg taagcggag gcgtttgacc aggtcgctga gattgtgaat	540
ggttatgatc cggatgcgat tgttttgct cgttttatgc agattttgcc gccggatttg	600
tgtgagatgt gggctggctg tgtgttgaat attcatcaca gtttcttgc gtcgtttatg	660
gggtgcgcgc cgtatcatca ggcgtatagc cgtgggtgtga agttgattgg tgcgacctgc	720

ES 2 517 394 T3

cattatgcga ctggggatct ggatgatggt ccgatcattg agcaggatgt tattcgtgtg 780  
 acccataagg atacgccgac tgagatgcag cgtttgggcc gcgatgcgga gaagcaggtg 840  
 ctggctcgcg gtttgcgttt ccacttggag gaccgggtgc tggtttacgg taaccgcacg 900  
 gttgtctttg attaa 915

<210> 8

<211> 304

5 <212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 8

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

ES 2 517 394 T3

Met Gln Ile Leu Pro Pro Asp Leu Cys Glu Met Trp Ala Gly Arg Val  
 195 200 205

Leu Asn Ile His His Ser Phe Leu Pro Ser Phe Met Gly Ala Arg Pro  
 210 215 220

Tyr His Gln Ala Tyr Ser Arg Gly Val Lys Leu Ile Gly Ala Thr Cys  
 225 230 235 240

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

Val Ile Arg Val Thr His Lys Asp Thr Pro Thr Glu Met Gln Arg Leu  
 260 265 270

Gly Arg Asp Ala Glu Lys Gln Val Leu Ala Arg Gly Leu Arg Phe His  
 275 280 285

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

<210> 9

<211> 2952

<212> ADN

5 <213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 9

atgtcttctg cagctactcg ccgtaattca gcccccttgc ttcagcgcca catcgccca 60  
 aaccaggccg ataccagga gatcctcgat tacctgggct atgaatcttc cgccgcgctg 120  
 gccgacgatg ccctccgaa gtcgatccgc caggcaggcc cgatcggcct gccggaggca 180  
 ctggatgaga cggacaccct ggccgccttg cgtgcttacg ctgacaagaa cgtgcagaag 240  
 cagcagctga tcggcaacgg ttacttcgac acgatcactc cggccgtgat tcgccgaac 300  
 gtggtggaga acccgggctg gtacaccgcc tacaccct accagccgga aatctccag 360  
 gggcgctcg aggcctgct gaacttcag acgatggtgc aggacctgac cggcctgcca 420  
 gtggccggtg cttcgtggtt agacgaagcc accgcagtg cggaggcctg gcagctgatg 480  
 gctcgccgca atgcgaagc tgccaagaag ggcggcgtgg tgcctgctgga ttcctcctg 540  
 caccagcagt ccatcaccgt aacctggcg cgcgctgagg ctgcgggtat cccggtggag 600  
 gtcgtggacc tggacggcga agatgetacc gccgcgttg agggcgcga gaacctcgtc 660  
 ggcgtggtgc tttccaacce cggetccacc ggccgcgtcc gcgacctgtc cggctgatc 720  
 tctcgccgca aggagaccgg cgctctggtg acggctcgtt gtgacctgct ggctcaggtt 780  
 ctggtgacct ccccggtct ccaaggtgcc gacattgctg tcggctccgc ccagcgcttc 840  
 ggcgtgccgc tattcttcgg tgcccgcac gcgggcttca tctcctgcac cgaggctctg 900  
 cagcgtgaag tgcccggccg catcgtgggc gtgtccgtgg atgccgagg caccgcc 960

ES 2 517 394 T3

taccgcttgg ctctgcagac ccgtgagcag cacattcgcc gcgacaagge caccagtaac 1020  
atctgtaccg etcaggetct getggccgtc gttgccgggt tctacgcggg etggcacggc 1080  
ccagccggcc tgcgcgccat cgccgagggg gtgcacgccc gcgcgaccgc cctggccggt 1140  
gccctgtccg aggctggcct gacgctggcg cacgatacct tcttcgacac cgtcacccgtt 1200  
gacgtgtctg gttcttctct tggtgacgcc cccacggctc tgcgcgccgc agccgaggca 1260  
ggctacaacc tgcgccagggt taacgattcc ttcgtcggca tctctgtcgg cgagtccacc 1320  
acggacgagg acattgccaa getgatcgag gtgctggggt cccgcaccgg cgaggccaac 1380  
tccgcgagct tcgacgtcac cgccggcccg ctgggcgagg ccggcgtgct gcgcgcgagg 1440  
gacgaggaga ttctgacca cccgatcttc accgccatca cttccgagac ccagatgatg 1500  
cgctacatgc gcaagctggc cgaccgcgac ctggcgctgg atcgtacgat gatcccgtg 1560  
ggctcctgca ccatgaagct gaacgcggcc gtctccatgg agccgatcac ctggcctggc 1620  
ttcgcaggca tccaccgca cgtcccggcc gagcaggcgc agggctggct ggagctcacc 1680  
gaggacctgg aggagcgctt ggccaagatc accggctacg ccaaggtttc cgtccagccg 1740  
aacgcgggct cccagggcga gttcgccggc ctgctggcga tccaccgcta ccaccagtcc 1800  
cgcggcgacg atcagcgtga catcgttctg atcccggcct ccgcgcaccg caccaacgct 1860  
gcctctgcag cgctggcggg cctgaaggtc gtggctgtga agaagtcga agacggctcc 1920  
atcagcgtgc cggacctgga ggccaagctg gagaagtacg gcgagcagac cgccgccacc 1980  
atgetgacct acccctccac ccacggcgtg ttcgaggagc aggtgcgcga cgtctgccag 2040  
aaggttcacg acgctggcgg ccagggtgtac gtgcagcggc ctaacctgaa cgccctggtc 2100  
ggcctggccc agccgggcca gttcggcggc gacgtatccc acctgaacct gcacaagacc 2160  
ttcaccatcc cgcacgggtg tggcggcccg ggcggtggcc cgggtgtgctt ggcagagcac 2220  
ctgatcccgt tcctgcccac cgaccgcaac gccgacgta tcgagggcga tgctgccctg 2280  
cagtcggccc agccggtctc cggcgcgcag tacggctccg ctggcgtgct gccgatcacc 2340  
tggctcctaca tcgcacagat gggcgacgaa ggctgactg aggcctcccg catggccctg 2400  
gtgaacgcca actacgtttc ccgcaagctg gaggactact acccgacgct gtacaagggc 2460  
gacaccggcc tggtcgccc aagagtcatc ctggacctgc gtgaactcac gaaggcctcc 2520  
ggcatcaccg ccgaggacgt atccaagcgc ctgatggact tcggcttcca cgccccgacc 2580  
ttggccttcc cggtcgccc caccctgatg atggagccca ccgagtcgga ggacaaggaa 2640  
gagctggacc gcttcatcga agcagatgat accatccacg gggagatcca ggaagttacc 2700  
gacggcaagg tcaccgccga acagtccgtt ctgcgccacg cgcggtttac cgcctattct 2760  
gttgtcgggg acgacttcca ggaagetgta tccggtggtc acttcagccg tgccaaggcc 2820  
gcatacccgg tggctagcct gcgacacacc aagtacttca ccccgtgcg tcgtatcgac 2880  
  
aacgcctatg gcgaccgcaa tctcgtgtgc acctgcccgc ccctggaaga cttcgcaatt 2940  
aacgaggact ag 2952

<210> 10

5 <211> 983

<212> PRT

ES 2 517 394 T3

<213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 10

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

His Ile Gly Pro Asn Gln Ala Asp Thr Gln Glu Ile Leu Asp Tyr Leu  
 20 25 30

Gly Tyr Glu Ser Ser Ala Ala Leu Ala Asp Asp Ala Leu Pro Lys Ser  
 35 40 45

Ile Arg Gln Ala Gly Pro Ile Gly Leu Pro Glu Ala Leu Asp Glu Thr  
 50 55 60

Asp Thr Leu Ala Ala Leu Arg Ala Tyr Ala Asp Lys Asn Val Gln Lys  
 65 70 75 80

Gln Gln Leu Ile Gly Asn Gly Tyr Phe Asp Thr Ile Thr Pro Ala Val  
 85 90 95

Ile Arg Arg Asn Val Val Glu Asn Pro Gly Trp Tyr Thr Ala Tyr Thr  
 100 105 110

Pro Tyr Gln Pro Glu Ile Ser Gln Gly Arg Leu Glu Ala Leu Leu Asn  
 115 120 125

Phe Gln Thr Met Val Gln Asp Leu Thr Gly Leu Pro Val Ala Gly Ala  
 130 135 140

Ser Leu Leu Asp Glu Ala Thr Ala Val Ala Glu Ala Val Gln Leu Met  
 145 150 155 160

Ala Arg Gly Asn Ala Lys Ala Ala Lys Lys Gly Gly Val Val Leu Leu  
 165 170 175

Asp Ser Ser Leu His Gln Gln Ser Ile Thr Val Thr Leu Ala Arg Ala  
 180 185 190

Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val Glu Val Val Asp Leu Asp Gly Glu Asp  
 195 200 205

Ala Thr Ala Ala Phe Glu Gly Arg Glu Asn Leu Val Gly Val Val Leu



ES 2 517 394 T3

Asp Glu Glu Ile Leu Thr His Pro Ile Phe Thr Ala Ile Thr Ser Glu  
 485 490 495

Thr Gln Met Met Arg Tyr Met Arg Lys Leu Ala Asp Arg Asp Leu Ala  
 500 505 510

Leu Asp Arg Thr Met Ile Pro Leu Gly Ser Cys Thr Met Lys Leu Asn  
 515 520 525

Ala Ala Val Ser Met Glu Pro Ile Thr Trp Pro Gly Phe Ala Gly Ile  
 530 535 540

His Pro His Val Pro Ala Glu Gln Ala Gln Gly Trp Leu Glu Leu Ile  
 545 550 555 560

Glu Asp Leu Glu Glu Arg Leu Ala Lys Ile Thr Gly Tyr Ala Lys Val  
 565 570 575

Ser Val Gln Pro Asn Ala Gly Ser Gln Gly Glu Phe Ala Gly Leu Leu  
 580 585 590

Ala Ile His Arg Tyr His Gln Ser Arg Gly Asp Asp Gln Arg Asp Ile  
 595 600 605

Val Leu Ile Pro Ala Ser Ala His Gly Thr Asn Ala Ala Ser Ala Ala  
 610 615 620

Leu Ala Gly Leu Lys Val Val Ala Val Lys Asn Ala Glu Asp Gly Ser  
 625 630 635 640

Ile Asp Val Pro Asp Leu Glu Ala Lys Leu Glu Lys Tyr Gly Glu Gln  
 645 650 655

Thr Ala Ala Ile Met Leu Thr Tyr Pro Ser Thr His Gly Val Phe Glu  
 660 665 670

Glu Gln Val Arg Asp Val Cys Gln Lys Val His Asp Ala Gly Gly Gln  
 675 680 685

Val Tyr Val Asp Gly Ala Asn Leu Asn Ala Leu Val Gly Leu Ala Gln  
 690 695 700

Pro Gly Glu Phe Gly Gly Asp Val Ser His Leu Asn Leu His Lys Thr  
 705 710 715 720

Phe Thr Ile Pro His Gly Gly Gly Gly Pro Gly Val Gly Pro Val Cys  
 725 730 735

ES 2 517 394 T3

Val Ala Glu His Leu Ile Pro Phe Leu Pro Thr Asp Pro Asn Ala Asp  
740 745 750

Val Ile Glu Gly Asp Ala Ala Leu Gln Ser Gly Gln Pro Val Ser Gly  
755 760 765

Ala Gln Tyr Gly Ser Ala Gly Val Leu Pro Ile Thr Trp Ser Tyr Ile  
770 775 780

Ala Gln Met Gly Asp Glu Gly Leu Thr Glu Ala Ser Arg Met Ala Leu  
785 790 795 800

Val Asn Ala Asn Tyr Val Ser Arg Lys Leu Glu Asp Tyr Tyr Pro Thr  
805 810 815

Leu Tyr Lys Gly Asp Thr Gly Leu Val Ala His Glu Cys Ile Leu Asp  
820 825 830

Leu Arg Glu Leu Thr Lys Ala Ser Gly Ile Thr Ala Glu Asp Val Ser  
835 840 845

Lys Arg Leu Met Asp Phe Gly Phe His Ala Pro Thr Leu Ala Phe Pro  
850 855 860

Val Ala Gly Thr Leu Met Met Glu Pro Thr Glu Ser Glu Asp Lys Glu  
865 870 875 880

Glu Leu Asp Arg Phe Ile Glu Ala Met Ile Thr Ile His Gly Glu Ile  
885 890 895

Gln Glu Val Ile Asp Gly Lys Val Thr Ala Glu Gln Ser Val Leu Arg  
900 905 910

His Ala Pro Phe Thr Ala Tyr Ser Val Val Arg Asp Asp Phe Glu Glu  
915 920 925

Ala Val Ser Gly Gly His Phe Ser Arg Ala Lys Ala Ala Tyr Pro Val  
930 935 940

Ala Ser Leu Arg His Thr Lys Tyr Phe Thr Pro Val Arg Arg Ile Asp  
945 950 955 960

Asn Ala Tyr Gly Asp Arg Asn Leu Val Cys Thr Cys Pro Pro Leu Glu  
965 970 975

Asp Phe Ala Ile Asn Glu Asp  
980

<210> 11

<211> 384

<212> ADN

5 <213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 11

ES 2 517 394 T3

atgactgcac tgccaactga cttcctgtac tccgaagagc acgagtgggt taacacctcc 60  
gctgttggtg agggcgagac cgtgcgcgtg ggcattaccc acatcgccgc tgaggcgctg 120  
ggtgacatcg tgttcgtcga gctgccggag gttggctccg aggttgaggc cggcgaggct 180  
ttcggcgagg ttgagtccac caagtccggt tccgacatct acgcaccggt ttctggcgag 240  
gttgtggctg tcaacgaggc gctggaagac aacgctggcc tgatcaacga agatccatac 300  
ggtgagggct ggctgtacga ggtcaagggt accgaggccg gcgagctgat ggaggctgag 360  
gcttaccagg cggctaacga gtaa 384

<210> 12

<211> 127

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 12

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

<210> 13

<211> 1170

10 <212> ADN

<213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 13

ES 2 517 394 T3

atgaccgaac ttaagaagac cgcgctgcac ctggtgcacg agaagttggg cgcgcgattt 60  
accgacttcg gcgctggga catgcctctg aagtacagca gtgagctgga cgagcaccac 120  
gctgtacgca atgccctggg cgtattcgac ctctcccaca tgggtgaggt tcgcgtgacc 180  
ggcccgcagg cagcggagtt cctggaccac gcgctgattt cgaagctgtc ggcagtgaag 240  
gtcggcaagg cgaagtactc gatgatctgc accgaatccg gtggcatcat cgacgacctg 300  
atcacctacc gcctgggcca caacgagttc ctgatctgtc cgaacgcggg caacgtggac 360  
aacgtggtct ccgcactgca gggcccgcacc gagggctttg acgtggaggt taacaacgag 420  
tccgatgcga cctccatgat cgccgtacag gggcccaagg ccgcgcaggc gatgctggag 480  
atcgtggaga acgtcgtgga tgcacccgag gcatccggcg cgggcgagac cgttgccgag 540  
gctatcgagg ggctgggta ctacgcggca ttcagcggtg ttgccgcagg tcagcccgtg 600  
ctggtggccc gcacaggcta taccggcgag gacggtttcg agctgatcgt ggctaaccgat 660  
ggtgcggaga ccgtgtggac caaggctatg gaccaggctg cgcagctggg tggcctgccg 720  
tgtggcctgg cctgcgcgca caccctgcgc ctggaggctg gcatgccgct gtacggcaac 780  
gagctatcgc tgaagctcac cccggtcgat gctgggctgg gcattcttgc ggcgacgaag 840  
tctaaggact ctttcggttg tcgtgacgcc atcgtttccg ccaaggaaaa gggtaaccag 900  
caggtactta tcgggtggc gggcgagggc cgccgcgctg cccgtggggg atacgaggtg 960  
tttgccggtg acggcgagaa ggccatcggg gccgtgacct ccggtgcaact gtcgccgacg 1020  
ctgggccacc cgggtggcatt ggcatacgtc gcgaagtccg cagtgtcctc cgccgcggcc 1080  
gctgaggggtg cgaccgtgga ggtagacatc cgccgcaagc gctttgaata caaggttgtg 1140  
gcgctgccgt tctactcccg cgagaagtaa 1170

<210> 14

<211> 389

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 14

Met Thr Glu Leu Lys Lys Thr Ala Leu His Leu Val His Glu Lys Leu  
1 5 10 15

Gly Ala Arg Phe Thr Asp Phe Gly Gly Trp Asp Met Pro Leu Lys Tyr  
20 25 30

Ser Ser Glu Leu Asp Glu His His Ala Val Arg Asn Ala Val Gly Val  
35 40 45

Phe Asp Leu Ser His Met Gly Glu Val Arg Val Thr Gly Pro Gln Ala  
50 55 60

ES 2 517 394 T3

Ala Glu Phe Leu Asp His Ala Leu Ile Ser Lys Leu Ser Ala Val Lys  
65 70 75 80

Val Gly Lys Ala Lys Tyr Ser Met Ile Cys Thr Glu Ser Gly Gly Ile  
85 90 95

Ile Asp Asp Leu Ile Thr Tyr Arg Leu Gly Asp Asn Glu Phe Leu Ile  
100 105 110

Val Pro Asn Ala Gly Asn Val Asp Asn Val Val Ser Ala Leu Gln Gly  
115 120 125

Arg Thr Glu Gly Phe Asp Val Glu Val Asn Asn Glu Ser Asp Ala Thr  
130 135 140

Ser Met Ile Ala Val Gln Gly Pro Lys Ala Ala Gln Ala Met Leu Glu  
145 150 155 160

Ile Val Glu Asn Val Val Asp Ala Pro Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu  
165 170 175

Thr Val Ala Glu Ala Ile Glu Gly Leu Gly Tyr Tyr Ala Ala Phe Ser  
180 185 190

Gly Val Ala Ala Gly Gln Pro Val Leu Val Ala Arg Thr Gly Tyr Thr  
195 200 205

Gly Glu Asp Gly Phe Glu Leu Ile Val Ala Asn Asp Gly Ala Glu Thr  
210 215 220

Val Trp Thr Lys Ala Met Asp Gln Ala Ala Gln Leu Gly Gly Leu Pro  
225 230 235 240

Cys Gly Leu Ala Cys Arg Asp Thr Leu Arg Leu Glu Ala Gly Met Pro  
245 250 255

Leu Tyr Gly Asn Glu Leu Ser Leu Lys Leu Thr Pro Val Asp Ala Gly  
260 265 270

Leu Gly Ile Leu Ala Ala Thr Lys Ser Lys Asp Ser Phe Val Gly Arg  
275 280 285

Asp Ala Ile Val Ser Ala Lys Glu Lys Gly Thr Gln Gln Val Leu Ile  
290 295 300

Gly Leu Ala Gly Glu Gly Arg Arg Ala Ala Arg Gly Gly Tyr Glu Val  
305 310 315 320

Phe Ala Gly Asp Gly Glu Lys Ala Ile Gly Ala Val Thr Ser Gly Ala

ES 2 517 394 T3

325

330

335

Leu Ser Pro Thr Leu Gly His Pro Val Ala Leu Ala Tyr Val Ala Lys  
 340 345 350

Ser Ala Val Ser Ser Gly Ala Ala Ala Glu Gly Ala Thr Val Glu Val  
 355 360 365

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

Tyr Ser Arg Glu Lys  
 385

<210> 15

<211> 1017

<212> ADN

5 <213> *Escherichia coli*

<400> 15

atgtccacat tacgcctgct catctctgac tcttacgacc cgtgggttaa cctggcgggtg 60  
 gaagagtgta tttttcgcca aatgcccgcc acgcagcgcg ttctgtttct ctggcgcaat 120  
 gccgacacgg tagtaattgg tcgcgcgag aaccctgga aagagtgtaa taccggcg 180  
 atggaagaag ataactccg cctggcgcg cgcagtagcg gtggcggcgc ggtgttcac 240  
 gatctcgga atacctgctt tacctttatg gctggcaagc cggagtacga taaaactatc 300  
 tccacgtcga ttgtgctcaa tgcgctgaac gcgctcggcg tcagcgccga agcgtccgga 360  
 cgtaacgatc tgggtgtgaa aaccgtcgaa ggcgaccgca aagtctcagg ctccgcctat 420  
 cgcgaaacca aagatcggcg cttccaccac ggcacctgac tactcaatgc cgacctcagc 480  
 cgcttgcaa actatctcaa tccgataaa aagaaactgg cggcgaaagg cattacgtcg 540  
 gtacgttccc gcgtgaccaa cctcaccgag ctggtgccgg ggatcaccca tgagcaggtt 600  
 tgcgaggcca taaccgaggc ctttttcgcc cattatggcg agcgcgtgga agcggaaatc 660  
 atctccccga acaaaaagcc agacttgcca aacttcgccg aaacctttgc ccgccagagt 720  
 agctgggaat ggaacttcgg tcaggtccg gcattctcgc atctgctgga tgaacgcttt 780  
 acctggggcg gcgtggaact gcatttcgac gttgaaaaag gccatatcac ccgcgcccag 840  
 gtgtttaccg acagcctcaa ccccgcgccg ctggaagccc tcgcccagc actgcaaggc 900  
 tgcctgtacc gcgcagatat gctgcaacag gagtgcaag cgctgttggt tgacttcccg 960  
 gaacaggaaa aagagctacg ggagttatcg gcatggatgg cgggggctgt aaggtag 1017

<210> 16

<211> 338

10 <212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 16

ES 2 517 394 T3

Met Ser Thr Leu Arg Leu Leu Ile Ser Asp Ser Tyr Asp Pro Trp Phe  
1 5 10 15

Asn Leu Ala Val Glu Glu Cys Ile Phe Arg Gln Met Pro Ala Thr Gln  
20 25 30

Arg Val Leu Phe Leu Trp Arg Asn Ala Asp Thr Val Val Ile Gly Arg  
35 40 45

Ala Gln Asn Pro Trp Lys Glu Cys Asn Thr Arg Arg Met Glu Glu Asp  
50 55 60

Asn Val Arg Leu Ala Arg Arg Ser Ser Gly Gly Gly Ala Val Phe His  
65 70 75 80

Asp Leu Gly Asn Thr Cys Phe Thr Phe Met Ala Gly Lys Pro Glu Tyr  
85 90 95

Asp Lys Thr Ile Ser Thr Ser Ile Val Leu Asn Ala Leu Asn Ala Leu  
100 105 110

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

Val Glu Gly Asp Arg Lys Val Ser Gly Ser Ala Tyr Arg Glu Thr Lys  
130 135 140

Asp Arg Gly Phe His His Gly Thr Leu Leu Leu Asn Ala Asp Leu Ser  
145 150 155 160

Arg Leu Ala Asn Tyr Leu Asn Pro Asp Lys Lys Lys Leu Ala Ala Lys  
165 170 175

Gly Ile Thr Ser Val Arg Ser Arg Val Thr Asn Leu Thr Glu Leu Leu  
180 185 190

Pro Gly Ile Thr His Glu Gln Val Cys Glu Ala Ile Thr Glu Ala Phe  
195 200 205

Phe Ala His Tyr Gly Glu Arg Val Glu Ala Glu Ile Ile Ser Pro Asn  
210 215 220

Lys Thr Pro Asp Leu Pro Asn Phe Ala Glu Thr Phe Ala Arg Gln Ser  
225 230 235 240

Ser Trp Glu Trp Asn Phe Gly Gln Ala Pro Ala Phe Ser His Leu Leu  
245 250 255

ES 2 517 394 T3

Asp Glu Arg Phe Thr Trp Gly Gly Val Glu Leu His Phe Asp Val Glu  
 260 265 270

Lys Gly His Ile Thr Arg Ala Gln Val Phe Thr Asp Ser Leu Asn Pro  
 275 280 285

Ala Pro Leu Glu Ala Leu Ala Gly Arg Leu Gln Gly Cys Leu Tyr Arg  
 290 295 300

Ala Asp Met Leu Gln Gln Glu Cys Glu Ala Leu Leu Val Asp Phe Pro  
 305 310 315 320

Glu Gln Glu Lys Glu Leu Arg Glu Leu Ser Ala Trp Met Ala Gly Ala  
 325 330 335

Val Arg

<210> 17

<211> 1050

<212> ADN

5 <213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 17

atgagtgatga cgcagatgg acgccgatg ctacgcatcg aggcgaagaa tgccgaaacc 60  
 cccatcgagt cgaagcctcg gtggatccgc acgaccgcga aggtcggccc ggagtatcgg 120  
 gatattaaga atcgcgtgaa gggcgtggc ctgcacaccg tgtgccaaga ggctggctgc 180  
 ccgaatatca acgagtctg ggaggaccgc gaggcgacgt tcctcatcgg cggtgatcgg 240  
 tgttcccgcc gttgcgactt ctgccagatt aagtccggcc gcccgctccc gctggatcgg 300  
 gacgagccac gccgcgtggc ggagaatgct cgcgagatgg gtctgcgcta cgccaccatc 360  
 accggcgtga cgcgcgatga cctggatgat gagggcgcgt ggctgtatgc cgaggttgtg 420  
 aagaagattc acgagctgaa cccgaacacg ggtgtggaga atctgacgcc agatTTTTCC 480  
 aaccgcccgg agctgctgaa ggtcgtcttc gattcccagc cggaggtggt tgcccacaac 540  
 ctggagacag ttccgcgcat ctttaagcgc atccgcccgg cctttaagta cgaccgttcc 600  
 ctggagggtca ttcaggcagc tcacgattac ggctgtgga cgaagtccaa cctgatcctg 660  
 ggcattgggtg agaagaagga agaggtccgc gcggctatca aggacctggc agacgccggc 720  
 accgacattc tgacgattac ccagtaacctg cgcctctctt ccatgcacca cccgattgag 780  
 cgttgggtga agccggagga gttcatggag cactccgacg cagcctacga gctgggcatc 840  
 aaggctgtta tgtccggccc gttggtgcgt tcctcttacc gcgccggccg cctgtacgcg 900  
 caggccaagc aggcgcgagg cgaggctatt ccggagaacc tgaagcactt ggaggagact 960  
 ctcgattcca ccacgtcgca ggaggcctct aactgctgg agcgtacgg cgcttcggag 1020  
 gacacgccgg tcaactgcgtc gcgccgctag 1050

<210> 18

10 <211> 349

<212> PRT

<213> *Corynebacterium jeikeium*

ES 2 517 394 T3

<400> 18

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

Asn Ala Glu Thr Pro Ile Glu Ser Lys Pro Arg Trp Ile Arg Thr Thr  
 20 25 30

Ala Lys Val Gly Pro Glu Tyr Arg Asp Ile Lys Asn Arg Val Lys Gly  
 35 40 45

Ala Gly Leu His Thr Val Cys Gln Glu Ala Gly Cys Pro Asn Ile Asn  
 50 55 60

Glu Cys Trp Glu Asp Arg Glu Ala Thr Phe Leu Ile Gly Gly Asp Thr  
 65 70 75 80

Cys Ser Arg Arg Cys Asp Phe Cys Gln Ile Lys Ser Gly Arg Pro Ser  
 85 90 95

Pro Leu Asp Met Asp Glu Pro Arg Arg Val Ala Glu Asn Val Arg Glu  
 100 105 110

Met Gly Leu Arg Tyr Ala Thr Ile Thr Gly Val Thr Arg Asp Asp Leu  
 115 120 125

Asp Asp Glu Gly Ala Trp Leu Tyr Ala Glu Val Val Lys Lys Ile His  
 130 135 140

Glu Leu Asn Pro Asn Thr Gly Val Glu Asn Leu Thr Pro Asp Phe Ser  
 145 150 155 160

Asn Arg Pro Glu Leu Leu Lys Val Val Phe Asp Ser Gln Pro Glu Val  
 165 170 175

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

Pro Ala Phe Lys Tyr Asp Arg Ser Leu Glu Val Ile Gln Ala Ala His  
 195 200 205

Asp Tyr Gly Leu Val Thr Lys Ser Asn Leu Ile Leu Gly Met Gly Glu  
 210 215 220

ES 2 517 394 T3

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

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

His Pro Ile Glu Arg Trp Val Lys Pro Glu Glu Phe Met Glu His Ser  
260 265 270

Asp Ala Ala Tyr Glu Leu Gly Ile Lys Ala Val Met Ser Gly Pro Leu  
275 280 285

Val Arg Ser Ser Tyr Arg Ala Gly Arg Leu Tyr Ala Gln Ala Lys Gln  
290 295 300

Ala Arg Gly Glu Ala Ile Pro Glu Asn Leu Lys His Leu Glu Glu Thr  
305 310 315 320

Leu Asp Ser Thr Thr Ser Gln Glu Ala Ser Thr Leu Leu Glu Arg Tyr  
325 330 335

Gly Ala Ser Glu Asp Thr Pro Val Thr Ala Ser Arg Arg  
340 345

<210> 19

<211> 759

<212> ADN

5 <213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 19

atgggattcc agcaaggcag catccgcaaa gcaaacatgg gcacaaccgg cactaacgac 60  
ggggcaacca ccccaccagc caacaccagc accccagccg tagacatcga cgtccgcgac 120  
ctgggcaccg tggactacga ggacacttgg cacctccagg caaatctcgc cgcccagcgc 180  
gccgaagaaa aaatcccaga caccatcctc ctactccagc atccgccgac gtacaccgcc 240  
ggcaagcgca cccaggattc cgaccgccct accaacggcc tgccagtagt cgacgtcgac 300  
cgcgagggcc gcatcacctg gcatggacce ggccagttag tgcatatcc catcatcaag 360  
ctggccgacc cgggtggacgt ggtcgattat gtccgcccgc tggagcaggc gctaatecag 420  
acttgtgaag atcttggcct gcacggcacc ggccgcgtag aggggcgttc gggcgtgtgg 480  
ctgcctgcgg gcgtcattaa tggcgagctc aagcccgcac gtaagatagc cgcgatcggc 540  
atccgcgtga cgcgcgccgt gaccatgcac ggagtggccc tcaactgcga taacaccatg 600  
gagtattacg accacattgt gccttgggg ctggcgggatg cgggtgtcac gacgctcacc 660  
gaggagctgg ggcgcgatgt tagtgtttct gacgcctact catccctcgc ccacaacctc 720  
gttgatgctt tgaacggcga cttgccggtg cattcctag 759

<210> 20

<211> 252

10 <212> PRT

<213> *Corynebacterium jeikeium*

ES 2 517 394 T3

<400> 20

Met Gly Phe Gln Gln Gly Ser Ile Arg Lys Ala Asn Met Gly Thr Thr  
 1 5 10 15

Gly Thr Asn Asp Gly Ala Thr Thr Pro Pro Ala Asn Thr Ser Thr Pro  
 20 25 30

Ala Val Asp Ile Asp Val Arg Asp Leu Gly Thr Val Asp Tyr Glu Asp  
 35 40 45

Thr Trp His Leu Gln Ala Asn Leu Ala Ala Gln Arg Ala Glu Glu Lys  
 50 55 60

Ile Pro Asp Thr Ile Leu Leu Leu Gln His Pro Pro Thr Tyr Thr Ala  
 65 70 75 80

Gly Lys Arg Thr Gln Asp Ser Asp Arg Pro Thr Asn Gly Leu Pro Val  
 85 90 95

Val Asp Val Asp Arg Gly Gly Arg Ile Thr Trp His Gly Pro Gly Gln  
 100 105 110

Leu Val Ala Tyr Pro Ile Ile Lys Leu Ala Asp Pro Val Asp Val Val  
 115 120 125

Asp Tyr Val Arg Arg Leu Glu Gln Ala Leu Ile Gln Thr Cys Glu Asp  
 130 135 140

Leu Gly Leu His Gly Thr Gly Arg Val Glu Gly Arg Ser Gly Val Trp  
 145 150 155 160

Leu Pro Ala Gly Val Ile Asn Gly Glu Leu Lys Pro Ala Arg Lys Ile  
 165 170 175

Ala Ala Ile Gly Ile Arg Val Thr Arg Gly Val Thr Met His Gly Val  
 180 185 190

Ala Leu Asn Cys Asp Asn Thr Met Glu Tyr Tyr Asp His Ile Val Pro  
 195 200 205

Cys Gly Leu Ala Asp Ala Gly Val Thr Thr Leu Thr Glu Glu Leu Gly  
 210 215 220

Arg Asp Val Ser Val Ser Asp Ala Tyr Ser Ser Leu Ala His Asn Leu  
 225 230 235 240

Val Asp Ala Leu Asn Gly Asp Leu Pro Val His Ser  
 245 250

<210> 21

5 <211> 7070

<212> ADN

<213> artificial

<220>

ES 2 517 394 T3

<223> Plásmido pH273

<400> 21

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttgg agaاتcatga	60
cctcagcatc tgccccaagc ttaaccccg gcaagggtcc cggctcagca gtcggaattg	120
cccttttagg attcggaaaca gtcggcactg aggtgatgcg tctgatgacc gagtacggtg	180
atgaacttgc gcaccgcatt ggtggccac tggaggttcg tggcattgct gtttctgata	240
tctcaaagcc acgtgaaggc gttgcacctg agctgctcac tgaggacgct tttgcactca	300
tcgagcgcga ggatgttgac atcgtcgttg aggttatcgg cggcattgag taccacagt	360
aggtagtctc cgcagctctg aaggccggca agtctgtgtg taccccaat aaggctcttg	420
ttgcagctca ctctgctgag cttgctgatg cagcggaaac cgcaaactt gacctgtact	480
tcgaggctgc tgttgcaagg gcaattccag tggttggccc actgcgtcgc tccctggctg	540
gcatcagat ccagtctgtg atgggcatcg ttaacggcac caccaacttc atcttgacg	600
ccatggattc caccggcgtc gactatgcag attctttggc tgaggcaact cgtttgggtt	660
acgccgaagc tgatccaact gcagacgtcg aaggccatga cgcgcacatcc aaggctgcaa	720
ttttggcatc catcgtcttc cacaccgtg ttaccgcgga tgatgtgtac tgcgaaggta	780
tcagcaacat cagcgtgccc gacattgagg cagcacagca ggaggccac accatcaagt	840
tgttgcccat ctgtgagaag ttcaccaaca aggaaggaaa gtcggctatt tctgctcgcg	900
tgacccgac tctattacct gtgtcccacc cactggcgtc ggtaaacaag tcctttaatg	960
caatctttgt tgaagcagaa gcagctggtc gcctgatggt ctacggaaac ggtgcaggtg	1020
gcgcgccaac cgcgtctgct gtgcttggcg acgtcgttgg tgccgcacga aacaagggtc	1080
acgttgcccg tgctccaggc gagtccacct acgctaacct gccgatcgtc gatttcggtg	1140
agaccaccac tcgttaccac ctcgacatgg atgtggaaga tcgctggggg gttttggctg	1200
aattggctag cctgttctct gagcaaggaa tcttctcgcg tacaatccga caggaagagc	1260
gcatgatga tgcacgtctg atcgtggtca cccactctgc gctggaatct gatcttccc	1320
gcaccgttga actgctgaag gctaagcctg ttgttaaggc aatcaacagt gtgatccgcc	1380
tcgaaagga ctaattttac tgacatggca attgaactga acgtcggctg taaggttacc	1440
gtcacggtac ctggatcttc tgcaaacctc ggacctggct ttgacacttt aggtttgca	1500

ES 2 517 394 T3

ctgtcggtat acgacactgt cgaagtggaa attattccat ctggcttggga agtgggaagt 1560  
 tttggcgaag gccaaaggcga agtccctctt gatggctccc acctgggtgtt taaagctatt 1620  
 cgtgctggcc tgaaggcagc tgacgctgaa gttcctggat tgcgagtggg gtgccacaac 1680  
 aacattccgc agtctcgtgg tcttggctcc tctgctgcag cggcggttgc tgggtttgct 1740  
 gcagctaatt gtttggcggg tttcccctg actcaagagc agattgttca gttgtcctct 1800  
 gcctttgaag gccaccacaga taatgctgcg gcttctgtgc tgggtggagc agtgggtgctg 1860  
 tggacaaaac tgtctatcga cggcaagagc cagccacagt atgctgctgt accacttgag 1920  
 gtgcaggaca atattcgtgc gactgcgctg gttcctaatt tccacgcac caccgaagct 1980  
 gtgcgccgag tccttcccac tgaagtcact cacatcgatg cgcgatttaa cgtgtcccgc 2040  
 gttgcagtga tgatcgttgc gttgcagcag cgtcctgatt tgctgtggga gggactcctg 2100  
 gaccgtctgc accagcctta tcgtgcagaa gtgttgccca ttacctctga gtgggtaaac 2160  
 cgcctgcgca accgtggcta cgcggcatac ctttccggtg ccggcccaac cgccatggtg 2220  
 ctgtccactg agccaattcc agacaagggt ttggaagatg ctctgtagtc tggcattaag 2280  
 gtgcttgagc ttgaggttgc gggaccagtc aaggttgaag ttaaccaacc ttaggcccaa 2340  
 caaggaaggc ccccttcgaa tcaagaaggg ggccttatta gtgcagcaat tattcgtgta 2400  
 acacgtgaac cttacaggtg cccggcgcgt tgagtggttt gagttccagc tggatgcggt 2460  
 tgttttcacc gaggtttct tggatgaate cggcgtggat ggcgcagacg aaggctgatg 2520  
 ggcgtttgtc gttgaccaca aatgggcagc tgtgtagagc gagggagtth gcttcttcgg 2580  
 tttcgggtgg gtcaaagccc atttcgcgga ggcggttaat gagcggggag agggcttctg 2640  
 cgagtctctc ggcttcggcg tggttaatgc ccatgacgtg tgcccactgg gttccgatgg 2700  
 aaagtgcttt ggcgcggagg tcgggggtgt gcattgcgtc atcgtcgaca tcgccgagca 2760  
 tgttgcccat gagttcgatc aggggtgatg attccttggc gacagcgcgg ttgtcgggga 2820  
 cgcgtgtttg gaagatgagg gaggggcggg atcctctaga cccgggattt aaatcgctag 2880  
 cggctgctta aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc 2940  
 ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc 3000  
 aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa 3060  
 gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct ctggttaagg tgggaagccc tgcaaagtaa 3120  
 actgatggc tttcttgcg ccaaggatct gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag 3180  
 agacaggatg aggatcgttt cgcattgatt aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3240  
 ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3300  
 atgcgccgtt gttccgctg tcagcgcagg ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc 3360  
 tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3420

ES 2 517 394 T3

cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcaactga agcgggaagg gactggctgc 3480  
 tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag 3540  
 tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtc tgatccggct acctgcccat 3600  
 tcgaccacca agcgaacat cgcacgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 3660  
 tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3720  
 ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct 3780  
 tgccgaatat catggtgaa aatggccgct tttctgatt catcgactgt ggccggctgg 3840  
 gtgtggcga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg tgatattgct gaagagcttg 3900  
 gcggcgaatg gggtgaccgc ttctcctgctc tttacgggat cgcggctccc gattcgcagc 3960  
 gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaat 4020  
 gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 4080  
 tgaaaagggtg ggcttcggaa tegtcttcg ggacgcggc tggatgatcc tccagcggg 4140  
 ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaa 4200  
 taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgtca 4260  
 ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg 4320  
 taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaggcc 4380  
 agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgcctgc gtttttccat aggctccgcc 4440  
 cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtacagc gtggcgaaac ccgacaggac 4500  
 tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct 4560  
 tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata 4620  
 gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc 4680  
 acgaaccccc cgttcagccc gaccgctcgc ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 4740  
 acccgtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 4800  
 cgaggatgt aggcgggtct acagagttct tgaagtgtg gcctaactac ggctacacta 4860  
 gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 4920  
 gtagctcttg atccggcaaa caaacaccgc ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 4980  
 agcagattac gcgagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 5040  
 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatctt ggtcatgaga ttatcaaaaa 5100  
 ggatcttcac ctatgcctt ttaaaggcgc gccgcggccg ccatcgcatc tttcttttgc 5160  
 gtttttattt gtttaactgtt aattgtcctt gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg 5220  
 tttcttgc tttgatgtc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctcgt 5280  
 agaatcctct gtttgcata tagctttaa tcacgacatt gtttccttc ccttgaggta 5340  
 cagcgaagtg tgagtaagta aaggttcatc cgttaggatc aagatccatt tttaacacaa 5400

ES 2 517 394 T3

ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca 5460  
 tgtaaatatc gttagacgta atgccgtcaa tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga 5520  
 acaggtagca tttgcggttc attttaaaga cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg 5580  
 tgttagatgc aatcagcggg ttcactcactt ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa 5640  
 tcataccgag agcgcggttt gctaactcag ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt 5700  
 tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag 5760  
 attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt 5820  
 ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt 5880  
 tgccttcate gatgaactgc tgtacatttt gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg 5940  
 atttataatc ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt 6000  
 gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac 6060  
 ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttcttgtgtt tggcttttta 6120  
 ggatagaatc atttgcatcg aatttgcgcg tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc 6180  
 agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt gatagaacat gtaaactgat gtgtcatccg 6240  
 catttttagg atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag 6300  
 tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga 6360  
 tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt 6420  
 cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg 6480  
 gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag 6540  
 taaagggtta tactgttgct tgttttgcaa actttttgat gttcatcgtt catgtctcct 6600  
 tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt 6660  
 tagttacgca caataaaaa agacctaaaa tatgtaaggg tgacgcgcaa agtatacact 6720  
 ttgcccttta cacatttttag gtcttgctg ctttatcagt aacaaaccg cgcgatttac 6780  
 ttttcgacct cattctatta gactctcggt tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt 6840  
 gtttgataga aaatcataaa aggatttgca gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta 6900  
 tctgtttctt ttcattctct gtatttttta tagtttctgt tgcattggca taaagttgcc 6960  
 tttttaatca caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg 7020  
 caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg gcggccgctc gatttaaatc 7070

<210> 22

<211> 7070

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pH373

<400> 22

ES 2 517 394 T3

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttgg agaatacatga 60  
 cctcagcatc tgccccaaagc ttttaaccccc gcaaggggtcc cggctcagca gtcggaattg 120  
 cccttttagg attcggaaaca gtcggcactg aggtgatgcg tctgatgacc gagtacgggtg 180  
 atgaacttgc gcaccgcatt ggtggcccac tggaggttcg tggcattgct gtttctgata 240  
 tctcaaagcc acgtgaaggc gttgcacctg agctgctcac tgaggacgct tttgcactca 300  
 tcgagcgcga ggatgttgac atcgtcgttg aggttatcgg cggcattgag taccacacgtg 360  
 aggtagtctc cgcagctctg aaggccggca agtctgttgt taccgccaat aaggtctctg 420  
 ttgcagctca ctctgctgag cttgctgatg cagcggaaagc cgcaaactgt gacctgtact 480  
 tcgaggctgc tgttgcaaggc gcaattccag tggttggccc actgcgtcgc tccttggtg 540  
 gcgatcagat ccagtctgtg atgggcatcg ttaacggcac caccaacttc atcttgagc 600  
 ccattggattc caccggcgtc gactatgcag attccttggc tgaggcaact cgtttgggtt 660  
 acgccgaagc tgatccaact gcagacgtcg aaggccatga cgcgcgatcc aaggtgcaa 720  
 ttttggcatc categctttc cacaccctg taccgcgga tgatgtgtac tgcgaaggta 780  
 tcagcaacat cagcgtctgc gacattgagg cagcacagca ggcaggccac accatcaagt 840  
 tgttggccat ctgtgagaag ttcaccaaca aggaagaaa gtcggctatt tctgctcgcg 900  
 tgcacccgac tctattacct gtgtcccacc cactggcgtc ggtaaacaag tcctttaatg 960  
 caatctttgt tgaagcagaa gcagctggtc gcctgatgtt ctacggaaac ggtgcaggtg 1020  
 gcgcgccaac cgcgtctgct gtgcttggcg acgtcgttgg tgcgcacga aacaagggtc 1080  
 acggtggccg tgctccaggt gagtccacct acgtaacct gccgatcgtc gatttcgggtg 1140  
 agaccaccac tcgttaccac ctgcacatgg atgtggaaga tcgcgtgggg gttttggctg 1200  
 aattggctag cctgttctct gagcaaggaa tcttctcgcg tacaatccga caggaagagc 1260  
 gcgatgatga tgcacgtctg atcgtggtea cccactctgc getggaatct gatctttccc 1320  
 gcaccgttga actgctgaag gctaagcctg ttgttaaggc aatcaacagt gtgatccgcc 1380  
 tcgaaagga ctaattttac tgacatggca attgaaactga acgtcggteg taaggttacc 1440  
 gtcacggtac ctggatcttc tgcaaacctc ggacctggct ttgacacttt aggtttggca 1500  
 ctgtcggtat acgacactgt cgaagtggaa attattccat ctggcttggc agtgggaagt 1560  
 tttggcgaag gccaaaggca agtccctctt gatggctccc acctggtggt taaagctatt 1620  
 cgtgctggcc tgaaggcagc tgacgtgaa gttcctggat tgcgagtggc gtgccacaac 1680  
 aacattccgc agtctcgtgg tcttggctcc tctgctgcag cggcggttgc tgggtttgct 1740  
 gcagetaatg gtttggcgga tttcccctg actcaagagc agattgttca gttgtcctct 1800  
 gcctttgaag gccaccacaga taatgctgcg gcttctgtgc tgggtggagc agtgggtgctg 1860  
 tggacaaatc tgtctatcga cggcaagagc cagccacagt atgctgctgt accacttgag 1920

ES 2 517 394 T3

gtgcaggaca atattcgtgc gactgcgctg gttcctaatt tccacgcac caccgaaget 1980  
 gtgcgccgag tccttcccac tgaagtcact cacatcgatg cgcgatttaa cgtgtcccgc 2040  
 gttgcagtga tgatcgttgc gttgcagcag cgtcctgatt tgctgtggga gggactcgt 2100  
 gaccgtctgc accagcctta tcgtgcagaa gtgttgccca ttacctctga gtgggtaaac 2160  
 cgcttgcga accgtggcta cgcggcatac ctttccggtg ccggcccaac cgccatggtg 2220  
 ctgtccactg agccaattcc agacaagggt ttggaagatg ctctgtgagtc tggcattaag 2280  
 gtgcttgagc ttgaggttgc gggaccagtc aaggttgaag ttaaccaacc ttaggcccac 2340  
 caaggaaggc ccccttcgaa tcaagaaggg ggccttatta gtgcagcaat tattcgtctga 2400  
 acacgtgaac cttacagggt cccggcgcgt tgagtggttt gagttccagc tggatgcggt 2460  
 tgttttcacc gaggttttct tggatgaatc cggcgtggtt ggcgcagacg aaggctgatg 2520  
 ggcgtttgtc gttgaccaca aatgggcagc tgtgtagagc gagggagttt gcttcttcgg 2580  
 tttcgggtggg gtcaaagccc atttcgcgga ggcgggtaat gagcggggag agggcttctg 2640  
 cgagtcttc ggcttcggcg tggttaatgc ccatgacgtg tgcccactgg gttccgatgg 2700  
 aaagtgcttt ggcgcggagg tcggggttgt gcattgcgtc atcgtcgaca tcgccgagca 2760  
 tgttgcccat gagttcgatc aggggtgatg attctttggc gacagcgcgg ttgtcgggga 2820  
 cgcgtgtttg gaagatgagg gaggggcggg atcctctaga cccgggattt aaatcgctag 2880  
 cggctgctta aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc 2940  
 ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgc aagagaaagc 3000  
 aggtagcttg cagtgggctt acatggcgtg agctagactg ggcgggtttt tggacagcaa 3060  
 gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct ctggtaagggt tgggaagccc tgcaaagtaa 3120  
 actggatggc tttcttgccg ccaaggatct gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag 3180  
 agacaggatg aggatcgctt cgcgatattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3240  
 ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3300  
 atgccgccgt gttccggtg tcagcgcagg ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc 3360  
 tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3420  
 cggcgcttc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3480  
 tattgggga agtgccgggg caggatctcc tgctcatctca ccttgctcct gccgagaaa 3540  
 tatccatcat ggctgatgca atgcccgggc tgcatacgtg tgatccggtt acctgccc 3600  
 tcgaccacca agcgaacat cgcacgcagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 3660  
 tcgatcagga tgatctggac gaagagcacc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3720  
 ggctcaaggc gcgcatgcc gacggcgagg atctcgtcgt gaccatggc gatgcctgct 3780  
 tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg 3840

ES 2 517 394 T3

gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg tgatattgct gaagagcttg 3900  
 gcggggaatg ggetgaccgc ttcctcgtgc tttacggat cgcgctccc gattcgcagc 3960  
 gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 4020  
 gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc acgagatttc gattccaccg cgccttcta 4080  
 tgaaggttg ggcttcgaa tcgttttccg ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg 4140  
 ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtaa 4200  
 taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgtca 4260  
 ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg 4320  
 taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 4380  
 agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc 4440  
 ccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtacagc gtggcgaaac ccgacaggac 4500  
 tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacc 4560  
 tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata 4620  
 gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc 4680  
 acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 4740  
 acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 4800  
 cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgtg gcctaactac ggctacacta 4860  
 gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 4920  
 gtagctcttg atccggcaaa caaacaccgc ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc 4980  
 agcagattac gcgcaaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 5040  
 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 5100  
 ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg gcgcggccg ccatcggcat tttcttttgc 5160  
 gtttttattt gttaaactgtt aattgtcctt gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg 5220  
 ttttcttgc tttgatgttc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt 5280  
 agaatcctct gtttgtcata tagctttaa tcacgacatt gtttccttc gcttgaggta 5340  
 cagcgaagtg tgagtaagta aaggttcatc cgttaggatc aagatccatt ttaacacaa 5400  
 ggcagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca 5460  
 tgtaaatac gttagacgta atgccgcaa tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga 5520  
 acaggtacca tttgccgttc attttaaaga cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg 5580  
 tgtagatgc aatcagcggc ttcacactt tttcagtggt gtaatcatcg tttagctcaa 5640  
 tcataccgag agcgcgctt gctaactcag ccgtgcgtt ttatcgtt tgcagaagtt 5700  
 tttgacttcc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgcata gtatgctttg ttaaataaag 5760  
 attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc cagtgtttgc ttcaataact aagtatttgt 5820

ES 2 517 394 T3

ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt 5880  
 tgccttcate gatgaactgc tgtacatfff gatacgtfff tccgtcaccg tcaaagattg 5940  
 atttataatc ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt 6000  
 gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac 6060  
 ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttettgtgtt tggcttttta 6120  
 ggatagaatc atttgcatcg aatttgcgc tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc 6180  
 agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt gatagaacat gtaaactgat gtgcatccg 6240  
 catttttagg atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag 6300  
 tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga 6360  
 tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata tttttcattt ttttgcgtgt 6420  
 cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatggt tccttatatg 6480  
 gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag 6540  
 taaaggtaa tactgttgct tgttttgcaa actttttgat gttcatcggt catgtctcct 6600  
 tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt 6660  
 tagttacgca caataaaaa agacctaaaa tatgtaaggg tgacgccaa agtatacact 6720  
 ttgcccttta cacatttttag gtcttgctct ctttatcagt aacaaaccg cgcgatttac 6780  
 ttttcgacct cattctatta gactctcggt tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt 6840  
 gtttgataga aaatcataaa aggatttgca gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta 6900  
 tctgtttcct ttcatctctc gtatftttta tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc 6960  
 tttttaatca caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg 7020  
 caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg cgggccgctc gatttaaatc 7070

<210> 23

<211> 8766

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pH304

<400> 23

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtaacca cgcgtcatat gactagtctg gacctagggg 60  
 tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatctctc aactaatgca 120  
 gcgatgcgtt ctttccagaa tgetttcatg acagggatgc tgtcttgatc aggcaggcgt 180  
 ctgtgctgga tgccgaagct ggatttattg tcgcctttgg aggtgaagtt gacgctcact 240  
 cgagaatcat cggccaacca tttggcattg aatgttctag gttcggaggc ggaggtttcc 300  
 tcaattagtg cgggatcgag ccaactgcgcc cgcaggteat cgtctccgaa gagcttccac 360

ES 2 517 394 T3

actttttcga cggcagggtt aagggttttg gaggcattgg ccgcaaccc atcgctggtc 420  
atccccgggtt tgcgcatgcc acgttcgtat tcataaccaa tcgcatgcc ttgagccac 480  
cagccactga catcaaagtt gtccacgatg tgetttgcga tgtgggtgtg agtccaagag 540  
gtggctttta cgtcgtcaag caatttttagc cactcttccc acggctttcc ggtgccgttg 600  
aggatagctt caggggacat gcctgggtgt gagccttgcg gaggggagtc agtcatgccga 660  
ccgagactag tggcgttttg ggtaccgggc cccccctoga ggtcgagcgg cttaaagttt 720  
ggctgccatg tgaattttta gcaccctcaa cagttgagtg ctggcactct cgggggtaga 780  
gtgccaaata ggttgtttga cacacagttg ttcacccgcg acgacggctg tgctggaac 840  
ccacaaccgg cacacacaaa atttttctca tggagggtt catcatgtcg acttcagtta 900  
cttcaccagc ccacaacaac gcacattcct ccgaattttt ggatgcgttg gcaaaccatg 960  
tgttgatcgg cgacggcgcc atgggcaccc agctccaagg ctttgacctg gacgtggaaa 1020  
aggatttctt tgatctggag ggggtaatg agattctcaa cgacaccgc cctgatgtgt 1080  
tgaggcagat tcaccgcgcc tactttgagg cgggagctga cttggttgag accaatactt 1140  
ttggttgcaa cctgccgaac ttggcggatt atgacatcgc tgatcgttgc cgtgagcttg 1200  
cctacaaggg cactgcagtg gctagggag tggtgatga gatggggccg ggccgaaacg 1260  
gcatcggcgg tttcgtggtt ggttcctgg gagctggaac gaagcttcca tcgctgggccc 1320  
atgcaccgta tgcagatttg cgtgggcact acaaggaagc agcgttggc atcatcgacg 1380  
gtggtggcga tgcctttttg attgagactg ctcaggactt gcttcaggtc aaggctcggg 1440  
ttcacggcgt tcaagatgcc atggctgaac ttgatacatt cttgccatt atttgccacg 1500  
tcaccgtaga gaccaccggc accatgctca tgggttctga gatcgggtgcc gcgttgacag 1560  
cgctgcagcc actgggtatc gacatgattg gtctgaactg cgccaccggc ccagatgaga 1620  
tgagcgagca cctgcgttac ctgtccaagc acgccgatat tcctgtgtcg gtgatgccta 1680  
acgcaggctt tcctgtcctg ggtaaaaacg gtgcagaata cccacttgag gctgaggatt 1740  
tggcgcaggc gctggctgga ttcgtctccg aatatggcct gtccatggtg ggtggttggt 1800  
gtggcaccac acctgagcac atccgtgcgg tccgcatgc ggtggttggt gttccagagc 1860  
aggaaacctc cactgacc aagatccctg caggccctgt tgagcaggcc tcccgcgagg 1920  
tggagaaaga ggactccgtc gcgtcgtgt acacctcgtt gccattgtcc caggaaaccg 1980  
gcatttccat gatcgggtgag cgcaccaact ccaacggttc caaggcattc cgtgaggcaa 2040  
tgctgtctgg cgattgggaa aagtgtgtgg atattgcaa gcagcaaacc cgcgatggtg 2100  
cacacatgct ggatctttgt gtggattacg tgggacgaga cggcaccgcc gatatggcga 2160  
ccttggcagc acttcttctt accagctcca ctttgccaat catgattgac tccaccgagc 2220  
cagaggttat tcgcacaggc cttgagcact tgggtggacg aagcatcgtt aactccgtca 2280  
actttgaaga cggcgtatggc cctgagctcc gctaccagcg catcatgaaa ctggtaaagc 2340

ES 2 517 394 T3

agcacggtgc ggccgtggtt gcgctgacca ttgatgagga aggccaggca cgtaccgctg 2400  
 agcacaaggt gcgcattgct aaacgactga ttgacgatat caccggcagc tacggcctgg 2460  
 atatcaaaga catcgttgtg gactgcctga ccttcccgat ctctactggc caggaagaaa 2520  
 ccaggcgaga tggcattgaa accatcgaag ccatccgcga gctgaagaag ctctaccag 2580  
 aaatccacac caccctgggt ctgtccaata tttccttcgg cctgaaccct gctgcacgcc 2640  
 aggttcttaa ctctgtgttc ctcaatgagt gcattgaggc tggctctggac tctgcgattg 2700  
 cgcacagctc caagatthttg ccgatgaacc gcattgatga tcgccagcgc gaagtggcgt 2760  
 tggatatggt ctatgatcgc cgcaccgagg attacgatcc gctgcaggaa ttcatgcagc 2820  
 tgtttgaggg cgtttctgct gccgatgcca aggatgctcg cgcctgaacag ctggccgcta 2880  
 tgcctttgtt tgagcgtttg gcacagcgca tcatcgacgg cgataagaat ggccttgagg 2940  
 atgatctgga agcaggcatg aaggagaagt ctccatttgc gatcatcaac gaggaccctc 3000  
 tcaacggcat gaagaccgtg ggtgagctgt ttggttcagg acagatgcag ctgccattcg 3060  
 tgetgcaatc ggcagaaacc atgaaaactg cgggtggccta tttggaaccg ttcattggaag 3120  
 aggaagcaga agctaccgga tctgcgcagg cagagggcaa gggcaaaatc gtcgtggcca 3180  
 ccgtcaaggg tgacgtgcac gatatcggca agaacttggg ggacatcatt ttgtccaaca 3240  
 acggttacga cgtggtgaac ttgggcatca agcagccact gtccgccatg ttggaagcag 3300  
 cggagaagaaca caaagcagac gtcacatcgga tgtcgggact tcttgtgaag tccaccgtgg 3360  
 tgatgaagga aaaccttgag gagatgaaca acgccggcgc atccaattac ccagtcattt 3420  
 tgggtggcgc tgcgctgacg cgtacctacg tggaaaacga tctcaacgag gtgtacaccg 3480  
 gtgaggtgta ctacgccctg gatgctttcg agggcctcgc cctgatggat gaggtgatgg 3540  
 cagaaaagcg tgggtgaagga cttgatccca actcaccaga agctattgag caggcgaaga 3600  
 agaaggcgga acgtaaggct cgtaatgagc gttcccgcaa gattgccgcg gacgtaaaag 3660  
 ctaatgcggc tcccgtgatt gttccggagc gttctgatgt ctccaccgat actccaaccg 3720  
 cggcaccacc gttctgggga acccgcatth tcaagggtct gcccttggcg gaggttcttg 3780  
 gcaaccttga tgagcgcgcc ttgttcatgg ggcagtgggg tctgaaatcc acccgggca 3840  
 acgaggttcc aagctatgag gatttggtgg aaactgaagg ccgaccacgc ctgcgctact 3900  
 ggctggatcg cctgaagtct gagggcattt tggaccacgt gcccttgggtg tatggctact 3960  
 tcccagcggg cgcggaaggc gatgacgtgg tgatcttggg atccccgat ccacacgcag 4020  
 ccgaacgcac gcgcttttagc ttcccacgcc agcagcgcgg caggttcttg tgcatcgcgg 4080  
 atttcattcg cccacgcgag caagctgtca aggacggcca agtggacgtc atgccattcc 4140  
 agctggtcac catgggtaat cctattgctg atttcgcaa cgagttgttc gcagccaatg 4200  
 aataccgcga gtacttgga gttcacggca tcggcgtgca gctcaccgaa gcattggccg 4260

ES 2 517 394 T3

agtactggca ctcccgagtg cgcagcgaac tcaagctgaa cgacgggtgga tctgtcgtg 4320  
 attttgatcc agaagacaag accaagttct tcgacctgga ttaccgcggc gcccgcttct 4380  
 cctttgggta cggttcttgc cctgatctgg aagaccgcgc aaagctggtg gaattgctcg 4440  
 agccaggccg tatcggcgtg gagttgtccg aggaactcca gctgcacca gagcagtcca 4500  
 cagacgcgtt tgtgtcttac caccagagg caaagtactt taacgtctaa tctagaccgg 4560  
 ggatttaaat cgctagcggg ctgctaaagg aagcgggaaca cgtagaaagc cagtccgcag 4620  
 aaacgggtgt gaccccgat gaatgtcagc tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca 4680  
 agcgcaaaga gaaagcaggt agcttgacgt gggttacat ggcgatagct agactgggcg 4740  
 gttttatgga cagcaagcga accggaattg ccagctgggg cgccctctgg taaggttggg 4800  
 aagccctgca aagtaaactg gatggcttct ttgccgcaa ggatctgatg gcgcagggga 4860  
 tcaagatctg atcaagagac aggatgagga tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg 4920  
 cacgcaggtt ctccggccgc ttgggtggag aggtattctg gctatgactg ggcaacaacag 4980  
 acaatcgget gctctgatgc cgcctgttcc cggctgtcag cgcagggcg gccggttctt 5040  
 tttgtcaaga ccgacctgtc cgtgcccctg aatgaactgc aggacgagc agcgcggcta 5100  
 tcgtggetgg ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg 5160  
 ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt 5220  
 gctcctgccg agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat 5280  
 ccggtacct gccattcga ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg 5340  
 atggaagccg gtcttgctga tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca 5400  
 gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc atgcccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc 5460  
 catggcgtg cctgcttccc gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc 5520  
 gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc taccctgat 5580  
 attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc 5640  
 gctcccgat cgcagcgcac cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga 5700  
 ctctgggggt cgaaatgacc gaccaagcga cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt 5760  
 ccaccgccgc cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga 5820  
 tgatcctcca gcgcgggat ctcatgctgg agttcttccg ccacgctagc ggcgcgccgg 5880  
 ccggcccgtt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct 5940  
 tccgcttctc cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatca 6000  
 gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac 6060  
 atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt gctggcgttt 6120  
 ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg 6180  
 cgaaaaccga caggactata aagataccag gcggttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc 6240

ES 2 517 394 T3

tctcctgttc cgaccctgcc gcttacegga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaage 6300  
 gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg cgctcgctcc 6360  
 aagctgggct gtgtgcacga acccccctt cagcccagacc gctgcgctt atccggtaac 6420  
 tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt 6480  
 aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct 6540  
 aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc 6600  
 ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtggt 6660  
 tttttgttt gcaagcagca gattacgcbc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg 6720  
 atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc 6780  
 atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa aggccggccg cggccgcat 6840  
 cggcattttc ttttgcgttt ttatttgta actgttaatt gtccttgttc aaggatgctg 6900  
 tctttgacaa cagatgtttt cttgcctttg atgttcagca ggaagctcgg cgcaaacgtt 6960  
 gattgtttgt ctgcgtagaa tcctctgttt gtcatatagc ttgtaatcac gacattgttt 7020  
 cctttcgctt gaggtacagc gaagtgtgag taagtaaagg ttacatcgtt aggatcaaga 7080  
 tccattttta acacaaggcc agttttgttc agcggcttgt atgggccagt taaagaatta 7140  
 gaaacataac caagcatgta aatatcgta gacgtaatgc cgtcaatcgt catttttgat 7200  
 ccgccccagt cagtgaacag gtaccatttg ccgttcattt taaagacgtt cgcgcgttca 7260  
 attcatctg ttactgtggt agatgcaatc agcggtttca tcaacttttt cagtgtgtaa 7320  
 tcatcgttta gtcfaatcat accgagagcg ccgtttgcta actcagccgt gcgtttttta 7380  
 tcgctttgca gaagtttttg actttcttga cggagaatg atgtgctttt gccatagtat 7440  
 gctttgtaa ataaagattc ttcgccttg tagccatctt cagttccagt gtttgcttca 7500  
 aatactaagt atttgtggcc tttatcttct acgtagtgag gatctctcag cgtatggttg 7560  
 tcgcctgagc tgtagtggcc ttcacatgat aactgctgta cattttgata cgtttttccg 7620  
 tcaccgtcaa agattgattt ataatcctct acaccgttga tgttcaaaga gctgtctgat 7680  
 gctgatacgt taactgtgtc agttgtcagt gtttgtttgc cgtaatgttt accggagaaa 7740  
 tcagtgtaga ataaacggat ttttccgtca gatgtaaatg tggctgaacc tgaccattct 7800  
 tgtgtttggt cttttaggat agaatcattt gcategaatt tgtcgtgctc tttaaagacg 7860  
 cggccagcgt ttttccagct gtcaatagaa gtttcgccga ctttttgata gaacatgtaa 7920  
 atcgatgtgt catccgcatt tttaggatct ccggctaata caaagacgat gtggtagccg 7980  
 tgatagtttg cgacagtgcc gtcagcgttt tgtaatggcc agctgtccca aacgtccagg 8040  
 ccttttgtag aagagatatt ttttaattgtg gacgaatcaa attcagaaac ttgatatttt 8100  
 tcattttttt gctgttcagg gatttgcagc atatcatggc gtgtaatatg ggaaatgccg 8160

ES 2 517 394 T3

tatgtttcct tatatggcct ttggttcgtt tctttcgcaa acgcttgagt tgcgcctcct 8220  
gcccagcagtg cggtagtaaa ggtaataact gttgcttggt ttgcaaactt tttgatgttc 8280  
atcgttcatg tctccttttt tatgtactgt gttagcggtc tgcttcttcc agccctcctg 8340  
tttgaagatg gcaagttagt tacgcacaat aaaaaaagac ctaaaatatg taaggggtga 8400  
cgccaaagta tacactttgc cttttacaca ttttaggtct tgcttgcttt atcagtaaca 8460  
aaccgcgcg atttactttt cgacctcatt ctattagact ctcgtttga ttgcaactgg 8520  
tctattttcc tcttttggtt gatagaaaa cataaaagga tttgcagact acgggcctaa 8580  
agaactaaaa aatctatctg tttcttttca ttctctgtat tttttatagt ttctggtgca 8640  
tgggcataaa gttgcctttt taatcacaat tcagaaaata tcataatate tcatttcact 8700  
aaataatagt gaacggcagg tatatgtgat gggtaaaaa ggatcggcgg ccgctcgatt 8760  
taaate 8766

<210> 24

<211> 7070

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pH399

<400> 24

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtagca cgcgtcatat gactagttgg agaactcatga 60  
cctcagcatc tgccccaaagc ttttaacccc gcaaggggtcc cggctcagca gtcggaattg 120  
cccttttagg attcggaaaca gtcggcactg aggtgatgcg tctgatgacc gagtacgggtg 180  
atgaacttgc gcaccgcatt ggtggccac tggaggttcg tggcattgct gtttctgata 240  
tctcaaagcc acgtgaaggc gttgcacctg agctgctcac tgaggacgct tttgcaactca 300  
tcgagcgcga gggatgtgac atcgtcgttg aggttatcgg cggcattgag taccacagtg 360  
aggtagttct cgcagctctg aaggccggca agtctgttgt taccgccaat aaggctcttg 420  
ttgcagctca ctctgctgag cttgctgatg cagcggaaagc cgcaaactgt gacctgtact 480  
tcgaggctgc tgttgcaggc gcaattccag tggttggccc actgcgtcgc tccctggctg 540  
gcatcagat ccagctctgt atgggcatcg ttaacggcac caccaacttc atcttgagc 600  
ccatggattc caccggcgct gactatgcag attccttggc tgaggcaact cgtttgggtt 660  
acgcgaagc tgatccaact gcagacgtc aaggccatga cgcgcaccc aaggctgcaa 720  
ttttggcatc categcttcc cacaccgctg ttaccgcgga tgatgtgtac tgcgaaggta 780  
tcagcaaat cagcgtgcc gacattgagg cagcacagca ggcaggccac accatcaagt 840  
tgttggccat ctgtgagaag ttcaccaaca aggaagaaa gtcggctatt tctgctcgcg 900  
tgaccccgac tctattacct gtgtcccacc cactggcgtc ggtaaacaag tcctttaatg 960  
caatctttgt tgaagcagaa gcagctggtc gcctgatgtt ctacggaaac ggtgcaggtg 1020

ES 2 517 394 T3

gcgcgccaac cgcgtctgct gtgcttggcg acgtcgttgg tgccgcacga aacaaggtgc 1080  
 acggtggccg tgctccaggt gagtccacct acgctaacct gccgatcget gatttcggtg 1140  
 agaccaccac tcgttaccac ctcgacatgg atgtggaaga tcgcgtgggg gttttggctg 1200  
 aattggctag cctgttctct gagcaaggaa tcttcctgcg tacaatccga caggaagagc 1260  
 gcgatgatga tgcacgtctg atcgtggta cccactctgc gctggaatct gatcttcc 1320  
 gcaccggtga actgctgaag gctaagcctg ttgttaaggc aatcaacagt gtgatccgcc 1380  
 tcgaaagggg ctaattttac tgacatggca attgaactga acgtcggteg taaggttacc 1440  
 gtcacggtac ctggatcttc tgcaaacctc ggacctggct ttgacacttt aggtttggca 1500  
 ctgctgggat acgacactgt cgaagtgga attattccat ctggcttga agtggagtt 1560  
 tttggcgaag gccaaaggcg agtccctctt gatggctccc acctgggtgt taaagctatt 1620  
 cgtgctggcc tgaaggcagc tgacgtgaa gttcctggat tgcgagtggg gtgccacaac 1680  
 aacattccgc agtctcgtgg tcttggctcc gctgctgcag cggcggttgc tgggtgtgct 1740  
 gcagctaata gtttggcgga tttcccctg actcaagagc agattgttca gttgtcctct 1800  
 gcctttgaag gccaccaga taatgctgcg gcttctgtgc tgggtggagc agtgggtgctg 1860  
 tggacaaatc tgtctatcga cggcaagagc cagccacagt atgctgctgt accacttgag 1920  
 gtgcaggaca atattegtgc gactgcgctg gttcctaatt tccacgcac caccgaaget 1980  
 gtgcgccgag tccttcccac tgaagtcact cacatcgatg cgcgatttaa cgtgtcccgc 2040  
 gttgcagtga tgatcgttgc gttgcagcag cgtcctgatt tgctgtggga gggtaactct 2100  
 gaccgtctgc accagcctta tcgtgcagaa gtgttgccca ttacctctga gtgggtaaac 2160  
 cgctcgcga accgtggcta cgcggcatac etttccggtg ccggcccaac cgccatggtg 2220  
 ctgtccactg agccaattcc agacaagggt ttggaagatg ctcgtgagtc tggcattaag 2280  
 gtgcttgagc ttgaggttgc gggaccagtc aaggttgaag ttaaccaacc ttaggcccaa 2340  
 caaggaaggc ccccttcgaa tcaagaaggg ggccttatta gtgcagcaat tattcgtgta 2400  
 acacgtgaac cttacaggtg cccggcgcgt tgagtggttt gagtccagc tggatgcggt 2460  
 tgttttcacc gaggetttct tggatgaatc cggcgtggat ggcgcagacg aaggctgatg 2520  
 ggcgtttgtc gttgaccaca aatgggcagc tgtgtagagc gagggagttt gcttcttcgg 2580  
 tttcgggtgg gtcaaagccc atttcgcgga ggcggttaat gagcggggag agggcttctg 2640  
 cgagtcttcc ggcttcggcg tggttaatgc ccatgacgtg tgcccactgg gttccgatgg 2700  
 aaagtgcttt ggcgcggagg tcggggttgt gcattgcgtc atcgtcgaca tcgccgagca 2760  
 tgttgcccat gagttcgatc agggatgatg attccttggc gacagcgcgg ttgtcgggga 2820  
 cgcgtgttg gaagatgagg gaggggcggg atcctctaga cccgggattt aaatcgtag 2880  
 cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc 2940

ES 2 517 394 T3

ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc 3000  
 aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa 3060  
 gcgaaccgga attgccagct gggggccct ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa 3120  
 actggatggc tttcttgccg ccaaggatct gatggcgag gggatcaaga tctgatcaag 3180  
 agacaggatg aggatcgttt cgcgatgattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3240  
 ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3300  
 atgcgccctg gttccggctg tcagcgagcagg ggcgcccggg tctttttgtc aagaccgacc 3360  
 tgtccgggtc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3420  
 cgggcggttc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3480  
 tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag 3540  
 tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgt tgatccggct acctgccat 3600  
 tcgaccacca agcgaacat cgcacgagc gagcacgtac tcggatgaa gccggcttg 3660  
 tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3720  
 ggctcaaggc gcgcatgcc cagcggcgagg atctcgtcgt gaccatggc gatgcctgct 3780  
 tgccgaatat catggtgaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg 3840  
 gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggtacccg tgatattgct gaagagcttg 3900  
 gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat cgcgctccc gattcgcagc 3960  
 gcacgcctt ctatgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 4020  
 gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 4080  
 tgaagggttg ggcttcgaa tcgttttccg ggacgcggc tggatgatcc tccagcgcg 4140  
 ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaaa 4200  
 taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgetca 4260  
 ctgactcget gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg 4320  
 taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 4380  
 agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggtccgccc 4440  
 cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcaag gtggcgaaac ccgacaggac 4500  
 tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gtcctcctg gcgctctcct gttccgacc 4560  
 tgccgcttac cggatacctg tccgccttc tccctcggg aagcgtggcg ctttctcata 4620  
 gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc 4680  
 acgaaccccc cgttcagccc gaccgctcgc cttatccgg taactatcgt cttgagtcca 4740  
 acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 4800  
 cgaggatgt aggcgggtc acagagttct tgaagtgtg gcctaactac ggctacacta 4860  
 gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 4920

ES 2 517 394 T3

gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 4980  
 agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg 5040  
 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 5100  
 ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg gccgcggccg ccatcggcat tttcttttgc 5160  
 gtttttattt gttaaactgtt aattgtcctt gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg 5220  
 tttctctgcc tttgatgttc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt 5280  
 agaatoctct gtttgtcata tagcttghta tcacgacatt gtttcttttc gcttgaggta 5340  
 cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat cgtaggagtc aagatccatt tttaacacaa 5400  
 ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca 5460  
 tgtaaatatc gttagacgta atgccgtcaa tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga 5520  
 acaggtacca tttgccgttc attttaaaga cgttcgcggc ttcaatttca tctgttactg 5580  
 tgtagatgac aatcagcggg ttcatacact ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa 5640  
 tcataccgag agegcgcttt gctaactcag ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt 5700  
 tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag 5760  
 attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt 5820  
 ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt 5880  
 tgccttcate gatgaactgc tgtacatfff gatacgtfff tccgtcaccc tcaaagattg 5940  
 atttataatc ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt 6000  
 gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac 6060  
 ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttcttgtgtt tggcttttta 6120  
 ggatagaatc atttgcatcg aatttgcgcg tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc 6180  
 agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt gatagaacat gtaaactgat gtgtcatccg 6240  
 catttttagg atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag 6300  
 tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga 6360  
 tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata tttttcattt ttttgcgtgt 6420  
 cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatggt tccttatatg 6480  
 gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag 6540  
 taaaggttaa tactgttgct tgttttgcaa actttttgat gttcatcgtt catgtctcct 6600  
 tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt 6660  
 tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact 6720  
 ttgcccttta cacatttttag gtcttgctcgt ctttatcagt aacaaaccgg cgcgatttac 6780  
 ttttcgacct cattctatta gactctcgtt tggattgcaa ctggctctatt ttctctttt 6840  
 gttgataga aaatcataaa aggatttgca gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta 6900  
 tctgtttctt ttcattctct gtatttttta tagtttctgt tgcattggca taaagttgcc 6960  
 tttttaatca caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg 7020  
 caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg gcggccgctc gatttaaate 7070

<210> 25

<211> 6625

ES 2 517 394 T3

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Plásmido pH484

5 <400> 25

```

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtaccg ttgctcgctg atctttcggc ttaacaactt    60
tgtattcaat cagtcgggca tagaaagaaa acgcaatgat ataggaacca actgccgcca    120
aaaccagcca cacagagttg attgtttcgc cacgggagaa agcgattgct ccccaacca    180
ccgccgcgat aaccccaaag acaaggagac caacgcgggc ggtcggtgac attttagggg    240
acttcttcac gcctactgga aggtcagtag cgttgctgta caccaaatca tcgtcattga    300
tgttgtcagt ctgttttatg gtcacgatct ttactgtttt ctcttcgggt cgtttcaaag    360
ccactatgcg tagaaacagc gggcagaaac agcgggcaga aactgtgtgc agaaatgcat    420
gcagaaaaag gaaagtccgg ccagatgggt gtttctgtat gccgatgatc ggatctttga    480
cagctgggta tgcgacaaat caccgagagt tgtaattct taacaatgga aaagtaacat    540
tgagagatga tttataccat cctgcaccat ttagagtggg gctagtcata cccccataac    600
cctagctgta cgcaatcgat ttcaaatcag ttggaaaaag tcaagaaaat taccgagac    660
atatgcccgt taaagtttgg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgtc    720
ggcactctcg agggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt caccgcgac    780
gacggctgtg ctggaacccc acaaccggca cacacaaaat ttttctcatg gccgttacc    840
tgcgaatgtc cacagggtag ctggtagttt gaaaatcaac gccggtgccc ttaggattca    900
gtaactggca cattttgtaa tgcgctagat ctgtgtgctc agtcttccag gctgcttacc    960
acagtgaaag caaaaccaat tcgtggctgc gaaagtcgta gccaccacga agtccaggag   1020
gacatacaat gccaaagtac gacaattcca atgctgacca gtggggcttt gaaaccgct    1080
ccattcacgc aggccagtca gtagacgcac agaccagcgc acgaaacctt ccgatctacc   1140
aatccaccgc tttcgtgttc gactccgctg agcagccea gcagcgttcc gacttgagg    1200
atctaggccc tgtttactcc cgcctacca acccaaccgt tgaggctttg gaaaaccgca   1260
tcgcttcctt cgaagggtgg gtccacgctg tagcgttctc ctccggacag gccgcaacca   1320
ccaacgccat tttgaacctg gcaggagcgg gcgaccacat cgtcacctcc ccacgcctct   1380
acggtggcac cgagactcta ttccttatca ctcttaaccg cctgggtatc gatgtttcct   1440

```

ES 2 517 394 T3

tcgtggaaaa ccccgacgac cctgagtect ggcaggcagc cgttcagcca aacaccaaag 1500  
 cattcttcgg cgagactttc gccaacccac aggcagacgt cctggatatt cctgcggtgg 1560  
 ctgaagtgc gcaccgcaac agcgttccac tgatcatcga caacaccatc gctaccgcag 1620  
 cgctcgtgcg cccgctcgag ctcggcgcag acgttgctgt cgcttccctc accaagttct 1680  
 acaccggcaa cggctccgga ctgggcggcg tgcttatcga cggcggaaag ttcgattgga 1740  
 ctgtcgaaaa ggatggaaag ccagtattcc cctacttcgt cactccagat gctgcttacc 1800  
 acggattgaa gtacgcagac cttggtgcac cagccttcgg cctcaaggtt cgcgttgcc 1860  
 ttctacgcga caccggtcc accctctccg cattcaacgc atgggctgca gtccagggca 1920  
 tcgacaccct ttccctgcmc ctggagcgc acaacgaaaa cgcctcaag gttgcagaat 1980  
 tcctcaacaa ccacgagaag gtggaaaagg ttaacttcgc aggcctgaag gattcccctt 2040  
 ggtacgcaac caaggaaaag cttggcctga agtacaccgg ctccgttctc accttcgaga 2100  
 tcaagggcgg caaggatgag gcttgggcat ttatcgacgc cctgaageta cactccaacc 2160  
 ttgcaaacat cggcgtggtt cgctccctcg ttgttcccc agcaaccacc accttcac 2220  
 agtccgacga agctggcctg gcacgcgcgg gcggtacca gtccaccgtc cgcctgtccg 2280  
 ttggcatcga gaccattgat gatatcatcg ctgacctga aggcggcttt gctgcaatct 2340  
 agcactagtt cggacctagg gatatcgtcg acatcgatgc tcttctgctg taattaacaa 2400  
 ttgggatcct ctagaccggt gatttaaatc gctagcgggc tgctaaagga agcggaaacac 2460  
 gtgaaaagcc agtccgcaga aacggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat 2520  
 ctggacaagc gaaaacgcaa gcgcaaaagc aaagcaggta gcttgcaagt ggcttacatg 2580  
 gcgatageta gactgggctg ttttatggac agcaagcga cgggaattgc cagctggggc 2640  
 gccctctggt aaggttggga agccctgcaa agtaaaactgg atggctttct tgccgccaag 2700  
 gatctgatgg cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac 2760  
 gattgaacaa gatggattgc acgcaggctc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg 2820  
 ctatgactgg gcacaacaga caatcgctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc 2880  
 gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca 2940  
 ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct 3000  
 cgacgttctc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga 3060  
 tctcctgtca tctcaacttg ctctgcca gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg 3120  
 gcgctgcat acgcttgatc cggettaect cccattcgac caccaagcga aacatcgcat 3180  
 cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga 3240  
 gcatcagggg ctccgcaccag ccgaactgtt gcgccagctc aaggcgcgca tgcccagcgg 3300  
 cgaggatctc gtcgtgacct atggcgtatc ctgcttgcg aatatcatgg tggaaaatgg 3360

ES 2 517 394 T3

ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat 3420  
 agcgttgget accegtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt 3480  
 cgtgctttac ggtatcgccg cteccgatte gcagcgcato gccttctatc gccttcttga 3540  
 cgagtcttct tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccg accaagcgcac gcccaacctg 3600  
 ccatcacgag atttcgattc caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt 3660  
 ttccgggacg ccggetggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc 3720  
 cacgctagcg gcgcgccggc cggcccggtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa 3780  
 ataccgcatc aggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgctcg 3840  
 gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa gccggtaata cggttatcca cagaatcagg 3900  
 ggataaccga ggaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 3960  
 ggcccgcttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccctt gacgagcatc acaaaaaatcg 4020  
 acgctcaagt cagagggtgc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 4080  
 tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccgat acctgtccgc 4140  
 cttctccct tcgggaagcg tggcgcttct tcatagetca cgctgtaggt atctcagttc 4200  
 ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccctt agcccgaccg 4260  
 ctgcccctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccgg gtaagacaog acttatcgcc 4320  
 actggcagca gccactggtg acaggattag cagagcgagg tatgtaggag gtgctacaga 4380  
 gttcttgaag tgggtggccta actaccgcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 4440  
 tctgtgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac 4500  
 caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg 4560  
 atctcaagaa gatcctttga tctttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 4620  
 acgtaagggt attttgggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa 4680  
 ggccggccgc ggccgccatc ggcattttct tttgcgtttt tatttggtta ctgtaattg 4740  
 tccttgttca aggatgctgt ctttgacaac agatgttttc ttgcctttga tgttcagcag 4800  
 gaagctcggc gcaaacgttg atgtttgtc tgcgtagaat cctctgtttg tcatatagct 4860  
 tgtaatcacg acattgtttc ctttcgcttg aggtacagcg aagtgtgagt aagtaaagg 4920  
 tacatcgta ggatcaagat ccatttttaa cacaaggcca gttttgttca gcggcttga 4980  
 tgggccagtt aaagaattag aaacataacc aagcatgtaa atatcgtag acgtaatgcc 5040  
 gtcaatcgtc atttttgatc cgcgggagtc agtgaacagg taccatttgc cgttcatttt 5100  
 aaagacgttc gcgcgttcaa tttcatctgt tactgtgtta gatgcaatca gcggtttcat 5160  
 cacttttttc agtgtgtaat catcgtttag ctcaatcata ccgagagcgc cgtttgctaa 5220  
 ctcagccgtg cgttttttat cgttttcag aagttttga ctttcttgac ggaagaatga 5280  
 tgtgcttttg ccatagtatg ctttgtaaaa taaagattct tcgccttggg agccatcttc 5340

ES 2 517 394 T3

agttccagtg tttgcttcaa atactaagta tttgtggcct ttatctteta cgtagtgagg 5400  
atctctcagc gtatggttgt cgcctgagct gtagttgcct tcatcgatga actgctgtac 5460  
atthtgatac gtttttccgt caccgtcaaa gattgattta taatccteta caccggtgat 5520  
gttcaaagag ctgtctgatg ctgatacggt aacttgtgca gttgtcagtg tttgthtgcc 5580  
gtaatgthta ccggagaaat cagtgtagaa taaacggatt tttccgtcag atgtaaatgt 5640  
ggctgaacct gaccattctt gtgtttggte ttttaggata gaatcatttg catcgaattt 5700  
gtcgtgtctt ttaaagacgc ggccagcgtt tttccagctg tcaatagaag tttcggccag 5760  
thtttgatag aacatgtaaa tcgatgtgtc atccgcattt ttaggatctc cggctaatgc 5820  
aaagacgatg tggtagccgt gatagthtg cagcagtcgg tcagcgttht gtaatggcca 5880  
gctgtcccaa acgtccaggc cthttgcaga agagatattt ttaattgtgg acgaatcaaa 5940  
thcagaaact tgataththt cattththtg ctgttcaggg atthgcagca tatcatggcg 6000  
tgtaaatagg gaaatgccgt atgtthcctt atatggctth tggthcgtth cththgcaaa 6060  
cgcttgagth gcgcctcctg ccagcagtg cgttagtaag gthaatactg thgctthgth 6120  
tgcaaaactt thgatgttca tcgttcatgt ctctththt atgtactgtg thagcggctc 6180  
gctthctcca gccctcctgt thgaagatgg caagthtagt acgcacaata aaaaagacc 6240  
taaaatagt aaggggtgac gccaaaagt acactthgcc cthtacacat thtaggtctt 6300  
gcctgcttht tcagtaacaa acccgcgca tthacttht gacctcttc tattagactc 6360  
tcgthtgat tgcaactggc ctaththct cththgtht atagaaaatc ataaaaggat 6420  
thgcagacta cgggcctaaa gaactaaaa atctatctgt thctthtcat tctctgtatt 6480  
ththtatagth tctgttgcat gggcataaag thgccttht aatcacaatt cagaaaatat 6540  
cataatatct catttcaacta aataatagt aacggcaggt atatgtgatg gthtaaaaag 6600  
gatcggcggc cgctcgattt aatc 6625

<210> 26

<211> 363

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia del promotor P497\_P1284 = PgrESPEFTu>P497\_P1284

<400> 26

cggttaaag tttggtgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga gtgetggcac 60  
tctcgagggt agagtgcaa ataggtgtt tgacacacag ttgttcccc gcgacgacgg 120  
ctgtgctgga aaccacaac cggcacacac aaaaththt ccatggccgt taccctgcga 180  
atgtccacag ggtagctggc agthtgaaaa tcaacgcctg tgcccttagg attcagtaac 240  
tggcacattt tgtaatgcgc tagatctgtg tgctcagctc tccaggctgc thatcacagt 300  
gaaagcaaaa ccaattcgtg gctgcgaaag tcgtagccac cacgaagtcc aggaggacat 360

10 aca 363

<210> 27

<211> 6350

ES 2 517 394 T3

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Plásmido pH491

5 <400> 27

```

tcgagctcgg cgcagacggt gtcgtcgtt ccctcaccaa gttctacacc ggcaacggct    60
ccggactggg cggcgtgctt atcgacggcg gaaagttcga ttggactgtc gaaaaggatg   120
gaaagccagt attcccctac ttcgtcactc cagatgtctg ttaccacgga ttgaagtacg   180
cagaccttgg tgcaccagcc ttcggcctca aggttcgctg tggccttcta cgcgacaccg   240
gctccaccct ctccgcattc aacgcatggg ctgcagtcca gggcatcgac accctttccc   300
tgcgcctgga gcgccacaac gaaaacgcca tcaaggttgc agaattcctc aacaaccacg   360
agaaggtgga aaaggttaac ttcgcaggcc tgaaggattc cccttggtag gcaaccaagg   420
aaaagcttgg cctgaagtac accggctcgg ttctcacctt cgagatcaag ggcggcaagg   480
atgaggcttg ggcatttata gacgccctga agctacactc caaccttgca aacatcggcg   540
atgttcgctc cctcgttggt caccagcaa ccaccacca ttcacagtcc gacgaagctg   600
gcctggcacg cgcgggctt acccagtcca ccgtccgcct gtccgttggc atcgagacca   660
ttgatgatat catcgtgac ctcgaaggcg gctttgctgc aatctagcac tagttcggac   720
ctagggatat cgtcgagagc tgccaattat tccgggcttg tgaccgcta cccgataaat   780
aggctcggctg aaaaatttcg ttgcaatata acaaaaaagg cctatcattg ggaggtgtcg   840
caccaagtac ttttgcgaag cgccatctga cggattttca aaagatgtat atgctcggtg   900
cggaaaccta cgaaaggatt ttttaccat gccaccctc gcgccttcag gtcaacttga   960
aatccaagcg atcgggtgatg tctccaccga agccggagca atcattaca acgctgaaat  1020
cgcctatcac cgctggggtg aataccgctg agataaagaa ggacgcagca atgtcgttct  1080
catcgaacac gccctcactg gagattccaa cgcagccgat tgggggctg acttgctcgg  1140
tcccggcaaa gccatcaaca ctgatattta ctgcgtgatc tgtaccaacg tcatcgggtg  1200
ttgcaacggg tccaccggac ctggctccat gcatccagat ggaatttct ggggtaatcg  1260
cttccccgcc acgtccattc gtgatcaggt aaacgccgaa aaacaattcc tcgacgcact  1320
cggcatcacc acggctcggc cagtacttgg tggttccatg ggtggtgcc gcaccctaga  1380
gtgggccgca atgtaccag aaactgttgg cgcagctgct gttcttgag tttctgcacg  1440
cgccagcgcc tggcaaatcg gcattcaatc cgccaaatt aaggcgattg aaaacgacca  1500
ccactggcac gaaggcaact actacgaatc cggtgcaac ccagccaccg gactcggcgc  1560

```

ES 2 517 394 T3

cgccccgacgc atcgcccacc tcacctaccg tggcgaacta gaaatcgacg aacgcttcgg 1620  
 caccaaagcc caaaagaacg aaaacccact cggtccttac cgcaagcccc accagcgett 1680  
 cgccgtggaa tcctacttgg actaccaagc agacaagcta gtacagcggt tcgacgcceg 1740  
 ctctactgtc ttgctcaccg acgcctcaa ccgccacgac attggtcgcg accgcggagg 1800  
 cctcaacaag gcactcgaat ccatcaaagt tccagtcctt gtcgcaggcg tagataccga 1860  
 tttttgtac ccctaccacc agcaagaaca cctctccaga aacctgggaa atctactggc 1920  
 aatggcaaaa atcgatccc ctgtgggcca cgatgctttc ctaccgaaa gccgcaaat 1980  
 ggatcgcatc gtgaggaact tcttcagcct catctcccca gacgaagaca acccttcgac 2040  
 ctacatcgag ttctacatct aacatatgac tagttcggac ctagggatat cgtcgacatc 2100  
 gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg atcctctaga cccgggattt aaatcgctag 2160  
 cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc 2220  
 ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc 2280  
 aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa 2340  
 gcgaaccgga attgccaget ggggcgccct ctgtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa 2400  
 actggatggc tttcttgccg ccaaggatct gatggcgagc gggatcaaga tctgatcaag 2460  
 agacaggatg aggatcgttt cgcgatgatt aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 2520  
 ccgcttggtt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 2580  
 atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgccgggt tctttttgtc aagaccgacc 2640  
 tgtccgggtc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtyg ctggccacga 2700  
 cgggcttcc ttgcgcaget gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 2760  
 tattggcgca agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgcctct gccgagaaag 2820  
 tatccatcat ggetgatgca atgcggcggc tgcatacgtc tgatccggct acctgcccat 2880  
 tcgaccacca agcgaacat cgcacgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 2940  
 tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3000  
 ggctcaagge gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct 3060  
 tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgy 3120  
 gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggetaccgg tgatattgct gaagagcttg 3180  
 gcggcgaatg ggetgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat cgcctctccc gattcgcagc 3240  
 gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 3300  
 gaccgaccaa gcgacgccc aacctccate acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 3360  
 tgaaaggttg ggettcggaa tcgttttccg ggacgccggc tggatgatcc tcagcgcgg 3420  
 ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaaa 3480

ES 2 517 394 T3

taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgetca 3540  
ctgactcget gcgetcggtc gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg 3600  
taatcagggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 3660  
agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc 3720  
cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 3780  
tataaagata ccaggcgttt ccccttgaa gctccctcgt gcgetctcct gttccgacct 3840  
tgccgcttac cggatacctg tccgccttc tccctcggg aagcgtggcg ctttctcata 3900  
gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc 3960  
acgaaccccc cgttcagccc gaccgctcgc cttatccgg taactatcgt cttgagtcca 4020  
acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 4080  
cgaggatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta 4140  
gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 4200  
gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 4260  
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 4320  
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 4380  
ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg gccgcgcccg ccacggcat tttcttttgc 4440  
gtttttattt gttaactgtt aattgtcctt gttcaaggat gctgtccttg acaacagatg 4500  
ttttcttgc tttgatgttc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctcgt 4560  
agaatcctct gtttgcata tagctttaa tcacgacatt gtttccttc gcttgaggta 4620  
cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat cgttaggatc aagatccatt ttaacacaa 4680  
ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca 4740  
tgtaaatac gttagacgta atgccgtcaa tcgctatttt tgatcccgcg gagtcagtga 4800  
acaggtagca tttgccgttc attttaaaga cgttcgcgcg tcaatttca tctgttactg 4860  
tgtagatgc aatcagcggg ttcacactt ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa 4920  
tcataccgag agcgcgctt gctaaactcag ccgtgcgctt tttatcgctt tgcagaagtt 4980  
tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag 5040  
attcttcgcc ttggtagcca tcttcagtc cagtgtttgc tcaaaact aagtatttgt 5100  
ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtatg gttgtcgct gagctgtagt 5160  
tgccttcac gatgaactgc tgtacatttt gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg 5220  
atttataatc ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt 5280  
gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac 5340  
ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttcttgtgtt tggcttttta 5400  
ggatagaatc atttgcacg aatttgcgc tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc 5460

ES 2 517 394 T3

agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg 5520  
catttttagg atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag 5580  
tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga 5640  
tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata tttttcattt ttttgctggt 5700  
cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatggt tccttatatg 5760  
gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag 5820  
taaaggtaa tactgttgct tgttttgcaa actttttgat gttcatcggt catgtctcct 5880  
tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt 5940  
tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact 6000  
ttgcccttta cacatttttag gtcttgctg ctttatcagt aacaaaccgc cgcgatttac 6060  
ttttgcacct cattctatta gactctcggt tggattgcaa ctggtctatt ttctctttt 6120  
gtttgataga aaatcataaa aggatttgca gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta 6180  
tctgtttcct ttcattctct gtatttttta tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc 6240  
tttttaatca caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg 6300  
caggtatatg tgatgggta aaaaggatcg gcggccgctc gatttaaate 6350

<210> 28

<211> 5477

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pH429

<400> 28

tcgagctctc caatctccac tgaggactt aatecttcgg ggaattcgg gcgettaaat 60  
cgagaaatta ggccatcacc ttttaataac aatacaatga ataattggaa taggtcgaca 120  
cctttggagc ggagccgggt aaaattggca gcattcaccg aaagaaaagg agaaccacat 180  
gcttgcccta gggttgatta catggatcat tattggtggt ctagctggtt ggattgcctc 240  
caagattaaa ggcactgatg ctccagcaagg aattttgctg aacatagtcg tcggtattat 300  
cgggtggttg ttaggcggct ggctgcttg aatcttcgga gtggatgtg ccggtggcgg 360  
cttgatcttc agcttcatca catgtctgat tggctgctgc attttgctga cgatcgtgca 420  
gttcttcaact cggaagaagt aatctgcttt aaatccgtag ggctgttga tatttcgata 480  
tcaacaggcc ttttggtcat tttgggtgg aaaaagcgt agacttgcct gtggattaaa 540  
actatacgaa ccggtttgct tatattggtg ttagacagtt cgtcgtatct tgaacagac 600  
caaccgaaa ggacgtggcc gaacgtggct gctagctaat ccttgatggt ggacttgctg 660  
gatctcgatt ggtccacaac atcagctctc ttgagacggc tcgcgattg gctcggcagt 720

ES 2 517 394 T3

tgttgtcggc tccacctgcg gactactcaa tttagtttct tcattttccg aaggggtatc 780  
 ttcggtgggg gaggcgtcga taagcccctt ctttttagct ttaacctcag cgcgacgctg 840  
 ctttaagcgc tgcattggcg cgcggttcat ttcacgttgc gtttcgcgcc tcttgttcgc 900  
 gatttccttg cgggcctggt ttgcttcggt gatttcggca gtacggggtt tggtgagttc 960  
 cacgtttgtt gcgtgaagcg ttgagggcgt ccatgggggtg agaatcatca gggcgcgggt 1020  
 tttgcgctgt gtccacagga agatgcgctt ttctttttgt tttgcgcggt agatgtcgcg 1080  
 ctgctctagg tgggtgcactt tgaatcgtc ggtaagtggg tatttgcggt ccaaatgac 1140  
 catcatgatg attgtttggg ggagcgtcca caggttgttg ctgacgcgtc atatgactag 1200  
 ttcggaccta gggatatcgt cgcacatcgt gctcttctgc gtaattaac aattgggatc 1260  
 ctctagaccc gggatttaaa tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag 1320  
 ccagtccgca gaaacgggtc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa 1380  
 gggaaaacgc aagcgcgaaag agaaagcagg tagcttgacg tgggcttaca tggcgatagc 1440  
 tagactgggc ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg 1500  
 gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaaact ggatggcttt ctgcccga aggatctgat 1560  
 ggcgcagggg atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac 1620  
 aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggtattc ggctatgact 1680  
 gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc 1740  
 gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg 1800  
 cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctgcagcttg 1860  
 tcaactgaag gggaaaggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt 1920  
 catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc 1980  
 atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag 2040  
 cacgtactcg gatggaagcc ggtcttctcg atcaggatga tetggacgaa gagcatcagg 2100  
 ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgcac ggcgaggatc 2160  
 tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt 2220  
 ctggattcat cgaactgtgc cggtgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg 2280  
 ctaccctga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatggg tgaccgcttc ctcgctcttt 2340  
 acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct 2400  
 tctgagcggg actctgggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccacc tgccatcacg 2460  
 agatttcgat tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttoggaatcg ttttccggga 2520  
 cgccggctgg atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttctctg cccacgctag 2580  
 cggcgcgccg gccggcccgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca 2640  
 tcaggcgtct ttcgcttcc tcgctcactg actcgtcgcg ctccggtcgtt cggctgcggc 2700

ES 2 517 394 T3

gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg 2760  
caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt 2820  
tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa 2880  
gtcagagggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 2940  
ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc 3000  
cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg 3060  
tcgctogctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct 3120  
tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag 3180  
cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga 3240  
agtgtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga 3300  
agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg 3360  
gtagcggtggt ttttttgggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag 3420  
aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag 3480  
ggattttgggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaceta gatcctttta aaggccggcc 3540  
gcgcccgcca tcggcatctt cttttgcggt tttatttgggt aactgttaat tgtccttgtt 3600  
caaggatgct gtctttgaca acagatgttt tcttgctttt gatgttcagc aggaagctcg 3660  
gcgcaaacgt tgattgtttg tctgcgtaga atcctctggt tgtcatatag cttgtaatca 3720  
cgacattggt tcctttcgct tgaggtagcag cgaagtgtga gtaagtaaag gttacatcgt 3780  
taggatcaag atccatctttt aacacaagcg cagttttggt cagcggcttg tatgggccag 3840  
ttaaagaatt agaaacataa ccaagcatgt aaatatcgtt agacgtaatg ccgtcaatcg 3900  
tcatttttga tccgcgggag tcagtgaaca ggtaccattt gccgttcatt ttaaagacgt 3960  
tcgcgcggtc aatttcatct gttactgtgt tagatgcaat cagcggtttc atcacttttt 4020  
tcagtgtgta atcatcggtt agctcaatca taccgagagc gccgtttgct aactcagccg 4080  
tgcgtttttt atcgcctttgc agaagttttt gactttcttg acggaagaat gatgtgcttt 4140  
tgccatagta tgctttgtta aataaagatt cttcgccttg gtagccatct tcagttccag 4200  
tgtttgcttc aaactaag tatttgtggc ctttatcttc tacgtagtga ggatctctca 4260  
gcgtatgggt gtcgcctgag ctgtagttgc cttcatcgat gaactgctgt acattttgat 4320  
acgtttttcc gtcaccgtca aagattgatt tataatcttc tacaccgttg atgttcaaag 4380  
agctgtctga tgctgatacg ttaactgtg cagttgtcag tgtttgtttg ccgtaatgtt 4440  
taccggagaa atcagtgtag aataaacgga tttttccgtc agatgtaa atgtggctgaac 4500  
ctgaccattc ttgtgtttgg tcttttagga tagaatcatt tgcacgaat ttgtcgctgt 4560  
ctttaaagac gcggccagcg tttttccagc tgtcaataga agtttcgccg actttttgat 4620

ES 2 517 394 T3

agaacatgta aatcgatgtg tcatccgcat ttttaggata tccggctaata gcaaagacga 4680  
 tgtggtagcc gtgatagttt gcgacagtgc cgtcagcgtt ttgtaatggc cagctgtccc 4740  
 aaacgtccag gccttttgca gaagagatat ttttaattgt ggacgaatca aattcagaaa 4800  
 cttgatattht ttcattthttt tgctgttcag ggatttgca catatcatgg cgtgtaatat 4860  
 gggaaatgcc gtatgtttcc ttatatggct tttggttcgt ttctttcgca aacgcttgag 4920  
 ttgcgcctcc tgccagcagt gcggtagtaa aggttaatac tgttgcttgt tttgcaaact 4980  
 ttttgatgtht catcgttcat gtctcctttt ttatgtactg tgttagcggc ctgcttcttc 5040  
 cagccctcct gtttgaagat ggcaagttag ttacgcacaa taaaaaaaga cctaaaatat 5100  
 gtaaggggtg acgccaaaagt atacactttg cccctttacac attttaggtc ttgcctgctt 5160  
 tatcagtaac aaaccgcgc gatttacttt tcgacctcat tctattagac tctcgtttgg 5220  
 attgcaactg gtctatthtt ctcttttgtht tgatagaaaa tcataaaagg atttgcaaac 5280  
 tacgggccta aagaactaaa aaatctatct gtttctthttc attctctgta tttthtatag 5340  
 tttctgthtg atgggcataa agttgccttht ttaatcacia ttcagaaaat atcataatat 5400  
 ctcatttcac taaataatag tgaacggcag gtatatgtga tgggttaaaa aggatcggcg 5460  
 gccgctcgat ttaaate 5477

<210> 29

<211> 5697

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pH449

<400> 29

tcgagggctc ttccgggtgc atgggtgaac cgaattccag cacaatattt tccggthtaa 60  
 agcaatcgat cacatagtcg atthttgtcca accactgaaa acctgcaagg accaccaat 120  
 cccctgcagc atgttcagca accattggca gcggcggata gcgaacttcc cctthttctc 180  
 ccgthgcat thtccgctca ctgatcaggc gactgagctt thttagcct tccgatttht 240  
 tacacaagac tgtcaaacag ccttcttgca gactcagctc cgcaccataa acggtatgca 300  
 ttccagcttc cgcggcagct tccgcaaate tcaactgcacc ataaaaacca tccctatcca 360  
 tgactgatag agcaacaagt cctaacttht tggcctgcac aaccacatca gacggatccg 420  
 atgcgccagt gagaaagtha taactgctgg tggcatgcag ctccggcaaaa ggaaccgacg 480  
 cttccccctg catggcagat gaaggcgcct gcgcatccgg ctcatgcagc accggacgca 540  
 gagattcgac cthtttacct gagaggatc thtccaattt ggaccacgat aatggcctgc 600  
 cgttaaagct tcccccgcca thcattcca taatgatagg atacathttt agaacaaatt 660  
 thccaataag thttccacgc cagccggaga aggaaataga ccaagctgta cagatcgacg 720  
 cgtcctggct gagtacaacg toggctccgg cgcagacctc accccagthg gctccagcga 780

ES 2 517 394 T3

aatecgtgcc ctggcactat tctggaagga ccacgactcc atcgacggca ttgacggcga 840  
gtccgttgcc atccctaacg atccttccaa ccagggccgc gccatcaacg ttctcgttca 900  
ggcaggtctg gtcaccctga agaccccagg tctggtcacc ccagctccag tcgatatega 960  
cgaggcagct tccaagggtt ccgctcatcc agtcgacgca gctcaggcac caaccgctta 1020  
ccaggagggt cgcccagcga tcatcaacaa ctcttcctt gaccgcgcag gcatcgatcc 1080  
aaacctcgcg gtcttcgaag atgatcctga gtctgaagaa gcagagccat acatcaacgt 1140  
cttcgtcacc aaggctgagg acaaggacga tgccaacatc gccgcctcog ttgagctgtg 1200  
gcacgaccca gaggttctgg ctgcagtaga ccgcgactct gagggcacct ccgtcccagt 1260  
tgatcgtcca ggagctgacc ttcaggaaat ccttgatcgc cttgaggctg atcaggaaaa 1320  
cgcataatct cttttgagtt ctttgatac ccatgtcag atttctttgc acaatcacag 1380  
cctgaaaatc agactgtgaa cttcaaacgc atatgactag ttcggaccta gggatatcgt 1440  
cgacatcgat gctcttctgc gttaattaac aattgggatc ctctagacc gggatttaaa 1500  
tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtcgca gaaacggtgc 1560  
tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc aagcgcaaag 1620  
agaaagcagg tagcttgacg tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc ggttttatgg 1680  
acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg gaagccctgc 1740  
aaagtaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg atcaagatct 1800  
gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt 1860  
tctccggccc cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc 1920  
tgctctgatg ccgccgtggt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag 1980  
accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg 2040  
gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc gggaaaggac 2100  
tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgetcctgcc 2160  
gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc 2220  
tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc 2280  
ggtcttgctg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggtctgcgcc agccgaactg 2340  
ttcgcacggc tcaaggcgcg catgcccagc ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat 2400  
gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaaat ggcgccttt ctggattcat cgactgtggc 2460  
cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga tattgctgaa 2520  
gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgtcccgat 2580  
tcgcagcga tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actetggggt 2640  
tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaccc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg 2700

ES 2 517 394 T3

ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg atgatcctcc 2760  
 agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag cggcgcgcgg gccggcccgg 2820  
 tgtgaaatac cgcacagatg cgttaaggaga aaataccgca tcagggcctc ttccgcttcc 2880  
 tcgctcactg actcgcctgc ctccggtcgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca 2940  
 aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 3000  
 aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg 3060  
 ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaaccgg 3120  
 acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt 3180  
 ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt 3240  
 tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 3300  
 tgtgtgcacg aacccccgt tcagccccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 3360  
 gagtccaacc cggttaagaca cgacttatcg cactggcag cagccactgg taacaggatt 3420  
 agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc 3480  
 tacactagaa ggacagtatt tggatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa 3540  
 agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtgg tttttttggt 3600  
 tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct 3660  
 acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta 3720  
 tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aaggccggcc gcggccgcca tcggcatttt 3780  
 cttttgcgtt tttatgtgt aactgttaat tgccttggt caaggatgct gtctttgaca 3840  
 acagatgttt tcttgccctt gatgttcagc aggaagctcg gcgcaaactg tgattgtttg 3900  
 tctgcgtaga atcctctggt tgtcatatag cttgtaatca cgacattggt tcctttcgct 3960  
 tgaggtagac cgaagtgtga gtaagtaaag gttacatcgt taggatcaag atccattttt 4020  
 aacacaaggc cagttttggt cagcggcttg tatgggcccag ttaaagaatt agaaacataa 4080  
 ccaagcatgt aaatatcgtt agacgtaatg ccgtcaatcg tcatttttga tccgcgggag 4140  
 tcagtgaaca ggtaccattt gccgttcatt ttaaagacgt tcgcccgttc aatttcatct 4200  
 gttactgtgt tagatgcaat cagcggtttc atcacttttt tcagtgtgta atcatcgttt 4260  
 agctcaatca taccgagagc gccgtttgct aactcagccg tgcgtttttt atcgctttgc 4320  
 agaagttttt gactttcttg acggaagaat gatgtgcttt tgccatagta tgctttgtta 4380  
 aataaagatt ctctgccttg gtagccatct tcagttccag tgtttgcttc aaatactaag 4440  
 tatttggtgc ctttatcttc tacgtagtga ggatctctca gcgtatggtt gtcgcctgag 4500  
 ctgtagttgc ctcatcgat gaactgctgt acattttgat acgtttttcc gtcaccgtca 4560  
 aagattgatt tataatctc tacaccgttg atgttcaaag agctgtctga tgctgatacg 4620  
 ttaactgtg cagttgtcag tgtttgtttg ccgtaatggt taccggagaa atcagtgtag 4680

ES 2 517 394 T3

aataaacgga tttttccgtc agatgtaaat gtggctgaac ctgaccattc ttgtgtttgg 4740  
tcttttagga tagaatcatt tgcacgcaat ttgtcgtgt ctttaaagac gcggccagcg 4800  
ttttccagc tgtcaataga agtttcgccc actttttgat agaacatgta aatcgatgtg 4860  
tcatccgcat ttttaggac tccggctaata gcaaagacga tgtggtagcc gtgatagttt 4920  
gcgacagtgc cgtcagcgtt ttgtaatggc cagctgtccc aaacgtccag gccttttgca 4980  
gaagagatat ttttaattgt ggacgaatca aattcagaaa ctgatattt ttcatttttt 5040  
tgctgttcag ggatttgac catatcatgg cgtgtaatat gggaaatgcc gtatgtttcc 5100  
ttatatggct tttggttcgt ttctttcgca aacgcttgag ttgcgcctcc tgccagcagt 5160  
gcggtagtaa aggttaatac tgttgcttgt tttgcaaact ttttgatgtt catcgttcat 5220  
gtctcctttt ttatgtactg tgttagcggg ctgcttcttc cagccctcct gtttgaagat 5280  
ggcaagttag ttacgcacaa taaaaaaga cctaaaatat gtaaggggtg acgccaaagt 5340  
atacactttg ccctttacac attttaggtc ttgcctgctt taccagtaac aaaccgcgc 5400  
gatttacttt tcgacctcat tctattagac tctcgtttgg attgcaactg gtctattttc 5460  
ctcttttggt tgatagaaaa tcataaaagg atttgcagac tacgggccta aagaactaaa 5520  
aaatctatct gtttcttttc attctctgta tttttatag tttctgttgc atgggcataa 5580  
agttgccttt ttaatcaciaa ttcagaaaat atcataatat ctcatctcac taaataatag 5640  
tgaacggcag gtatatgtga tgggttaaaa aggatcggcg gccgctcgat ttaaate 5697

<210> 30

<211> 7318

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pOM427

<400> 30

ggccgctcga tttaaatctc gagctctgga gtgcgacagg tttgatgata aaaaattagc 60  
gcaagaagac aaaaatcacc ttgcgctaata gctctgttac aggtcactaa taccatctaa 120  
gtagttgatt catagtgact gcatatgtaa gtatttcctt agataacaat tgattgaatg 180  
tatgcaaata aatgcataca ccataggtgt ggtttaattt gatgcccttt ttcagggctg 240  
gaatgtgtaa gagcgggggtt atttatgctg ttgttttttt gtactcggg aagggcttta 300  
cctcttccgc ataaacgctt ccatcagcgt ttatagttaa aaaaatcttt cggggggatg 360  
gggagtaagc ttgtgttatc cgctcgggcc caatccgcaa gctccaccga ctcgttggcg 420  
tgcgactcta gataaatatc aagcagctgg ccgccaataa cctcagtacg catgccacgc 480  
caagcatecc tcgtgcgggc caatgcctct gcaactcaaac cggaatcctg cagcatgtct 540  
tctgccca ccaatgccat atcgccagcc aaaatcgaga ctgaaacgcc aaagtgctcg 600

ES 2 517 394 T3

ggatcgcctt cgaattatt ggcgcggtga tcagcttcca cagcccgtg aactgtggg 660  
 gctccgccc gggatcaga agaactgata atactgcat gaatcaagg acaagcctg 720  
 atgaattcga gactcgctgc ggcgtcaagg acggactcaa gtttttcaga agaattctta 780  
 tggccttgcg ccgccaggaa accagcccac gcataaagag gacggattcg ctttcctcca 840  
 ttgagcacga aactgcgaag atgggccaca gcatctgtga caggagcgcc gatatcagca 900  
 attgttagct cttgagcacc gaggaactgc gtcaaacgat ctgcacgac ctccggaat 960  
 ttgtcgaggt caaggtcatg ggcactgaaa ctgctcaagg agacgtcctt caatcgaata 1020  
 ggggatgctg ggtgaattt tgggtgaggt gaataaatgc cagaggcagt cccaacaaa 1080  
 cactctcacc aactaagat acccgctgac tcatacgtta aatctatcac cgcaagggat 1140  
 aaatatctaa caccgtgctg gttgactatt ttacctctgg cggtgataat ggttgcattg 1200  
 actaaggagg attaattaat gtccctaacc aacatcccag cctcatctca atgggcaatt 1260  
 agcagcgttt tgaagcgtcc ttcacccggc cgagtacett tttctgtcga gtttatgcca 1320  
 ccccgcgagc atgcagctga agagcgtctt taccgcgag cagaggcttt ccatgacctc 1380  
 ggtgcatcgt ttgtctccgt gacttatggt gctggcggat caaccctgga gagaacctca 1440  
 cgtattgctc gacgattagc gaaacaaccg ttgaccactc tggtgacct gaccctggtt 1500  
 aaccacactc gcgaagagat gaaggcaatt cttcgggaat acctagagct gggattaaca 1560  
 aacctgttgg cgcttcgagg agatccgctt ggagaccat taggcgattg ggtgagcacc 1620  
 gatggaggac tgaactatgc ctctgagctc atcgatctta ttaagtccac tcctgagttc 1680  
 cggaattcgc acctcggtat cgctccttc cccgaagggc atttccgggc gaaaactcta 1740  
 gaagaagaca ccaatacac tctggcgaag ctgctgagg gggcagagta ctccatcacg 1800  
 cagatgttct ttgatgtgga agactacctg cgacttcgtg atcgccggat cctgttttgg 1860  
 cggatgagag aagatcttca gcctgataca gattaatca gaacgcagaa gcggtctgat 1920  
 aaaaacagaat ttgctgctg gcagtagcgc ggtggtccca cctgacccca tgccgaactc 1980  
 agaagtgaaa cccgtagcgc ccgatgtag tgtggggtct ccccatgcca gagtagggaa 2040  
 ctgccaggca tcaataaaa cgaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct 2100  
 gttgtttgct ggtgaacgct ctctgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg 2160  
 ttgcgaagca acggcccga ggtggcggg caggacgccc gccataaact gccagcacc 2220  
 aaattaagca gaaggccatc ctgacggatg gcctttttgc gtttctaaa actcttggtg 2280  
 cgggatttaa atgatccgct agcgggctgc taaaggaagc ggaacacgta gaaagccagt 2340  
 ccgcagaaac ggtgctgacc ccgatggaat gtcagctact gggctatctg gacaagggaa 2400  
 aacgcaagcg caaagagaaa gcaggtagct tgcagtgggc ttacatggcg atagctagac 2460  
 tgggctggtt tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtgaa 2520  
 gttgggaagc cctgcaaatg aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc 2580

ES 2 517 394 T3

aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat 2640  
 ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggeta tgactgggca 2700  
 caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcg gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccg 2760  
 gttctttttg tcaagaccga cctgtccggg gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg 2820  
 cggctatcgt ggctggccac gacgggcggt ccttgccgag ctgtgctcga cgttgtcact 2880  
 gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct 2940  
 caccttgctc ctgccagaaa agtatccatc atggctgatg caatgccggg gctgcatacg 3000  
 cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt 3060  
 actcggatgg aagccggctc tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 3120  
 gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc 3180  
 gtgacctatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga 3240  
 ttcacgactg gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 3300  
 cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt 3360  
 atcgccgctc ccgattcgca gcgcategcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga 3420  
 gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt 3480  
 tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgttttc cgggacgccg 3540  
 gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgcctggagt cttcgcccac gctagcggcg 3600  
 cgccacgggt gcgcatgac gtgctcctgt cgttgaggac ccggctaggc tggcgggggt 3660  
 gccttactgg ttagcagaat gaatcaccga tacgcgagcg aacgtgaagc gactgctgct 3720  
 gcaaaacgtc tgcgacctga gcaacaacat gaatggtctt cggtttccgt gtttcgtaaa 3780  
 gtctggaaa gcggaagtca gcgccctgca ccattatggt ccggatctgc atcgcaggat 3840  
 gctgctggct accctgtgga acacctacat ctgtattaac gaagcgtggy cattgaccct 3900  
 gagtgatttt tctctggtcc cgccgcatcc ataccgccag ttgtttacc tcacaacgtt 3960  
 ccagtaaccg ggcatgttca tcatcagtaa cccgtatcgt gagcatcctc tctcgtttca 4020  
 tcggtatcat tacccecatg aacagaaatc ccccttacac ggaggcatca gtgaccaaac 4080  
 aggaaaaaac cgccctaac atggcccgtt ttatcagaag ccagacatta acgcttctgg 4140  
 agaaactcaa cgagctggac gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg cttcacgacc 4200  
 acgctgatga gctttaccgc agctgcctcg cgcggttcgg tgatgacggg gaaaacctct 4260  
 gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac 4320  
 aagcccgta gggcgcgta ggggtgttg gcgggtgtcg gggcgcagcc atgaccaggt 4380  
 cacgtagcga tagcggagtg tatactggct taactatgcy gcacagagc agattgtact 4440  
 gagagtgcac catatgcggg gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat 4500

ES 2 517 394 T3

caggcgctct tccgcttct cgetcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg 4560  
 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 4620  
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt 4680  
 gctggcggtt tccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 4740  
 tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 4800  
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtcog cctttctccc 4860  
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 4920  
 cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagacc gctgcgcctt 4980  
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 5040  
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 5100  
 gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctcgc ctctgctgaa 5160  
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 5220  
 tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 5280  
 agatccttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtggt aacgaaaact cacgttaagg 5340  
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa aggccggccg 5400  
 cggcgcceat cggcatttct ttttgcgttt ttattgtta actgtaatt gtctctgttc 5460  
 aaggatgctg tctttgacaa cagatgtttt cttgccttg atgttcagca ggaagctcgg 5520  
 cgcaaacgtt gatgtttgt ctgcgtagaa tcctctgttt gtcatatagc ttgtaatcac 5580  
 gacattgttt cctttcgtt gaggtacagc gaagtgtgag taagtaaagg ttacatcgtt 5640  
 aggatcaaga tccattttta acacaaggcc agttttgttc agcggcttgt atgggccagt 5700  
 taaagaatta gaaacataac caagcatgta aatatcgta gacgtaatgc cgtcaatcgt 5760  
 cattttgat ccgcgggagt cagtgaacag gtaccatttg ccgttcattt taaagacgtt 5820  
 cgcgcgttca atttcatctg ttactgtgtt agatgcaatc agcggtttca tcaacttttt 5880  
 cagtgtgtaa tcatcgttta getcaatcat accgagagcg ccgtttgcta actcagccgt 5940  
 gcgtttttta tcgctttgca gaagtttttg actttcttga cggagaatg atgtgctttt 6000  
 gccatagtat gctttgtaa ataaagattc ttcgccttg tagccatctt cagttccagt 6060  
 gtttgcttca aataactaagt atttgtggcc tttatcttct acgtagttag gatctctcag 6120  
 cgtatggttg tcgcctgagc tgtagttgcc ttcacgatg aactgctgta cattttgata 6180  
 cgtttttccg tcaccgtcaa agattgattt ataatcctct acaccgttga tgttcaaaga 6240  
 gctgtctgat gctgatacgt taacttgtgc agttgtcagt gtttgtttgc cgtaatgttt 6300  
 accggagaaa tcagtgtaga ataaacggat ttttccgtca gatgtaaatg tggctgaacc 6360  
 tgaccattct tgtgtttggt cttttaggat agaatcattt gcacgaatt tgtcgtgtc 6420  
 tttaaagacg cggccagcgt ttttccagct gtcaatagaa gtttcgcca ctttttgata 6480

ES 2 517 394 T3

gaacatgtaa atcgatgtgt catccgcatt tttaggatct ccggctaatag caaagacgat 6540  
 gtggtagccc tgatagtttg cgacagtgcc gtcagegttt tgtaatggcc agctgtccca 6600  
 aacgtccagg ccttttgag aagagatatt ttttaattgtg gacgaatcaa attcagaaac 6660  
 ttgatatttt tcattttttt gctgttcagg gatttgacgc atatcatggc gtgtaatatg 6720  
 ggaaatgccg tatgtttcct tatatggctt ttggttcggt tctttcgcaa acgcttgagt 6780  
 tgcgcctcct gccagcagtg cggtagtaaa ggtaataact gttgcttgtt ttgcaaactt 6840  
 tttgatgttc atcgttcatg tctccttttt tatgtactgt gttagcggtc tgcttcttcc 6900  
 agccctcctg tttgaagatg gcaagttagt tacgcacaat aaaaaagac ctaaaatag 6960  
 taaggggtga cgccaaagta tacactttgc cctttacaca ttttaggtct tgcctgcttt 7020  
 atcagtaaca aaccgcgcg atttactttt cgacctcatt ctattagact ctcgtttgga 7080  
 ttgcaactgg tctattttcc tcttttgttt gatagaaaat cataaaagga tttgcagact 7140  
 acgggcctaa agaactaaaa aatctatctg tttcttttca ttctctgtat tttttatagt 7200  
 ttctgttga tgggcataaa gttgcctttt taatcacaat tcagaaaata tcataatc 7260  
 tcatttcact aaataatagt gaacggcagg tatatgtgat gggttaaaaa ggatcggc 7318

<210> 31

<211> 5715

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pCLIK5APsodTKT

<400> 31

cgcgtcggca aattagtcga atgaagttaa ttaaaagttc ccgaatcaat ctttttaatg 60  
 ttttcaaacc atttgaaggt gtgctgaccc aggtggacgc caacctttaa aaagcttcag 120  
 acttttattt ccacttcata aaaactgcct gtgacgattc cgttaaagat tgtgccaaat 180  
 cactgcgcaa aactcgcgcg gaaccagacc ttgccatgct atcgcctatt cacactat 240  
 gagtaatcgg aaatagatgg gtgtagacgc ttgattggcg gacgggtcac agcggacgat 300  
 ttcaggccct cgtagctcga gagtttgaag gggtcgatt cgttccgttc gtgacgcttt 360  
 gtgaggtttt ttgacgttgc accgtattgc ttgccgaaca tttttctttt cctttcggtt 420  
 tttcgagaat tttcacctac aaaagcccac gtcacagctc ccagacttaa gattgatcac 480  
 acctttgaca catttgaacc acagttgggt ataaaatggg ttcaacatca ctatggttag 540  
 aggtgttgac gggtcagatt aagcaaagac tactttcggg gtagatcacc tttgccaaat 600  
 ttgaaccaat taacctaagt cgtagatctg atcatcggat ctaacgaaaa cgaacaaaa 660  
 ctttgggtccc ggtttaaacc aggaaggata gctgccaat attccgggct tgtgaccgcg 720  
 tacccgataa ataggtcggc tgaaaaat 780

ES 2 517 394 T3

tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct gacggatttt caaaagatgt 840  
 atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga ttttttacc ttgaccacct tgacgctgtc 900  
 acctgaactt caggcgctca ctgtacgcaa ttaccctctt gattgggtccg atgtggacac 960  
 caaggctgta gacactgttc gtgtcctcgc tgcagacgct gtagaaaact gtggctccgg 1020  
 ccaccaggc accgcaatga gcctggctcc ccttgcatat accttgtacc agcgggttat 1080  
 gaacgtagat ccacaggaca ccaactgggc aggcctgac cgcttcgttc tttcttgtgg 1140  
 ccactcctct ttgaccagt acatccagct ttacttgggt ggattcggcc ttgagatgga 1200  
 tgacctgaag gctctgcgca cctgggattc cttgaccca ggacaccctg agtaccgcca 1260  
 caccaagggc gttgagatca ccactggccc tcttggccag ggtcttgcac ctgcagttgg 1320  
 tatggccatg gctgctcgtc gtgagcgtgg cctattcgac ccaaccgctg ctgagggcga 1380  
 atccccattc gaccaccaca tctacgtcat tgcttctgat gggctgacat cgatgctctt 1440  
 ctgcgttaat taacaattgg gatcctctag acccgggatt taaatgatcc gctagcgggc 1500  
 tgctaaagga agcggaaacac gtagaaagcc agtccgcaga aacgggtgctg accccggatg 1560  
 aatgtcagct actgggctat ctggacaagg gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta 1620  
 gcttgcagtg ggcttacatg gcgatagcta gactgggccc ttttatggac agcaagcгаа 1680  
 ccggaattgc cagctggggc gccctctggt aaggttggga agcctgcaa agtaactgg 1740  
 atggctttct tgccgccaag gatctgatgg cgcaggggat caagatctga tcaagagaca 1800  
 ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct 1860  
 tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc 1920  
 gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggc cgggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc 1980  
 ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggtat cgtggctggc cacgacgggc 2040  
 gttccttgcc cagctgtgct cgacgttctc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg 2100  
 ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcacctg ctctgcccga gaaagtatcc 2160  
 atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac 2220  
 caccaagcga aacatcgcac cgagcgagca cgtactcgga tggagcggc tcttgtcgat 2280  
 caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctcgcgccag ccgaactgtt cgcaggetc 2340  
 aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgcgg 2400  
 aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg 2460  
 gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc 2520  
 gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgatcc gcagcgcac 2580  
 gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg 2640  
 accaagcgcg gcccaacctg ccatcacgag atttcgattc caccgcccgc ttctatgaaa 2700  
 gggtgggctt cggaatcgtt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc 2760

ES 2 517 394 T3

tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg gcgcgccggc cggcccgggtg tgaaataaccg 2820  
 cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatac aggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac 2880  
 tcgctgcgct cggtcggttc gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata 2940  
 cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa 3000  
 aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtt ctggcgcttt tccataggct ccgccccct 3060  
 gacgagcatc acaaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac aggactataa 3120  
 agataaccag cgtttccccc tggaagctcc ctgctgctct ctctgttcc gacctgccg 3180  
 cttaccggat acctgtccgc etttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca 3240  
 cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa 3300  
 cccccggtc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg 3360  
 gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 3420  
 tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta actacggcta cactagaagg 3480  
 acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc 3540  
 tcttgatccg gcaaaaaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgttg caagcagcag 3600  
 attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatccttga tctttctac ggggtctgac 3660  
 gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc 3720  
 ttcacctaga tccttttaa ggccggccgc gcccgccatc gccattttct tttgcgtttt 3780  
 tatttgtaa ctgttaattg tccttgttca aggatgctgt ctttgacaac agatgtttc 3840  
 ttgccttga tgttcagcag gaagctcggc gcaaacgttg attgtttgtc tgcgtagaat 3900  
 cctctgtttg tcataatagct tgtaatcacg acattgtttc ctttcgcttg aggtacagcg 3960  
 aagtgtagt aagtaaaggt tacatcgtta ggatcaagat ccatttttaa cacaaggcca 4020  
 gttttgttca gcggttgta tgggccagtt aaagaattag aaacataacc aagcatgtaa 4080  
 atategtag acgtaatgcc gtcaatcgtc atttttgatc cgcgggagtc agtgaacagg 4140  
 taccatttgc cgttcatttt aaagacgttc gcgcgttcaa tttcatctgt tactgtgtta 4200  
 gatgcaatca gcggtttcat cacttttttc agtgtgtaat catcgtttag ctcaatcata 4260  
 ccgagagcgc cgtttgctaa ctacagcctg cgttttttat cgctttgcag aagtttttga 4320  
 cttcttgac ggaagaatga tgtgctttt ccatagtatg ctttgttaaa taaagattct 4380  
 tcgccttggg agccatcttc agttccagtg tttgcttcaa atactaagta tttgtggcct 4440  
 ttatcttcta cgtagtgagg atctctcagc gtatggttgt cgctgagct gtagttgcct 4500  
 tcategatga actgctgtac attttgatac gttttccgt caccgtcaaa gattgattta 4560  
 taatectcta caccgttgat gttcaaagag ctgtctgatg ctgatacgtt aacttgtgca 4620  
 gttgtcagtg tttgtttgcc gtaatgttta ccggagaaat cagtgtagaa taaacggatt 4680

ES 2 517 394 T3

tttcegtcag atgtaaatgt ggetgaacct gaccattctt gtgtttggtc ttttaggata 4740  
 gaatcatttg catcgaatth gtcgctgtct ttaaagacgc ggcagcgtt tttccagctg 4800  
 tcaatagaag tttcgcgcgac tttttgatag aacatgtaaa tcgatgtgtc atccgcattt 4860  
 ttaggatctc cggetaatgc aaagacgatg tggtagccgt gatagtttgc gacagtgccg 4920  
 tcagcgtttt gtaatggcca gctgtcccaa acgtccaggc cttttgcaga agagatattt 4980  
 ttaattgtgg acgaatcaaa ttcagaaact tgatattttt catttttttg ctgttcaggg 5040  
 atttgcagca tatcatggcg tgtaatatgg gaaatgccgt atgtttcctt atatggcttt 5100  
 tggttcgttt ctttcgcaaa cgcttgagtt ggcctcctg ccagcagtgcc ggtagtaaaag 5160  
 gttaatactg ttgcttgttt tgcaaaactt ttgatgttca tcgttcatgt ctctttttt 5220  
 atgtactgtg ttagcgggtc gcttcttcca gccctcctgt ttgaagatgg caagttagtt 5280  
 accgacaata aaaaaagacc taaaatatgt aaggggtgac gccaaagtat acactttgcc 5340  
 cttcacacat tttaggtcct gcctgcttta tcagtaacaa acccgcgca tttacttttc 5400  
 gacctcattc tattagactc tcgtttgat tgcaactggt ctattttcct cttttgtttg 5460  
 atagaaaatc ataaaaggat ttgcagacta cgggcctaaa gaactaaaa atctatctgt 5520  
 ttcttttcat tctctgtatt ttttatagtt tctgttgcac gggcataaag ttgccttttt 5580  
 aatcacaatt cagaaaatat cataatatct catttcaacta aataatagt aacggcaggt 5640  
 atatgtgatg ggtaaaaaag gatcggcggc cgctcgattt aaatctcgag aggcctgacg 5700  
 tcgggcccgg tacca 5715

<210> 32

<211> 5083

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pH626 int SacB delta sdaA

<400> 32

ctagaccg gatttaaatc gctagcgggc tgctaaagga agcggaacac gtagaaagcc 60  
 agtccgcaga aacgggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg 120  
 gaaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgcagtg ggcttacatg gcgatagcta 180  
 gactgggcg ttttatggac agcaagcga cgggaattgc cagctggggc gccctctggt 240  
 aaggttggga agccctgcaa agtaaaactgg atggccttct tgccgccaag gatctgatgg 300  
 cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa 360  
 gatggattgc acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 420  
 gcacaacaga caatcggtc ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggccc 480  
 ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca 540  
 gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc 600

ES 2 517 394 T3

actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca 660  
tctcaccttg ctctgcccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcat 720  
acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 780  
cgtactcgga tggaagccgg tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 840  
ctcgcgccag ccgaactggt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc 900  
gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgccc aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct 960  
ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg ggggaccgct atcaggacat agcgttggt 1020  
accctgata ttgctgaaga gcttgccggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac 1080  
ggtatcgccg ctcccgatc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc 1140  
tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccg accaagcgcg gcccaacctg ccatcacgag 1200  
atttcgattc caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg 1260  
ccggtggtat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg 1320  
gcgcgccggc cggcccggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc 1380  
aggcgtctct ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga 1440  
gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 1500  
ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtg 1560  
ctggcgtttt tccataggct ccgccccctc gacgagcatc acaaaaatcg acgetcaagt 1620  
cagaggtggc gaaaccogac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc 1680  
ctcgtgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 1740  
tcggaagcgg tggcgctttc tcatagetca cgtgttaggt atctcagttc ggtgtaggtc 1800  
gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta 1860  
tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 1920  
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 1980  
tggtagccta actacggcta cactagaagg acagtattg gtatctgcgc tctgctgaag 2040  
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaacaac caccgctggt 2100  
agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa 2160  
gatcctttga tctttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg 2220  
atthtggta tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ggccggccgc 2280  
ggccgccatc ggcattttct tttgcgtttt tatttgtaa ctgttaattg tccttgttca 2340  
aggatgctgt ctttgacaac agatgttttc ttgcctttga tgttcagcag gaagctcggc 2400  
gcaaacggtt attgtttgtc tgcgtagaat cctctgtttg tcatatagct tgtaatcacg 2460  
acattgttct ctttcgcttg aggtacagcg aagtgtgagt aagtaaagggt tacatcgta 2520

ES 2 517 394 T3

ggatcaagat ccatttttaa cacaaggcca gttttgttca gcggcttcta tgggccagtt 2580  
 aaagaattag aaacataacc aagcatgtaa ataatcgtag acgtaatgcc gtcaatcgtc 2640  
 atttttgatc cgcgggagtc agtgaacagg taccatttgc cgttcatttt aaagacgttc 2700  
 gcgcgttcaa tttcatctgt tactgtgtta gatgcaatca gcggtttcat cacttttttc 2760  
 agtgtgtaat catcgttttag ctcaatcata ccgagagcgc cgtttgctaa ctcagccgtg 2820  
 cgttttttat cgctttgcag aagtttttga ctttcttgac ggaagaatga tgtgcttttg 2880  
 ccatagtatg ctttgttaaa taagattct tcgccttggg agccatcttc agttccagtg 2940  
 tttgcttcaa atactaagta tttgtggcct ttatcttcta cgtagtgagg atctctcagc 3000  
 gtatggttgt cgctgagct gtagtgcct tcatcgatga actgctgtac attttgatac 3060  
 gttttccgt caccgtcaaa gattgattta taatctcta caccgttgat gttcaaagag 3120  
 ctgtctgatg ctgatacgtt aacttgtgca gttgtcagtg tttgtttggc gtaatgttta 3180  
 ccggagaaat cagtgtagaa taaacggatt tttccgtcag atgtaaatgt ggctgaacct 3240  
 gaccattctt gtgtttggtc ttttaggata gaatcatttg catcgaattt gtcgctgtct 3300  
 ttaaagacgc ggccagcgtt tttccagctg tcaatagaag tttcgccgac tttttgatag 3360  
 aacatgtaaa tcgatgtgtc atccgcattt ttaggatctc cggetaatgc aaagacgatg 3420  
 tggtagccgt gatagtttgc gacagtgccg tcagcgtttt gtaatggcca gctgtcccaa 3480  
 acgtccagc cttttgcaga agagatattt ttaattgtgg acgaatcaaa ttcagaaact 3540  
 tgatattttt catttttttg ctgttcaggg atttgcagca tatcatggcg tgtaatatgg 3600  
 gaaatgccgt atgtttcctt atatggcttt tggttcgttt ctttcgcaa cgcttgagtt 3660  
 gcgcctcctg ccagcagtc ggtagtaaag gtaataactg ttgcttgttt tgcaaacttt 3720  
 ttgatgttca tcgttcatgt ctctttttt atgtactgtg ttagcgttct gcttcttcca 3780  
 gccctcctgt ttgaagatgg caagttagtt acgcacaata aaaaagacc taaaatatgt 3840  
 aaggggtgac gccaaagtat acactttgcc ctttacacat ttaggtctt gcctgettta 3900  
 tcagtaacaa acccgcgca tttacttttc gacctattc tattagactc tcgtttgat 3960  
 tgcaactggt ctattttcct cttttgtttg atagaaaatc ataaaaggat ttgcagacta 4020  
 cgggcctaaa gaactaaaa atctatctgt ttcttttcat tctctgtatt ttttatagtt 4080  
 tctgttgcat ggcataaag ttgcctttt aatcacaatt cagaaaatat cataatatct 4140  
 catttacta aataatagt aacggcaggt atatgtgat ggttaaaaag gatcggcggc 4200  
 cgctcgattt aaatctcag aggcctgacg tcgggcccgg taccacgcgt gccgatcttc 4260  
 tcaaaggaca cgacggaaac ggctaaattc gcggatctcc gtttaaggca ttgaagcatt 4320  
 tggaggcccc aagacatgac ccagaccctg taaagcgctt aaacggcgtt ttagagggtc 4380  
 atagttttgg gacaagtggg acaagtgtga atcctgaaag cttccagggc aaggatccac 4440  
 cacaaccgg ccatcgccct ttggaatcgg tccgaaaatt gcaggtacag agccttttac 4500

ES 2 517 394 T3

cgagaaaatc caccacagat tgctgaaatt tcgtgatctg tggtaggattc gtgcaacttc 4560  
 agactcttac ggaggcgatg gaccaaaaac aactacaatc aagcagatca ccttgtagac 4620  
 caccatagaa aaggcccacc ctacagcccgg tacggcttta acacggcttg gattttgtct 4680  
 tgcttggcga ggtaggactg gcaactggcg tcgataagct cagctgacca cccggtgacc 4740  
 tgcgccattg ctccggccgt cgcacgcacg gcagccgggt gcacataacc cagcgtgccg 4800  
 agcacgatgc gacgatccag cacgtccgcc aggtcgacgg ccgcctcctc ggcgacagca 4860  
 aaaacggcct gcgcccgat atcaagggtt tctgggtcaa gtcggcgccc caggtcgggt 4920  
 tgctttgcga cgagatccag cactttttca tgctcagttc catacagtct ggccagatgc 4980  
 acgcggtatt catcatccac atccagctcg gggtaggctgc gaagcgctga ctcaaaggaa 5040  
 tcagccacgg actcatacgc gccaaaagaa gtactcaacg gct 5083

<210> 33

<211> 6995

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pOM253

<400> 33

aaatcgctag cgggctgcta aaggaaagcg aacacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg 60  
 tgctgacccc ggatgaatgt cagctaactgg gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca 120  
 aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta 180  
 tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcccct ctggttaagg tgggaagccc 240  
 tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccc ccaaggatct gatggcgagc gggatcaaga 300  
 tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcattgatt aacaagatgg attgcacgca 360  
 ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc 420  
 ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccgg tctttttgct 480  
 aagaccgacc tgtccgggtc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg 540  
 ctggccacga cgggcggttc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg 600  
 gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct 660  
 gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacget tgatccggct 720  
 acctgcccac tcgaccacca agcgaaacat cgcattcgagc gagcacgtac tcggatggaa 780  
 gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcacc aggggctcgc gccagccgaa 840  
 ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc 900  
 gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt 960  
 ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg tgatattgct 1020

ES 2 517 394 T3

gaagagcttg gcgcggaatg ggctgaccgc ttctctgtgc tttacggtat egccgctccc 1080  
 gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg 1140  
 ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc acgagatttc gattccaccg 1200  
 ccgccttcta tgaaggttg ggcttcgga tctgtttccg ggacgcccgc tggatgatcc 1260  
 tccagcgcgg ggatctcatg ctggagtctt tgcgccacgc tagcggcgcg ccggccggcc 1320  
 cgggtgtgaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct 1380  
 tcctcgcctc ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac 1440  
 tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga 1500  
 gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat 1560  
 aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtacagag gtggcgaaac 1620  
 ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctgaa gctccctcgt gcgctctcct 1680  
 gttccgacce tgcgcgttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg 1740  
 ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg 1800  
 ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt 1860  
 cttgagtcca acccggtaag acacgactta tgcgcaactg cagcagccac tggtaacagg 1920  
 attagcagag cgaggtatgt agcgggtgct acagagttct tgaagtgtg gcctaactac 1980  
 ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga 2040  
 aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccccg ctggtagcgg tggttttttt 2100  
 gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt 2160  
 tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga 2220  
 ttatcaaaaa ggatcttcac ctatagctct ttaaaggccg gcgcggccg ccatcggeat 2280  
 tttcttttgc gtttttattt gtttaactgt aattgtcctt gttcaaggat gctgtctttg 2340  
 acaacagatg ttttcttccc tttgatgttc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt 2400  
 ttgtctgctg agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa tcacgacatt gtttctttc 2460  
 gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat cgttaggatc aagatccatt 2520  
 tttaacacaa ggcagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca 2580  
 taaccaagca tgtaaatatc gttagacgta atgccgcaa tctgcatttt tgatccgccc 2640  
 gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc attttaaaga cgttcgcgcg ttcaatttca 2700  
 tctgttactg tgttagatgc aatcagcggg ttcacactt ttttcagtgt gtaatcatcg 2760  
 tttagctcaa tcataccgag agcgcctgtt gctaactcag ccgtgcgttt tttatcgctt 2820  
 tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg 2880  
 ttaataaaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc cagtgtttgc ttcaataact 2940  
 aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtatg gttgtcgcct 3000

ES 2 517 394 T3

gagctgtagt tgccttcacg gatgaactgc tgtacatfff gatacgtfff tccgtcaccg 3060  
tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat 3120  
acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg 3180  
tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttcttgtgtt 3240  
tggctcttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgcgcg tgtctttaa gacgaggcca 3300  
gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt gatagaacat gtaaatcgat 3360  
gtgtcatecg catttttagg atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag 3420  
tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt 3480  
gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata tttttcattt 3540  
ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatgtt 3600  
tccttatatg gcttttgggt cgtttcttcc gcaaacgctt gagttgcgcc tcctgccagc 3660  
agtgcggtag taaagggtta tactgttgcg tgttttgcaa actttttgat gttcatcgtt 3720  
catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa 3780  
gatggcaagt tagttacgca caataaaaa agacctaaaa tatgtaaggg gtgacgcca 3840  
agtatacact ttgcccttta cacattttag gtcttgctcg ctttatcagt aacaaaccg 3900  
cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgtt tggattgcaa ctggtctatt 3960  
ttctctttt gtttgataga aaatcataa aggatttgca gactacgggc ctaaagaact 4020  
aaaaaatcta tctgtttctt ttcatctctt gtatftttta tagtttctgt tgcatgggca 4080  
taaagtggcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa 4140  
tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg gcggccgctc gatttgggtc 4200  
tagaggaggg gaaacaatgt ccagaaatgg ccgtccagta gtctctatcg ccgataagct 4260  
tgccagctcc actgttgacg cgcttgagaa tgcagtagaa gtccgttggg ttgacggacc 4320  
taaccgcca gaactgcttg atgcagttaa ggaagcggac gcaactgctcg tgcgttctgc 4380  
taccactgtc gatgctgaag tcatcgcgcg tgcccctaac ttgaagatcg tcggtcgtgc 4440  
cggcgtgggc ttggacaacg ttgacatccc tgctgccact gaagctggcg tcatggttgc 4500  
taacgcaccg acctctaata ttcaactccg ttgtgagcac gcaatttctt tgctgctgtc 4560  
tactgctcgc cagatccctg ctgctgatgc gacgctgcgt gagggcgagt ggaagcggtc 4620  
ttctttcaac ggtgtggaaa ttttcggaaa aactgtcggg atcgtcgggt ttggccacat 4680  
tggtcagttg tttgctcagc gtcttgcgtc gtttgagacc accattgttg cttacgatcc 4740  
ttacgctaac cctgctcgtg cggctcagct gaacgttgag ttggttgagt tggatgagct 4800  
gatgagccgt tctgactttg tcaccattca ccttccctaa accaaggaaa ctgctggcat 4860  
gtttgatgcg cagctccttg ctaagtccaa gaagggccag atcatcatca acgctgctcg 4920

ES 2 517 394 T3

tggatggcctt gttgatgagc aggctttggc tgatgagatt gagtccggtc acatctgcgg 4980  
 ccgcacagcg atcccagagg aaatatcctc tggggtcgct gtgtcgacct taaagtttgg 5040  
 ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgct ggcactctcg ggggtagagt 5100  
 gccaaataggt ttgtttgaca cacagttggt caccgcgac gacggctgtg ctggaaaccc 5160  
 acaaccggca cacacaaaat ttttctagag gagggtattca tcatgaatac atacgaacaa 5220  
 attaataaag tgaaaaaaat acttcggaaa catttaaaaa ataaccttat tggacttac 5280  
 atgtttggat caggagttga gagtggacta aaaccaaata gtgatcttga ctttttagtc 5340  
 gtcgtatctg aaccattgac agatcaaagt aaagaaatac ttatacaaaa aattagacct 5400  
 atttcaaaaa aaataggaga taaaagcaac ttacgatata ttgaattaac aattattatt 5460  
 cagcaagaaa tggtagcgtg gaatcatcct cccaacaag aatttattta tggagaatgg 5520  
 ttacaagagc tttatgaaca aggatacatt cctcagaagg aattaaattc agatttaacc 5580  
 ataagtcttt accaagcaaa acgaaaaaat aaaagaatat acggaaatta tgacttagag 5640  
 gaattactac ctgatattcc attttctgat gtgagaagag ccattatgga ttcgtcagag 5700  
 gaattaatag ataattatca ggatgatgaa accaactcta tattaacttt atgccgtatg 5760  
 attttaacta tggacacggg taaaatcata ccaaaagata ttgcgggaaa tgcagtggtc 5820  
 gaatcttctc cattagaaca tagggagaga attttgtag cagttcgtag ttatcttggg 5880  
 gagaatattg aatggactaa tgaaaatgta aatttaacta taaactattt aaataacaga 5940  
 ttaaaaaaat tataaaaaaa ttgaaaaaat ggtggaaaca cttttttcaa tttttttggt 6000  
 ttattattta atatttgga aatattcatt ctaattggta atcagatttt agaaaacaat 6060  
 aaacccttgc atagggggat cgatatccgt ttaggctggg cggatccgcc ctcccgcacg 6120  
 ctttgcggga gggcgggtacc aggggtgctt ctactgaaga ggctcaggat cgtgcgggta 6180  
 ctgacgttgc tgattctgtg ctcaaggcgc tggctggcga gttcgtggcg gatgctgtga 6240  
 acgtttccgg tggctgcgtg ggcgaagagg ttgctgtgtg gatggatctg gctcgcaagc 6300  
 ttggtcttct tgctggcaag cttgtcgacg ccgccccagt ctccattgag gttgaggctc 6360  
 gaggcgagct ttcttccgag caggctgatg caattggttt gtccgctgtt cgtggtttgt 6420  
 tctccggaat tatcgaagag tccgttactt tcgtcaacgc tcctcgatt gctgaagagc 6480  
 gtggcctgga catctccgtg aagaccaact ctgagctgtg tactcaccgt tccgtcctgc 6540  
 aggtcaaggt cactactggc agcggcgcga gcgcaactgt tgttgggtgcc ctgactggtc 6600  
 ttgagcgcgt tgagaagatc acccgcatca atggccgtgg cctggatctg cgcgcagagg 6660  
 gtctgaacct cttcctgcag tacactgacg ctctgggtgc actgggtacc gttggtacca 6720  
 agctgggtgc tgctggcatc aacatcgagg ctgctgcgtt gactcaggct gagaaggggtg 6780  
 accgctgtgt cctgatcctg cgtgttgagt ccgctgtctc tgaagagctg gaagctgaaa 6840  
 tcaacgctga gttgggtgct acttccctcc aggttgatct tgactaatta gagatccatt 6900  
 tgcttgaacc gccttcccat ctttgaattc attcaagggt gtaaggcgggt tttcgtcttt 6960  
 ttaatacagt ttaaatggta gatttgggat ccctc 6995

<210> 34

<211> 11491

5 <212> ADN

<213> artificial

ES 2 517 394 T3

<220>

<223> Plásmido pOM615

<400> 34

ttgatcagcg gccgcacagc gatcccagag gaaatatacct ctggggtcgc tgtgtcgacc	60
ttaaagtttg gctgccatgt gaatttttag caccctcaac agttgagtgc tggcactctc	120
gggggtagag tgccaaatag gttgtttgac acacagttgt tcacccgca cgacggctgt	180
gctggaaacc cacaaccggc acacacaaaa tttttctaga aggaggtgat agtatgtcct	240
ctgcagctac ccgccgtaat tcagccccct tcgttcagcg ccacatcggc ccaaaccagg	300
ccgataccca ggagatcctc gattacctgg gctatgaatc ttccgccgag ctggccgacg	360
atgccctccc gaagtgcgac cgccaggcag gcccgatcgg cctgccggag gcaactggatg	420
agacggacac cctggccgcc ctgcgtgctt acgctgacaa gaacgtgcag aagcagcagc	480
tgatcggcaa cggttacttc gacacgatca ctccggccgt gattcggccg aacgtggtgg	540
agaaccggg ctggtacacc gcctacacc cctaccagcc gaaatctcc caggggcgcc	600
tcgagccct gctgaacttc cagacgatgg tgcaggacct gaccggcctg ccagtggccg	660
gtgcttcgct gttagacgaa gccaccgagc tggccgagc cgtgcagctg atggtcgcg	720
gcaatgcgaa ggctgccaag aagggcgagc tgggtgctgct ggattcctcc ctgcaccagc	780
agtccatcac cgtaaccctg gcgcgcgctg aggctgcggg tatcccgtg gaggtcgtgg	840
acctggacgg cgaagatgct accgccgctg ttgagggccg cgagaacctc gtcggcgtgg	900
tgctttcaa ccccgctcc accggccgag tccgcgacct gtccggctg atctctgcgg	960
cgaaggagac cggcgtctg gtgacggtcg cttgtgacct gctggctcag gttctggtga	1020
cctccccggg ctccaaggt gccgacattg ctgtcggctc ccccagcgc ttcggcgtgc	1080
cgctattctt cgggtggccc caccgaggct tcatctcctg caccgaggct ctgcagcgtg	1140
agctgccggg ccgcatcgtg ggcgtgtccg tggatgccga gggcaccgcc gcctaccgct	1200
tggctctgca gaccctgag cagcacattc gccgcgacaa ggccaccagt aacatctgta	1260
ccgctcaggc tctgctggcc gtcggtgccg gtttctacgc ggtctggcac ggcccagccg	1320
gcctcgcgac catcgcgag ggggtgcacg cccgcgcgac cgcctggcc gttgccctgt	1380
ccgaggtggt cctgacgctg gcgcacgata ctttctcga caccgtcacc gttgacgtgt	1440
ctggttcttc tcttgggtgac gccccacgg ctctgcgcgc cgcagccgag gcaggctaca	1500

ES 2 517 394 T3

acctgcgcca ggttaacgat tccttcgctcg gcatctctgt cggcgagtcc accacggacg 1560  
 aggacattgc caagctgata gaggtgctgg gctcccgcac cggcgaggtc aactccgcga 1620  
 gcttcgacgt caccgccggc ccgctgggcg aggccggcgt gctgcgcgcg gaggacgagg 1680  
 agattctgac ccacccgata ttcaccgcca tcacttccga gaccagatg atgcgctaca 1740  
 tgcgcaagct ggccgaccgc gacctggcgc tggatcgtac gatgatcccc ctgggctcct 1800  
 gcaccatgaa gctgaacgcg gccgtctcca tggagccgat cacctggcct ggcttcgcag 1860  
 gcatccaccc gcacgtcccg gccgagcagg cgcagggctg gctggagctc atcgaggacc 1920  
 tggaggagcg cctggcgaag atcaccggct acgccaaggt ttccgtccag ccgaacgcgg 1980  
 gctcccaggc cgagttcgcc ggctgctggc cgatccaccg ctaccaccag tcccgcggcg 2040  
 acgatcagcg tgacatcgtt ctgatccccg cctccgcgca cggcaccaac gctgcctctg 2100  
 cagcgctggc gggcctgaag gtcgtggctg tgaagaatgc cgaagacggc tccatcgacg 2160  
 tgccggacct ggaggccaag ctggagaagt acggcgagca gaccgcgcc atcatgctga 2220  
 cctaccctc caccacggc gtgttcgagg agcaggtgcg cgacgtctgc cagaaggttc 2280  
 acgacgctgg cggccaggtg tacgtcgacg gcgctaacct gaacgcctcg gtcggcctgg 2340  
 cccagccggg cgagttcgcc ggcgacgtat cccacctgaa cctgcacaag accttacca 2400  
 tcccgcacgg tggggcgcc cggggcgtg gcccggtgtg cgtggcagag cacctgatcc 2460  
 cgttcctgcc caccgaccg aacgccgacg ttatcgaggg cgatgctgcc ctgcagtccg 2520  
 gccagccggt ctccggcgcg cagtacggct ccgctggcgt gctgccgatc acctggtcct 2580  
 acatgcaca gatggcgac gaaggcctga ctgaggcctc ccgcatggcc ctggtgaacg 2640  
 ccaactacgt ttcccgcaag ctggaggact actaccgac gctgtacaag ggcgacaccg 2700  
 gcctggctgc ccacgagtgc atcctggacc tgcgtgaact cacgaaggcc tccggcatca 2760  
 ccgcccagga cgtatccaag ccctgatgg acttcggctt ccacgccccg accttgctc 2820  
 tcccggctgc cggcaccctg atgatggagc ccaccgagtc ggaggacaag gaagagctgg 2880  
 accgcttcat cgaagcgatg atcaccatcc acggggagat ccaggaagtt atcgacggca 2940  
 aggtcaccgc cgaacagtcc gttctgcgcc acgcccgtt tacgcctat tctgttctgc 3000  
 gggacgactt cgaggaagct gtatccggtg gtcacttcag ccgtgccaag gccgcatacc 3060  
 cgggtggctag cctgcgacac accaagtact tcaccccgt gcgtcgtatc gacaacgcct 3120  
 atggcgaccg caatctctgt tgacactgcc cggccctgga agacttcgca attaacgagg 3180  
 actagggctc gctggagcta agggcgctac aaagagaaga aggagaacaa gacatgaccg 3240  
 aacttaagaa gaccgcgctg cacctggtgc acgagaagtt gggcgcgca ttaccgact 3300  
 tcggcggctg ggacatgcct ctgaagtaca gcagtgagct ggacgagcac cacgctgtac 3360  
 gcaatgccgt gggcgtatc gacctctccc acatgggtga ggttcgctg accggccccg 3420  
 aggcagcggg gttcctggac cacgcgctga tttcgaagct gtcggcagtg aaggtcggca 3480

ES 2 517 394 T3

aggcgaagta ctcgatgac tgcaccgaat ccggtggcat catcgacgac ctgatcacct 3540  
 accgcctggg cgacaacgag ttctgatcg tgccgaacgc gggcaacgtg gacaacgtgg 3600  
 tctccgcact gcagggccgc accgagggtt ttgacgtgga ggttaacaac gaggccgatg 3660  
 cgacctccat gatcgccgta caggggcccc aggccgcgca ggcgatgctg gagatcgtgg 3720  
 agaacgtcgt ggatgcaccc gaggcacccg gcgcgggcga gaccggtgcc gaggctatcg 3780  
 aggggctggg ttactacgcg gcattcagcg gtggtgccgc aggtcagccc gtgctgggtgg 3840  
 cccgcacagg ctatacgggc gaggacgggt tcgagctgat cgtggctaac gatggtgccg 3900  
 agaccgtgtg gaccaaggct atggaccagg ctgvcagct gggggcctg ccgtgtggcc 3960  
 tggcctgccg cgacaccctg cgcctggagg ctggcatgcc gctgtacggc aacgagctat 4020  
 cgctgaagct caccocggtc gatgctgggc tgggcattct tgcggcgacg aagtctaagg 4080  
 actctttcgt tggctgtgac gccatcgttt ccgccaagga aaagggtacc cagcaggtac 4140  
 ttatcgggct ggcgggcgag ggtcgcgcg ctgcccgtgg gggatacagag gtgtttgccg 4200  
 gtgacggcga gaaggccatc ggtgccgtga cctccggtgc actgtcgcgc acgctgggcc 4260  
 acccgggtggc attggcatac gtcgcgaagt ccgcagtgc ctcgggcgcg gccgctgagg 4320  
 gtgvcaccgt ggaggtagac atccgcggca agcgccttga atacaaggtt gtggcgctgc 4380  
 cgttctactc ccgcgagaag taacgcaaga agtaacgaaa agggttgtct gcccgctggt 4440  
 gtaaggtttg ggcagacaac cacagaagta accacacaag gtttcacaag agaggcttaa 4500  
 aacaatgact gcactgccaa ctgacttccct gtactccgaa gagcacgagt gggttaacac 4560  
 ctccgctggt gttgagggcg agaccgtgcg cgtgggcatt acccacatcg ccgctgaggc 4620  
 gctgggtgac atcgtgttcg tcgagctgcc ggaggttggc tccgaggttg aggccggcga 4680  
 ggctttcggc gaggttgagt ccaccaagtc cgtttccgac atctacgac cggtttctgg 4740  
 cgaggttggt gctgtcaacg aggcgctgga agacaacgct ggctgatca acgaagatcc 4800  
 atacggtgag ggctggctgt acgaggtcaa ggtgaccgag gccggcgagc tgatggaggc 4860  
 tgaggcttac caggcggcta acgagtaaaa caagacceta tggtcggttc catgttcgca 4920  
 ttaatcctcg gcttggccct gttgggcctt gccgtgtggt tactcctgcg agcaaaagat 4980  
 agcaccggat ccgccctccc gcacgcttg cgggagggct tttcttttcc cgglattdaa 5040  
 atcgetagcg ggctgetaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtcgcg agaaacggtg 5100  
 ctgaccccg atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa 5160  
 gagaaagcag gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg 5220  
 gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg ggcgcctct ggttaagggtt ggaagccctg 5280  
 caaagtaaac tggatggctt tcttgccgc aaggatctga tggcgcaggg gatcaagatc 5340  
 tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg 5400

ES 2 517 394 T3

ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg 5460  
 ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cggccggttc tttttgtcaa 5520  
 gaccgacctg tccgggtccc tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct 5580  
 ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgcagtt gtcactgaag cgggaagggg 5640  
 ctggctgcta ttgggggaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc 5700  
 cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgttg atccggctac 5760  
 ctgcccatc gaccaccaag cgaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc 5820  
 cggctctgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact 5880  
 gttcgcacag ctcaaggcgc gcatgcccga cggcgaggat ctgctcgtga cccatggcga 5940  
 tgccctgctg ccgaatatca tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg 6000  
 ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctaccctg atattgtctga 6060  
 agagcttggc ggcaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga 6120  
 ttcgcagcgc atgccttct atgccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg 6180  
 ttcgaaatga ccgaccaagc gacgcccac ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc 6240  
 gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc gttttccggg acgcccgtg gatgatcctc 6300  
 cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gccacgcta gtttaactg cggatcagtg 6360  
 agggtttgta actgcgggtc aaggatctgg atttcgatca cggcacgac atcgtgcggg 6420  
 agggcaaggg ctccaaggat cgggccttga tgttaccga gagcttggca cccagcctgc 6480  
 gcgagcaggg gaattgatcc ggtggatgac cttttgaatg acctttaata gattatatta 6540  
 ctaattaat ggggacccta gaggtcccct tttttatttt aaaaattttt tcacaaaacg 6600  
 gtttacaagc ataacgggtt ttgctgcccg caaacgggct gttctggtgt tgctagtgtg 6660  
 ttatcagaat cgcagatccg gcttcaggtt tgccggctga aagcgtatt tcttcagaa 6720  
 ttgccatgat tttttccca cgggagcgt cactggtccc cgtggtgtcg gcagcttga 6780  
 ttcgataagc agcatgcct gtttcaggct gtctatgtgt gactgttgag ctgtaacaag 6840  
 ttgtctcagg tgttcaattt catgttctag ttgctttgtt ttactggtt cacctgttct 6900  
 attaggtgtt acatgctgtt catctgttac attgtcgac tgttcaggt gaacagcttt 6960  
 aatgcacca aaaactcgta aaagctctga tgtatctatc ttttttacac cgttttcac 7020  
 tgtgcatatg gacagttttc ctttgatat ctaacgggta acagttgttc tacttttggt 7080  
 tgttagtctt gatgcttcac tgatagatac aagagccata agaacctcag atccttccgt 7140  
 atttagccag tatgttctct agtgtggttc gttgtttttg cgtgagccat gagaacgaac 7200  
 cattgagatc atgcttactt tgcatgtcac tcaaaaattt tgcccaaaa ctgggtgagct 7260  
 gaatttttgc agttaaagca tcgtgtagtg ttttcttag tccgttacgt aggtaggaat 7320  
 ctgatgtaat ggttgttggg attttgtcac cattcatttt tatctggttg ttctcaagtt 7380

ES 2 517 394 T3

cggttacgag atccatttgt ctatctagtt caacttgaa aatcaacgta tcagtcgggc 7440  
 ggcctcgctt atcaaccacc aatttcatat tgctgtaagt gtttaaactt ttacttattg 7500  
 gttcaciaac ccattgggta agccttttaa actcatgta gttattttca agcattaaca 7560  
 tgaacttaaa ttcatcaagg ctaatctcta tatttgcctt gtgagttttc ttttgtgta 7620  
 gttcttttaa taaccactca taaatctcta tagagtattt gttttcaaaa gacttaacat 7680  
 gttccagatt atattttatg aattttttta actggaaaag ataaggcaat atctcttcac 7740  
 taaaaactaa ttctaatttt togcttgaga acttggcata gtttgtccac tggaaaatct 7800  
 caaagccttt aaccaagga ttcttgattt ccacagttct cgtcatcagc tctctgggtg 7860  
 ctttagctaa tacaccataa gcattttccc tactgatggt catcatctga gcgtattggt 7920  
 tataagtga cgataccgtc cgttctttcc ttgtagggtt ttcaatcgtg ggggtgagta 7980  
 gtgccacaca gcataaaatt agcttggtt catgctccgt taagtcatag cgactaatcg 8040  
 ctagttcatt tgctttgaaa acaactaatt cagacatata tctcaattgg tctaggtgat 8100  
 tttaatcact ataccaattg agatgggcta gtcaatgata attactagtc cttttccttt 8160  
 gagttgtggg tatctgtaaa ttctgctaga cctttgctgg aaaacttgta aattctgcta 8220  
 gaccctctgt aaattccgct agacctttgt gtgttttttt tgtttatatt caagtggta 8280  
 taatttatag aataaagaaa gaataaaaaa agataaaaag aatagatccc agcctgtgt 8340  
 ataactcact actttagtea gttccgcagt attacaaaag gatgtcgcaa acgetgtttg 8400  
 ctctctaca aaacagacct taaaacccta aaggcttaag tagcaccctc gcaagctcgg 8460  
 gcaaatcgct gaatattcct tttgtctccg accatcaggc acctgagtcg ctgtcttttt 8520  
 cgtgacattc agttcgctgc gctcacggct ctggcagtgat atgggggtaa atggcactac 8580  
 aggcgccttt tatggattca tgcaaggaaa ctaccataa tacaagaaaa gcccgtcacg 8640  
 ggcttctcag ggcgttttat ggcgggtctg ctatgtggtg ctatctgact ttttgcgtt 8700  
 cagcagttcc tgccctctga ttttccagtc tgaccacttc ggattatccc gtgacaggtc 8760  
 attcagactg gctaattcac ccagtaaggc agcggatca tcaacaggct tagtttaaac 8820  
 cgcaaagtcc cgcttcgtga aaattttcgt gccgcgtgat tttccgcaa aaactttaac 8880  
 gaacgttcgt tataatggtg tcatgacctt cacgacgaag tactaaaatt ggcccgaatc 8940  
 atcagctatg gatctctctg atgtcgcgct ggagtcggac gcgctcgatg ctgccgtcga 9000  
 tttaaaaacg gtgateggat ttttccgagc tctcgatacg acggacgcgc cagcatcacg 9060  
 agactgggac agtgccgca gcgacctaga aactctctg gcggatcttg aggagctggc 9120  
 tgacgagctg cgtgctcggc cagcgcagg aggacgaca gtagtggagg atgcaatcag 9180  
 ttgcgcctac tgccgtggcc tgattcctcc ccggcctgac ccgcgaggac ggcgcgcaaa 9240  
 atattgctca gatgcgtgct gtgccgcagc cagccgcgag cgcgccaaca aacgccacgc 9300

ES 2 517 394 T3

cgaggagctg gaggcggcta ggtcgcaaat ggcgctggaa gtgcgtcccc cgagcgaat 9360  
 tttggccatg gtcgtcacag agctggaagc ggcagcgaga attatcgcga tcgtggcggg 9420  
 gcccgcaggc atgacaaaaca tcgtaaatgc cgcgtttcgt gtgccgtggc cgcccaggac 9480  
 gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc gtcgcgcgtc gaaaaagcgc 9540  
 acagggcgga agaagcgata agctgcacga atacctgaaa aatggtgaac gccccgtgag 9600  
 cggtaaactca cagggcgtcg gctaaccccc agtccaaacc tgggagaaag cgctcaaaaa 9660  
 tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg gaaattttcc gctgatctgt 9720  
 tcgacacca tcccagctc gcgctgcgat cacgtggctg gacgagcga gaccgcccgcg 9780  
 aattcctcgc tcacctgggc agagaaaatt tccagggcag caagaccgcg gacttcgcca 9840  
 ggcgttggat caaagaccgc gacacggaga aacacagccg aagttatacc gagttggttc 9900  
 aaaatcgctt gcccggtgcc agtatgttgc tctgacgcac gcgcagcacg cagccgtgct 9960  
 tgtcctggac attgatgtgc cgagccacca ggccggcggg aaaatcgagc acgtaaacc 10020  
 cgaggcttac gcgattttgg agcgtgggc acgcctggaa aaagcgcag cttggatcgg 10080  
 cgtgaatcca ctgagcggga aatgccagct catctggctc attgatccgg tgatgcccgc 10140  
 agcagcatg agcagcccga atatgcgcct gctggctgca acgaccgagg aatgaccgcg 10200  
 cgttttcggc gctgaccagg ctttttcaca taggctgagc cgtggccaact gcaactctccg 10260  
 acgatcccag ccgtaccgct ggcatgccc gacaatcgc gtggatcgc tagctgatct 10320  
 tatggaggtt gctcgcagta tctcaggcac agaaaaacct aaaaaacgct atgagcagga 10380  
 gttttctagc ggacgggcac gtatcgaagc ggcaagaaaa gccactgcgg aagcaaaagc 10440  
 acttgccacg cttgaagcaa gcctgccgag cgcgctgaa cgtctcggag agctgatcga 10500  
 cggcgtccgt gtcctctgga ctgctccagg gcgtgccgc cgtgatgaga cggttttcg 10560  
 ccacgctttg actgtgggat accagttaaa agcggctggt gagcgcctaa aagacaccaa 10620  
 gggctcatcga gcctacgagc gtgcctacac cgtcgtcag gcggtcggag gaggcctgga 10680  
 gcctgatctg ccgcccgaact gtgaccgcca gacggattgg ccgacgctg tgcgcggcta 10740  
 cgtcgctaaa ggccagccag tcgtccctgc tcgtcagaca gagacgcaga gccagccgag 10800  
 gcgaaaagct ctggccacta tgggaagacg tggcggtaaa aaggccgag aacgctggaa 10860  
 agacccaaac agtgagtacg cccgagcaca gcgagaaaa ctactaagt ccagtcaacg 10920  
 acaagctagg aaagctaaag gaaatcgctt gaccattgca ggttggtta tgactgttga 10980  
 gggagagact ggctcgtggc cgacaatcaa tgaagctatg tctgaattta gcgtgtcacg 11040  
 tcagaccgtg aatagagcac ttaaggtctg cgggcattga acttcacga ggaccccga 11100  
 agcttcccag taaatgtgcc atctcgtagg cagaaaacgg tcccccgta ggtctctct 11160  
 cttggcctcc tttctaggtc gggctgattg ctcttgaagc tctctagggg ggctcacacc 11220  
 ataggcagat aacgttcccc accggctcgc ctctgaagcg cacaaggact gctcccaaag 11280  
 atcttcaaag ccactgccgc gactgccttc gcgaagcctt gccccgcgga aatttctctc 11340  
 accgagttcg tgcacacccc tatgccaagc ttctttcacc ctaaattcga gagattggat 11400  
 tcttaccgtg gaaattcttc gcaaaaatcg tcccctgac gcccttgcga cgttggcgtc 11460  
 ggtgcccgtg gttgcgcttg gcttgaccga c 11491

<210> 35

<211> 11639

ES 2 517 394 T3

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Plásmido pOM616

5 <400> 35

```

ttgatcagcg gccgcttcgc gaagcttgtc gaccgaaaca gcagttataa ggcatgaagc    60
tgtccggttt ttgcaaaagt ggctgtgact gtaaaaagaa atcgaaaaag accgttttgt    120
gtgaaaacgg tctttttggt tccttttaac caactgccat aactcgagge tattgacgac    180
agctatgggt cactgtccac caacccaaaac tgtgtcagc accgccaata tttctccctt    240
gaggggtaca aagagggtgc cctagaagag atccacgctg tgtaaaaatt ttacaaaaag    300
gtattgactt tccctacagg gtgtgtaata atttaattac aggcgggggc aaccccgctt    360
gttctagaag gaggtgatag tatgtcttct gcagctacce gccgtaattc agcccccttc    420
gttcagcgcc acatcggccc aaaccaggcc gataccagg agatcctcga ttacctgggc    480
tatgaatctt ccgcccgcct ggcgcagcat gccctcccga agtcgatccg ccaggcagge    540
ccgatcggcc tgcgcgaggg actggatgag acggacaccc tggccgccct gcgtgcttac    600
gctgacaaga acgtgcagaa gcagcagctg atcggcaacg gttacttcga cacgatcact    660
ccggccgtga ttcgccgcaa cgtggtggag aaccggggtt ggtacaccgc ctacaccccc    720
taccagccgg aaatctccca ggggcgcctc gaggccctgc tgaacttcca gacgatggtg    780
caggacctga ccggcctgcc agtggccggt gcttcgctgt tagacgaagc caccgcagtg    840
gccgagggcc tgcagctgat ggctcgcggc aatgcgaagg ctgccaaaga gggcggcgtg    900
gtgctgctgg attcctccct gcaccagcag tccatcaccc taacctggc gcgcgctgag    960
gctcggggtg tcccggtgga ggtcgtggac ctggacggcg aagatgctac cgccgcgttt   1020
gagggccgcg agaacctcgt cggcgtggtg ctttccaacc ccggctccac cggccgcgtc   1080
cgcgacctgt ccggtctgat ctctgcggcg aaggagaccg gcgctctggt gacggtcgct   1140
tgtgaacctg tggctcaggt tctggtgacc tcccggggtt cccaaggtgc cgacattgct   1200
gtcggctccg ccagcgcctt cggcgtgccg ctattcttcg gtggcccga cgcgggcttc   1260
atctcctgca ccgaggtctt gcagcgtaa gctgccggcc gcatcgtggg cgtgtccgtg   1320
gatgccgagg gcaccccgcc ctaccgcttg gctctgcaga cccgtgagca gcacattcgc   1380

```

ES 2 517 394 T3

cgcgacaagg ccaccagtaa catctgtacc gctcaggctc tgctggccgt cgttgccggt 1440  
 ttctacgcgg tctggcacgg cccagccggc ctgcgcgcca tcgccgaggg ggtgcacgcc 1500  
 cgcgcgaccg ccctggccgt tgccctgtcc gaggetggcc tgacgetggc gcacgatacc 1560  
 ttcttcgaca ccgtcaccgt tgacgtgtct ggttcttctc ttggtgacgc ccccacggct 1620  
 ctgcgcgccc cagccgaggc aggctacaac ctgcgccagg ttaacgattc cttcgtcggc 1680  
 atctctgtcg gcgagtccac cacggacgag gacattgcca agctgatcga ggtgctgggc 1740  
 tcccgcaccg gcgaggtaaa ctccgcgagc ttcgacgtca ccgccggccc gctgggagag 1800  
 gccggcgtgc tgcgcgcgga ggacgaggag attctgacct acccgatctt caccgccatc 1860  
 acttccgaga cccagatgat gcgctacatg cgcaagctgg ccgaccgcca cctggcgctg 1920  
 gatcgtacga tgatcccgtt gggctcctgc accatgaagc tgaacgcggc cgtctccatg 1980  
 gagccgatca cctggcctgg cttcgcaggc atccaccgc acgtcccggc cgagcagggc 2040  
 cagggctggc tggagctcat cgaggacctg gaggagcgc tggcgaagat caccggctac 2100  
 gccaaagttt ccgtccagcc gaacgcgggc tcccagggcg agttcgcggc cctgctggcg 2160  
 atccaccgct accaccagtc ccgcggcgac gatcagcgtg acatcgttct gatcccggcc 2220  
 tccgcgcacg gcaccaacgc tgcctctgca gcgctggcgg gcctgaaggt cgtggctgtg 2280  
 aagaatgccg aagacggctc catcgacgtg ccggacctgg aggccaaact ggagaagtac 2340  
 ggcgagcaga ccgccgccat catgctgacc taccctcca cccacggcgt gttcgaggag 2400  
 caggtgcgcg acgtctgcca gaaggttcac gacgctggcg gccaggtgta cgtcgacggc 2460  
 gctaacctga acgcccctgt cggcctggcc cagccgggcg agttcggcgg cgacgtatcc 2520  
 cacctgaacc tgcacaagac cttcaccatc ccgcacggtg gtggcggccc gggcggtggc 2580  
 ccggtgtgcg tggcagagca cctgatcccg ttctcgcca ccgaccgaa cgccgacgtt 2640  
 atcgagggcg atgctgcctt gcagtcggc cagccggtct ccggcgcgca gtacggctcc 2700  
 gctggcgtgc tgccgatcac ctggctctac atcgcacaga tgggagcaga aggcctgact 2760  
 gaggcctccc gcatggcctt ggtgaacgcc aactacgttt cccgcaagct ggaggactac 2820  
 taccgcagcg tgtacaaggg cgacaccggc ctggtcgccc acgagtgcac cctggacctg 2880  
 cgtgaactca cgaaggcctc cggcatcacc gccgaggacg tatccaagcg cctgatggac 2940  
 ttccgcttcc acgccccgac cttggccttc ccggtcgccc gcaccctgat gatggagccc 3000  
 accgagtcgg aggacaagga agagctggac cgcttcatcg aagcgatgat caccatccac 3060  
 ggggagatcc aggaagtat cgacggcaag gtcaccgccc aacagtcctt tctgcgccac 3120  
 gcgcgcttta ccgcctattc tgttgtgccc gacgacttcc aggaagctgt atccggtggt 3180  
 cacttcagcc gtgccaaggc cgcatacccg gtggctagcc tgcgacacac caagtacttc 3240  
 acccccgtgc gtcgtatcga caacgcctat ggcgaccgca atctcgtgtg cacctgcccg 3300  
 cccctggaag acttcgcaat taacgaggac tagggctccc tggagctaag ggcgtcacia 3360

ES 2 517 394 T3

agagaagaag gagaacaaga catgaccgaa ctaagaaga ccgcgctgca cctggtgcac 3420  
 gagaagttgg gcgcgcgatt taccgacttc ggcggctggg acatgcctct gaagtacagc 3480  
 agtgagctgg acgagcacca cgctgtacgc aatgccgtgg gcgtattcga cctctcccac 3540  
 atgggtgagg ttcgcgtgac cggccccgag gcagcggagt tcctggacca cgcgctgatt 3600  
 tcgaagctgt cggcagtgaa ggtcggcaag gcgaagtact cgatgatctg caccgaatcc 3660  
 ggtggcatca tcgacgacct gatcacctac cgctgggcg acaacgagtt cctgatcgtg 3720  
 ccgaacgcgg gcaacgtgga caacgtggtc tccgcactgc agggcgcgac cgagggtttt 3780  
 gacgtggagg ttaacaacga gtccgatgcg acctccatga tcgccgtaca ggggcccagg 3840  
 gccgcgcagg cgatgctgga gatcgtggag aacgtcgtgg atgcaccgga ggcatccggc 3900  
 gcgggcgaga ccgttgccga ggctatcgag gggctgggtt actacgcggc attcagcggc 3960  
 gttgcgcgag gtcagcccgt gctgggtggc cgcacaggct ataccggcga ggacggtttc 4020  
 gagctgatcg tggctaacga tggtgccgag accgtgtgga ccaaggctat ggaccaggct 4080  
 gcgcagctgg gtggcctgcc gtgtggcctg gcctgccgcg acaccctgcg cctggaggct 4140  
 ggcatgccgc tgtacggcaa cgagctatcg ctgaagctca ccccggtcga tgctgggctg 4200  
 ggcatctctg cggcgcagaa gtctaaggac tctttcgttg gtcgtgacgc catcgtttcc 4260  
 gccaaagaaa agggatacca gcaggtaact atcgggctgg cgggcgaggg tcgccgcgct 4320  
 gcccggtggg gatacgaggt gtttgccggg gacggcgaga aggccatcgg tgccgtgacc 4380  
 tccggtgcac tgtcgcgcac gctgggccac ccggtggcat tggcatacgt cgcaagtcc 4440  
 gcagtgtcct ccggcgcggc cgctgagggg gcgaccgtgg aggtagacat ccgcggcaag 4500  
 cgctttgaat acaagttgt ggcgctgccg ttctactccc gcgagaagta acgcaagaag 4560  
 taacgaaaag ggttgtctgc ccgctggtgt aaggtttggg cagacaacca cagaagtaac 4620  
 cacacaaggt ttcacaagag aggcttaaaa caatgactgc actgccaaact gacttcctgt 4680  
 actccgaaga gcacgagtggt gttaacacct ccgctggtgt tgagggcgag accgtgcgcg 4740  
 tgggcattac ccacatcgcc gctgaggcgc tgggtgacat cgtgttcgtc gagctgccgg 4800  
 aggttggtct cgaggttgag gccggcgagg ctttcggcga ggttgagtcc accaagtccg 4860  
 tttccgacat ctacgcaccg gtttctggcg aggttgtggc tgtcaacgag gcgctggaag 4920  
 acaacgctgg cctgatcaac gaagatccat acggtgaggg ctggtgttac gaggtcaagg 4980  
 tgaccgaggg cggcgcgctg atggaggctg aggcttacca ggcggctaac gagtaaaaca 5040  
 agaccetatg gtcggttcca tgctcgatt aatcctcgcc ttggccctgt tgggccttgc 5100  
 cgtgtggtta etcctgcgag caaaagatag caccggatcc gccctcccgc acgctttgcg 5160  
 ggagggtttt tcttttcccg gtatttaaat cgetagcggg ctgctaaagg aagcggaaaca 5220  
 cgtagaaagc cagtccgcag aaacggtgct gacccccgat gaatgtcagc tactgggcta 5280

ES 2 517 394 T3

tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt agcttgcaagt gggcttacat 5340  
ggcgatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg ccagctgggg 5400  
cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaactg gatggctttc ttgccgcaa 5460  
ggatctgatg ggcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga tcgtttcgca 5520  
tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg 5580  
gctatgactg ggcacaacag acaatcggtt gctctgatgc cgccgtgttc cggtgtcag 5640  
cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg aatgaactgc 5700  
aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc 5760  
tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg 5820  
atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc 5880  
ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg aacatcgc 5940  
tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgcga tcaggatgat ctggacgaag 6000  
agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc atgcccgacg 6060  
gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg 6120  
gccgcttttc tggattcacc gactgtggcc ggtgggtgt ggcggaccgc taccaggaca 6180  
tagcgttggc taccogtgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggtt gaccgcttc 6240  
tcgtgcttta cggatcggc gctcccatt cgacgcgat cgccttctat cgccttctt 6300  
acgagttctt ctgagcggga ctctggggtt cgaatgacc gaccaagcga cgcccaacct 6360  
gccatcacga gatctcgatt ccaccgccgc ctctatgaa aggttgggct tcggaatcgt 6420  
tttccgggac gccggctgga tgatcctcca gcgcgggat ctcatgctgg agttcttcgc 6480  
ccacgctagt ttaaactcgc gatcagtgag ggtttgtaac tgcgggtcaa ggatctggat 6540  
ttcgatcacg gcacgatcat cgtgcgggag ggcaagggtt ccaaggatcg ggccttgatg 6600  
ttacccgaga gcttggcacc cagcctgcgc gacgagggga attgatccgg tggatgacct 6660  
tttgaatgac ctttaataga ttatattact aattaattgg ggaccctaga ggtcccctt 6720  
tttattttaa aaatTTTTTt acaaaacggt ttacaagcat aacgggtttt gctgcccgca 6780  
aacgggctgt tctgggtgtg ctagtgtgtt atcagaatcg cagatccggc ttcaggtttg 6840  
ccggtgaaa gcgctatttc ttccagaatt gccatgattt tttcccacg ggaggcgtca 6900  
ctggtccccg tgtgtcggc agctttgatt cgataagcag catcgcctgt ttcaggtgt 6960  
ctatgtgtga ctgttgagct gtaacaagt gtctcaggtg ttcaatttca tgttctagtt 7020  
gctttgtttt actggtttca cctgttctat taggtgttac atgctgttca tctgttacat 7080  
tgtcgatctg ttcatgggtg acagctttaa atgcacaaa aactcgtaaa agctctgatg 7140  
tatctatctt ttttacaccg tttcatctg tgcatatgga cagttttccc tttgatctt 7200  
aacggtgaac agttgttcta cttttgtttg ttagtcttga tgcttcaactg atagatacaa 7260

ES 2 517 394 T3

gagccataag aacctcagat ccttccgtat ttagccagta tgttctctag tgtggttcgt 7320  
tgtttttgcg tgagccatga gaacgaacca ttgagatcat gcttactttg catgtcactc 7380  
aaaaattttg cctcaaaaact ggtgagctga atttttgcag ttaaagcatc gtgtagtggt 7440  
tttcttagtc cgttacgtag gtaggaatct gatgtaatgg ttgttggtat tttgtcacca 7500  
ttcatTTTTA tctggttggt ctcaagtctg gttacgagat ccatttgtct atctagttca 7560  
acttgaaaa tcaacgtatc agtcgggagg cctcgcttat caaccaccaa tttcatattg 7620  
ctgtaagtgt ttaaattctt acttattgggt ttcaaaaacc attggttaag ccttttaaac 7680  
tcatggtagt tattttcaag cattaacatg aacttaaatt catcaagget aatctctata 7740  
tttgccttgt gagttttctt ttgtgtagt tcttttaata accactcata aatcctcata 7800  
gagtatttgt tttcaaaaga cttaacatgt tccagattat attttatgaa ttttttaac 7860  
tggaaaagat aaggcaatat ctcttacta aaaactaatt ctaatttttc gcttgagaac 7920  
ttggcatagt ttgtccactg gaaaatctca aagcctttaa ccaaaggatt cctgatttcc 7980  
acagtctctg tcatcagctc tctggttctg ttagctaata caccataagc attttcccta 8040  
ctgatgttca tcatctgagc gtattgggta taagtgaacg ataccgtccg ttctttcctt 8100  
gtagggtttt caatcgtggg gttgagtagt gccacacagc ataaaattag cttggtttca 8160  
tgctccgtta agtcatagcg actaatcgtt agttcatttg ctttgaaaac aactaattca 8220  
gacatacatc tcaattggtc taggtgattt taatcactat accaattgag atgggctagt 8280  
caatgataat tacttagtctt tttcctttga gttgtgggta tctgtaaatt ctgetagacc 8340  
tttgetggaa aacttgtaaa ttctgctaga ccctctgtaa attccgctag acctttgtgt 8400  
gttttttttg tttatattca agtgggtata atttatagaa taagaaaga ataaaaaag 8460  
ataaaaagaa tagatcccag ccctgtgtat aactcactac ttagtctcagt tccgcagtat 8520  
tacaaaagga tgtcgcaaac gctgtttctt cctctacaaa acagacctta aaaccctaaa 8580  
ggcttaagta gcaccctcgc aagctcgggc aaatcgtctg atattccttt tgtctccgac 8640  
catcaggcac ctgagtcgct gtctttttcg tgacattcag ttcgctgcgc tcacggctct 8700  
ggcagtgaat gggggtaaat ggcactacag gcgcctttta tggattcatg caaggaaact 8760  
accataata caagaaaagc ccgtcacggg cttctcaggg cgttttatgg cgggtctgct 8820  
atgtgggtgt atctgacttt ttgctgttca gcagttcctg ccctctgatt ttccagtctg 8880  
accacttcgg attatcccgt gacaggtcat tcagactggc taatgcacc cagtaaggcag 8940  
cggtatcatc aacaggctta gtttaaacgg caaagtcctg cttcgtgaaa attttctgtc 9000  
cgcgtgattt tccgcaaaa actttaacga acgttcgtta taatgggtgc atgaccttca 9060  
cgacgaagta ctaaaattgg cccgaatcat cagctatgga tctctctgat gtcgcgctgg 9120  
agtccgacgc gctcagatct gccgtcgatt taaaaacggt gatcggattt ttccgagctc 9180

ES 2 517 394 T3

tcgatacgac ggacgcgcca gcatcacgag actgggccag tgccgcgagc gacctagaaa 9240  
 ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg tgctcggcca gcgccaggag 9300  
 gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt gcgcctactg cggaggcctg attcctcccc 9360  
 ggctgacce gcgaggacgg cgcgcaaaaat attgctcaga tgcgtgtcgt gccgcagcca 9420  
 gccgcgagcg cgccaacaaa cgccacgccg aggagctgga ggccggctagg tcgcaaatgg 9480  
 cgctggaagt gcgtcccccg agcgaattt tggccatggt cgtcacagag ctggaagcgg 9540  
 cagcgagaat tatcgcatc gtggcgggtgc ccgcaggcat gacaaacatc gtaaatgccg 9600  
 cgtttcgtgt gccgtggccg cccaggacgt gtcagcgccg ccaccacctg caccgaatcg 9660  
 gcagcagcgt cgcgcgtcga aaaagcgcac aggcggcaag aagcgataag ctgcacgaat 9720  
 acctgaaaaa tgttgaacgc cccgtgagcg gtaactcaca ggcgctcggc taacccccag 9780  
 tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg attcacgaga cattgacaca 9840  
 ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc gacaccatc ccgagctcgc gctgcgatca 9900  
 cgtggctgga cgagcgaaga ccgccgcgaa ttctcgtctc acctgggcag agaaaatttc 9960  
 cagggcagca agaccgcgca ctctgccagc gcttggatca aagaccggga cacggagaaa 10020  
 cacagccgaa gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc ccggtgccag tatgttctc 10080  
 tgacgcacgc gcagcacgca gccgtgcttgc tcttgacat tgatgtgccg agccaccagg 10140  
 ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccctg aggtctacgc gattttggag cgctgggcac 10200  
 gcctggaaaa agcgcagctc tggatcggcg tgaatccact gagcgggaaa tgccagctca 10260  
 tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc 10320  
 tggctgcaac gaccgaggaa atgaccgcg ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata 10380  
 ggctgagccg tggcactcgc actctccgac gatcccagcc gtaccgctgg catgcccagc 10440  
 acaatcgctg ggatcgccta gctgatctta tggagggtgc tcgcatgac tcaggcacag 10500  
 aaaaacctaa aaaaagctat gagcaggagt tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg 10560  
 caagaaaagc cactcgggaa gcaaaagcac ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg 10620  
 ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt cctctggact gctccagggc 10680  
 gtgcgcgccg tgatgagacg gcttttcgce acgctttgac tgtgggatac cagttaaaag 10740  
 cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg gtcacgagc ctacgagcgt gcctacaccg 10800  
 tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga 10860  
 cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc 10920  
 gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg 10980  
 gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaaag acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc 11040  
 gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga 11100  
 ccattgcagc ttggtttatg actggtgagc gagagactgg ctcgtagccg acaatcaatg 11160

ES 2 517 394 T3

aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa tagagcaett aaggtctgcg 11220  
 ggcattgaac ttccacgagg acgccgaaag cttcccagta aatgtgccat ctcgtaggca 11280  
 gaaaaacgggt cccccgtagg gtctctctct tggcctcctt tctaggtegg gctgattgct 11340  
 cttgaagctc tctagggggg ctcacacccat aggcagataa cgttccccac cggctcgcct 11400  
 cgtaagcgca caaggactgc tccc aaagat cttcaaagcc actgccgcga ctgccttcgc 11460  
 gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg cacacccta tgccaagctt 11520  
 ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc 11580  
 ccctgatcgc ccttgcgacg ttggcgtcgg tgccgctggt tgcgcttggc ttgaccgac 11639

<210> 36

<211> 13915

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pOM620AF

<400> 36

ttgatcagcg gccgcacagc gatcccagag gaaatatact ctggggctgc tgtgtcgacc 60  
 ttaaagtttg gctgccatgt gaatttttag caccctcaac agttgagtgc tggcactctc 120  
 gggggtagag tgccaaatag gttgtttgac acacagttgt tcacccgcga cgacggctgt 180  
 gctggaaacc cacaaccggc acacacaaaa tttttctaga aggaggtgat agtatgtctt 240  
 ctgcagctac ccgccgtaat tcagccccct tcgttcagcg ccacatcggc ccaaaccagg 300  
 ccgataccca ggagatcctc gattacctgg gctatgaatc ttccgccgag ctggccgacg 360  
 atgccctccc gaagtcgac cgcacggcag gcccgatcgg cctgccggag gcaactggatg 420  
 agacggacac cctggccgcc ctgctgtgctt acgctgacaa gaacgtgcag aagcagcagc 480  
 tgatcggcaa cggttacttc gacacgatca ctccggccgt gattcggccg aacgtggtgg 540  
 agaaccggg ctggtacacc gcctacacc cctaccagcc ggaaatctcc caggggccc 600  
 tcgaggccct gctgaacttc cagacgatgg tgcaggacct gaccggcctg ccagtggccg 660  
 gtgcttcgct gttagacgaa gccaccgagc tggccgagge cgtgcagctg atggctcgcg 720  
 gcaatgcaaa ggctgccaag aagggcggcg tgggtgctgt ggattctctc ctgcaccage 780  
 agtccatcac cgtaaccctg gcgcgcgctg aggctgcggg tatcccgtg gaggtcgtgg 840  
 acctggacgg cgaagatgct accgcccggt ttgagggccc cgagaacctc gtcggcgtgg 900  
 tgctttccaa ccccggctcc accggccgag tccgcgacct gtccggctct atctctgcgg 960  
 cgaaggagac cggcgtctct gtgacggctc cttgtgacct gctggctcag gttctggtga 1020  
 cctccccggg ctccc aaggt gccgacattg ctgtcggctc cgcaccagcgc ttcggcgtgc 1080  
 cgctattctt cgggtggccc cacgcgggct tcatctctct caccgaggct ctgcagcgt 1140

ES 2 517 394 T3

agctgccggg ccgcatcgtg ggcgtgtccg tggatgccga gggcaccocg gcctaccgct 1200  
 tggctctgca gaccocgtgag cagcacattc gcccgacaaa ggccaccagt aacatctgta 1260  
 ccgctcaggc tctgctggcc gtcggtgccg gtttctacgc ggtctggcac ggcccagccg 1320  
 gcctgcccgc catcgcgcgag ggggtgcacg cccgcgcgac cgcocctggcc gttgcctgt 1380  
 ccgaggctgg cctgacgctg gcgcacgata ctttcttcga caccgtcacc gttgacgtgt 1440  
 ctggttcttc tcttgggtgac gccccacgg ctctgcgcgc cgcagccgag gcaggctaca 1500  
 acctgcgcca ggtaacgat tccttcgtcg gcctctctgt cggcgagtcc accacggacg 1560  
 aggacattgc caagctgatc gaggtgctgg gctcccgcac cggcgaggtc aactccgcga 1620  
 gcttcgacgt caccgcocggc ccgctggcg aggccggcgt gctgcgcgcg gaggacgagg 1680  
 agattctgac ccaccgatc ttcaccgcca tcaactccga gaccagatg atgcgctaca 1740  
 tgcgcaagct ggccgaccgc gacctggcgc tggatcgtac gatgatcccg ctgggctcct 1800  
 gcaccatgaa gctgaacgcg gccgtctcca tggagccgat cacctggcct ggcttcgacg 1860  
 gcctccaccg gcacgtcccg gccgagcagg cgcagggctg gctggagctc atcgaggacc 1920  
 tggaggagcg cctggcgaag atcaccggct acgccaaggt ttccgtccag ccgaacgcgg 1980  
 gctcccaggg cgagttcgcc ggcctgctgg cgatccaccg ctaccaccag tcccgcggcg 2040  
 acgatcagcg tgacatcgtt ctgatcccgg cctccgcgca cggcaccac gctgcctctg 2100  
 cagcgtggc gggcctgaag gtcgtggctg tgaagaatgc cgaagacggc tccatcgacg 2160  
 tgccggacct ggaggccaag ctggagaagt acggcgagca gaccgcccgc atcatgctga 2220  
 cctaccctc caccacggc gtgttcgagg agcaggtgcg cgacgtctgc cagaaggttc 2280  
 acgacgctgg cggccaggtg tacgtcgacg gcgctaacct gaacgccctg gtcggcctgg 2340  
 cccagccggg cgagttcgcc ggcgacgtat cccacctgaa cctgcacaag accttcacca 2400  
 tcccgcacgg tgggtggcggc ccgggcgttg gcccggtgtg cgtggcagag cacctgatcc 2460  
 cgttctctgc caccgaccgg aacgccgacg ttatcgaggg cgatgctgcc ctgcagtccg 2520  
 gccagccggt ctccggcgcg cagtaacgct ccgctggcgt gctgcccgat acctggtcct 2580  
 acatcgcaca gatgggcgac gaaggcctga ctgaggcctc ccgcatggcc ctggtgaacg 2640  
 ccaactacgt ttcccgcaag ctggaggact actaccgac gctgtacaag ggcgacaccg 2700  
 gcctggctgc ccacgagtgc atcctggacc tgcgtgaact cacgaaggcc tccggcatca 2760  
 ccgccgagga cgtatccaag cgcctgatgg acttcgggtt ccacgccccg accttggcct 2820  
 tcccggctgc cggcaccctg atgatggagc ccaccgagtc ggaggacaag gaagagctgg 2880  
 accgcttcat cgaagcgatg atcaccatcc acggggagat ccaggaagtt atcgacggca 2940  
 aggtcaccgc cgaacagtcc gttctgcgcc acgcgccgtt taccgcctat tctggtgtgc 3000  
 gggacgactt cgaggaagct gtatccggtg gtcacttcag ccgtgccaag gccgcatacc 3060  
 cgggtggctag cctgcgacac accaagtact tcacccccgt gcgtcgtatc gacaacgcct 3120

ES 2 517 394 T3

atggcgaccg caatctcgtg tgcacctgcc cgcccctgga agacttcgca attaacgagg 3180  
actaggggcc gctggagcta agggcgctcac aaagagaaga aggagaacaa gacatgaccg 3240  
aacttaagaa gaccgcgctg cacctggtgc acgagaagtt gggcgcgca tttaccgact 3300  
tcggcggctg ggacatgcct ctgaagtaca gcagtgaact ggacgagcac cacgctgtac 3360  
gcaatgcegt gggcgctattc gacctctccc acatgggtga ggttcgctg accggcccgc 3420  
aggcagcggg gttcctggac cacgcgctga tttcgaagct gtcggcagtg aaggtcggca 3480  
aggcgaagta ctcgatgatc tgcaccgaat ccggtggcat catcgacgac ctgatcacct 3540  
accgctggg cgacaacgag ttcctgatcg tgccgaacgc gggcaacgtg gacaacgtgg 3600  
tctccgcact gcagggccgc accgagggct ttgacgtgga ggttaacaac gagtccgatg 3660  
cgacctccat gatgcctgta caggggcccc aggccgcgca ggcgatgctg gagatcgtgg 3720  
agaacgtcgt ggatgcaccc gaggcacccg gcgcgggcga gaccggtgcc gaggtatcg 3780  
aggggctggg ttactacgcg gcattcagcg gtggtgccc aggtcagccc gtgctgggtg 3840  
cccgcacagc ctataccggc gaggacggtt tcgagctgat cgtggctaac gatggtgccc 3900  
agaccgtggt gaccaaggct atggaccagg ctgcgcagct ggggtggcctg ccgtgtggcc 3960  
tggcctgccc cgacaccctg cgcctggagg ctggcatgcc gctgtacggc aacgagctat 4020  
cgctgaagct caccocggtc gatgctgggc tgggcattct tgcggcgacg aagtctaagg 4080  
actctttcgt tggctcgtgac gccatcgttt ccgccaagga aaagggtacc cagcaggtac 4140  
ttatcgggct ggcgggagag ggtcgcgccc ctgcccgtgg gggatacagag gtgtttgccg 4200  
gtgacggcga gaaggccatc ggtgccgtga cctccggtgc actgtcgcgc acgctgggcc 4260  
accgggtggc attggcatac gtcgcgaagt ccgcagtgtc ctccggcgcg gccgctgagg 4320  
gtgcgaccgt ggaggtagac atccgcggca agcgccttga atacaagggt gtggcgctgc 4380  
cgttctactc ccgcgagaag taacgcaaga agtaacgaaa agggttgtct gcccgctggt 4440  
gtaaggtttg ggcagacaac cacagaagta accacacaag gtttcacaag agaggcttaa 4500  
aacaatgact gcactgccaa ctgacttctt gtactccgaa gagcacgagt gggttaaac 4560  
ctccgctggt gttgagggcg agaccgtgcg cgtgggcatt acccacatcg ccgctgaggc 4620  
gctgggtgac atcgtgttcg tcgagctgcc ggagggtggc tccgagggtg aggccggcga 4680  
ggctttcggc gaggttgagt ccaccaagtc cgtttccgac atctacgca cggtttctgg 4740  
cgaggttggt gctgtcaacg aggcgctgga agacaacgct ggctgatca acgaagatcc 4800  
atagggtag ggctggctgt acgaggtcaa ggtgaccgag gccggcgagc tgatggaggc 4860  
tgaggttac cagggcgcta acgagtaaaa caagacceta tggctgggtc catgttcgca 4920  
ttaatcctcg gcttggccct gttgggcctt gccgtgtggt tactcctgcg agcaaaagat 4980  
agcaccggat ccgccctccc gcacgcttg cgggagggtt tttctttcc cggtatttca 5040

ES 2 517 394 T3

gtagctcggg ggcgtctcat tcagcaaacc tagctccata tccgcctctg ggctctccca 5100  
 ccccgcacca aaatctctcg cgagaggcct tcagggccct taaatgtcgg aaaagttgca 5160  
 atttgttaat gctactggtt ttcaaatacg caaatgcgca ggtcaagggg cttttgggaa 5220  
 agtggaacc aatcccgatt tgaagaattg caacttttcc gacattaagc ggccttcagg 5280  
 aagtgccaaa caccggaggc accagcatca acgtcaccac ctggcatatc tagcaccatc 5340  
 agaagettca gcctcactac agcgggaacc tgacgccagc gggacctcac ccagcgggac 5400  
 agaaccagc ggaacttggc gccagcggaa ccgcagccac cagctcccac cagcaccagc 5460  
 cagcgccaag gcaccactgg agtatcatcg ccaccatggg attccagcaa ggcagcatcc 5520  
 gcaaagcaaa catgggcaca accggcacta acgacggggc aaccacccca ccagccaaca 5580  
 ccagcaccac agccgtagac atcgacgtcc gcgacctggg caccgtggac tacgaggaca 5640  
 cttggcacct ccaggcaaat ctgcgcgcc agcgcgccga agaaaaaatc ccagacacca 5700  
 tcctcctact ccagcatccg ccgacgtaca ccgccggcaa gcgcaccacg gattccgacc 5760  
 gccctaccaa cggcctgcca gtagtcgacg tcgaccgcgg aggcgcgcatc acctggcatg 5820  
 gaccgggcca gttggctgca tatcccatca tcaagctggc cgaccgggtg gacgtggtcg 5880  
 attatgtccg ccgcctggag caggcgctaa tccagacttg tgaagatctt ggcttgacg 5940  
 gcaccggccg cgtagagggg cgttcgggcg tgtggctgcc tgcgggcgtc attaagggg 6000  
 agctcaagcc cgcacgtaag atagccgca tcggcatccg cgtgacgcgc ggcgtgacca 6060  
 tgcacggagt ggcctcaac tgcgataaca ccatggagta ttacgaccac attgtgcctt 6120  
 gtgggctggc ggatgcgggt gtcacgacgc tcaccgagga gctggggcgc gatgtagtg 6180  
 tttctgacgc ctactcatcc ctgcgccaca acctcgttga tgctttgaac ggcgacttgc 6240  
 cggtgcatc ctaggggaaa acccgaggtg gattcctata cggcaccacg cgtaggctag 6300  
 tcggcatgag tgtgaccgca gatggacgcc ggatgctacg catcgaggcg aagaatgccg 6360  
 aaacccccat cgagtcgaag cctcgggtgga tccgcacgac cgcgaaggtc ggcccggagt 6420  
 atcgggatat taagaatcgc gtgaagggcg ctggcctgca caccgtgtgc caagaggctg 6480  
 gctgcccga tatcaacgag tgctgggagg accgcgaggc gacgttcctc atcggcggtg 6540  
 atacgtgttc ccgcggttgc gacttctgcc agattaagtc cggccgccc tccccgctgg 6600  
 atatggacga gccacgccc gcggcggaga atgtccgcga gatgggtctg cgctacgcca 6660  
 ccatcaccgg cgtgacgcgc gatgacctgg atgatgaggg cgcgtggctg tatgccgagg 6720  
 ttgtgaaga gattcacgag ctgaaccoga acacgggtgt ggagaatctg acgccagatt 6780  
 tttccaaccg cccggagctg ctgaaggtcg tcttcgattc ccagccggag gtgtttgcc 6840  
 acaacctgga gacagttccg cgcatcttta agcgcacccg cccggccttt aagtacgacc 6900  
 gttccctgga ggtcattcag gcagctcacg attacggcct ggtgacgaag tccaacctga 6960  
 tcctgggcat gggtgagaag aaggaagagg tccgcgcggc tatcaaggac ctggcagacg 7020

ES 2 517 394 T3

ccggcaccga cattctgacg attacccagt acctgcgccc gtettccatg caccacccga 7080  
 ttgagcgttg ggtgaagccg gaggagtcca tggagcactc cgacgcagcc tacgagctgg 7140  
 gcatcaaggc tgttatgtcc ggcccgttgg tgcgttcctc ttaccgcgcc ggccgcctgt 7200  
 acgcgcaggc caagcaggcg cgcggcgagg ctattccgga gaacctgaag cacttggagg 7260  
 agactctcga ttccaccacg tcgcaggagg cctctacact gctggagcgc tacggcgctt 7320  
 cggaggacac gccggtcact gcgtcgcgcc gctagctcgg cggggcactt tcgccccgcc 7380  
 tttattcatg ecttattggt gaatccatgg cgaaggataa aaaggacgta agggteaagg 7440  
 aagagaagaa ggcagctaag gcaaactcgt agcgggctgc taaaggaagc ggaacacgta 7500  
 gaaagccagt ccgcagaaac ggtgctgacc ccggatgaat gtcagctact gggetatctg 7560  
 gacaagggaa aacgcaagcg caaagagaaa gcaggtagct tgcagtgggc ttacatggcg 7620  
 atagctagac tgggcggttt tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc 7680  
 ctctggtaag gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat 7740  
 ctgatggcgc aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat 7800  
 tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc gcccgcttgg gtggagaggc tattcggcta 7860  
 tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca 7920  
 ggggcgcccc gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gcctgaatg aactgcagga 7980  
 cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggctt ccttgcgcag ctgtgctcga 8040  
 cgttgctact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct 8100  
 cctgtcatct caccttctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg 8160  
 gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac atcgcacga 8220  
 gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca 8280  
 tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga 8340  
 ggatctcgtc gtgacctatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg 8400  
 ctttctgga ttcategact gtggccggtt ggggtgtggc gaccgctatc aggacatagc 8460  
 gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt 8520  
 gctttacggt atcgcgcctc ccgattcgca gcgcacgcc ttctatcgcc ttcttgacga 8580  
 gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca 8640  
 tcacgagatt tcgattccac cgcgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgtttc 8700  
 cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatetca tgetggagtt cttegccac 8760  
 gctagttaa actgcggatc agtgagggtt tgtaactcgc ggtcaaggat ctggatttcg 8820  
 atcacggcac gatcatcgtg cgggagggca agggctccaa ggatcgggcc ttgatgttac 8880  
 ccgagagctt ggcacccagc ctgcgcgagc aggggaattg atccggtgga tgacctttg 8940

ES 2 517 394 T3

aatgaccttt aatagattat attactaatt aattggggac cctagaggtc ccctttttta 9000  
ttttaaaaat tttttcacia aacggtttac aagcataacg ggttttgctg cccgcaaacg 9060  
ggctgttctg gtgttgctag tttgttatca gaatcgcaga tccggcttca ggtttgccgg 9120  
ctgaaagcgc tatttcttcc agaattgcc a tgattttttc cccacgggag gogtcaactgg 9180  
ctcccgtgtt gtcggcagct ttgattcgat aagcagcatc gcctgtttca ggctgtctat 9240  
gtgtgactgt tgagctgtaa caagttgtct caggtgttca atttcatggt ctagtgtgctt 9300  
tgttttactg gtttcacctg ttctattagg tgttacatgc tgttcatctg ttacattgctc 9360  
gatctgttca tggatgaacag ctttaaatgc accaaaaact cgtaaaagct ctgatgtatc 9420  
tatctttttt acaccgtttt catctgtgca tatggacagt tttccctttg atatctaacg 9480  
gtgaaacagt gttctacttt tgtttgttag tcttgatgct tcaactgatag atacaagagc 9540  
cataagaacc tcagatcctt ccgtatattag ccagtatggt ctctagtgtg gttcgttgtt 9600  
tttgctgtgag ccatgagaac gaaccattga gatcatgctt actttgcatg tcaactcaaaa 9660  
atthtgctc aaaactggtg agctgaattt ttgcagttaa agcatcgtgt agtgthtttc 9720  
ttagtccgtt acgtaggtag gaatctgatg taatggtgt tggatthttg tcaccattca 9780  
tttttatctg gttgttctca agttcggta cgagatccat ttgtctatct agttcaactt 9840  
ggaaaatcaa cgtatcagtc gggcggcctc gcttatcaac caccaatttc atattgctgt 9900  
aagtgtttaa atctttactt attggtttca aaaccattg gttaaacctt ttaaactcat 9960  
ggtagtattt ttcaagcatt aacatgaact taaattcatc aaggctaate tctatatttg 10020  
ccttgtagt tttctttgt gttagttctt ttaataacca ctcataaate ctcatagagt 10080  
atthgttttc aaaagactta acatgttcca gattatattt tatgaatttt tttactgga 10140  
aaagataagg caatatctct tcaactaaaa ctaattctaa tttttcgtt gagaacttgg 10200  
catagttgt ccaactgaaa atctcaaac ctttaaccaa aggattcctg atthccacag 10260  
ttctcgtcat cagctctctg gttgctttag ctaatacacc ataagcattt tccctactga 10320  
tgttcatcat ctgagcgtat tggttataag tgaacgatac cgtccgttct tctctgttag 10380  
ggthttcaat cgtggggttg agtagtgcca cacagcataa aattagcttg gthttcatgct 10440  
ccgttaagtc atagcgacta atcgttagtt catttgcttt gaaaacaact aattcagaca 10500  
tacatctcaa ttgtctagg tgattthaat cactatacca attgagatgg gctagtcaat 10560  
gataaact agtccttttc ctttgagtgt tgggtatctg taaattctgc tagaccttg 10620  
ctgaaaaact tgtaaattct gctagacct ctgtaaatc cgctagacct ttgtgtgtht 10680  
ttttgttta tattcaagtg gttataattt atagaataaa gaaagaataa aaaaagataa 10740  
aaagaataga tcccagccct gttataact cactacttta gtcagttccg cagtattaca 10800  
aaaggatgc gcaaacgtg tttgctctc taaaaaac accttaaac ctaaaaggct 10860  
taagtagcac cctcgcaagc tggggcaaat cgtgaatat tctthttgtc tccgaccatc 10920

ES 2 517 394 T3

aggcacctga gtcgctgtct ttttcgtgac attcagttcg ctgcgctcac ggctctggca 10980  
gtgaatgggg gtaaatggca ctacaggcgc cttttatgga ttcattgcaag gaaactaccc 11040  
ataatacaag aaaagcccgt cacgggcttc tcagggcgtt ttatggcggg tctgctatgt 11100  
ggtgctatct gactttttgc tgttcagcag ttcttgcctt ctgattttcc agtctgacca 11160  
cttcggatta tcccgtgaca ggctattcag actgggctaata gcacccagta aggcagcggg 11220  
atcatcaaca ggcttagttt aaaccgcaaa gtcccgcctc gtgaaaattt tcgtgccgcg 11280  
tgattttccg ccaaaaaact taacgaacgt tcgttataat ggtgctatga ccttcacgac 11340  
gaagtactaa aattggcccg aatcatcagc tatggatctc tctgatgtcg cgctggagtc 11400  
cgacgcgctc gatgctgccg tcgatttaa aacgggtgac ggatttttcc gagctctcga 11460  
tacgacggac gcgccagcat cacgagactg gccagtgcc gcgagcgacc tagaaactct 11520  
cgtggcggat cttgaggagc tggctgacga gctgcgtgct cggccagcgc caggaggacg 11580  
cacagtagtg gaggatgcaa tcagttgcgc ctactgcggt ggctgattc ctccccggcc 11640  
tgacccgcga ggacggcgcg caaaatattg ctacagatgcg tgcgtgcccg cagccagccg 11700  
cgagcgcgcc aacaaacgcc acgccgagga gctggaggcg gctaggtcgc aaatggcgt 11760  
ggaagtgcgt cccccgagcg aaattttggc catggtcgtc acagagctgg aagcggcagc 11820  
gagaattatc gcgatcgtgg cgggtgccgc aggcattgaca aacatcgtaa atgccgcgtt 11880  
tcgtgtgccc tggccgccca ggacgtgtca gcgccgccac cacctgcacc gaatcggcag 11940  
cagcgtcgcg cgtcgaaaaa gcgcacaggc ggcagaagc gataagctgc acgaatacct 12000  
gaaaaatggt gaacgccccg tgagcggtaa ctacagggc gtcggctaac ccccagtcca 12060  
aacctgggag aaagcgtca aaaatgactc tagcggattc acgagacatt gacacaccgg 12120  
cctggaaatt ttccgctgat ctgttcgaca cccatcccga gctcgcgctg cgatcacgtg 12180  
gctggacgag cgaagaccgc cgcgaattcc tcgctcacct gggcagagaa aatttccagg 12240  
gcagcaagac ccgcgacttc gccagcgtt ggatcaaaga cccggacacg gagaaacaca 12300  
gccgaagtta taccgagttg gttcaaaatc gcttgcccgg tgccagtatg ttgctctgac 12360  
gcacgcgcag cacgcagccg tgcctgtcct ggacattgat gtgccgagcc accaggccgg 12420  
cgggaaaaatc gagcacgtaa accccgaggt ctacgcgatt ttggagcgtt gggcacgcct 12480  
ggaaaaagcg ccagcttggg tcggcgtgaa tccactgagc gggaaatgcc agctcatctg 12540  
gctcattgat ccggtgtatg ccgcagcagg catgagcagc ccgaatatgc gcctgctggc 12600  
tgcaacgacc gaggaaatga cccgcgtttt cggcgtgac caggcttttt cacataggct 12660  
gagccgtggc cactgcactc tccgacgac ccagccgtac cgctggcatg cccagcacia 12720  
tcgctggat cgectagctg atcttatgga ggttgctcgc atgatctcag gcacagaaaa 12780  
acataaaaaa cgctatgagc aggagtttcc tagcggacgg gcacgtatcg aagcggcaag 12840

ES 2 517 394 T3

aaaagccact gcggaagcaa aagcacttgc cacgcttgaa gcaagcctgc cgagcgccgc 12900  
 tgaagcgtct ggagagctga tcgacggcgt ccgtgtcctc tggactgctc cagggcgtgc 12960  
 cgcccgtgat gagacggcctt ttcgccacgc tttgactgtg ggataccagt taaaagcggc 13020  
 tggtgagcgc ctaaaaagaca ccaagggca tgcagcctac gagcgtgcct acaccgtcgc 13080  
 tcaggcggtc ggaggaggcc gtgagcctga tctgccgccg gactgtgacc gccagacgga 13140  
 ttggcccgca cgtgtgcgcg gctacgtcgc taaaggccag ccagtcgtcc ctgctcgtca 13200  
 gacagagacg cagagccacg cgaggcgaaa agctctggcc actatgggaa gacgtggcgg 13260  
 taaaaaggcc gcagaacgct ggaaagacc aaacagtgag tacgcccag cacagcgaga 13320  
 aaaactagct aagtccagtc aacgacaagc taggaaagct aaaggaaatc gcttgaccat 13380  
 tgcaggttgg tttatgactg ttgagggaga gactggctcg tggccgacaa tcaatgaagc 13440  
 tatgtctgaa tttagcgtgt cacgtcagac cgtgaataga gacttaagg tctgcgggca 13500  
 ttgaacttcc acgaggacgc cgaaagcttc ccagtaaatg tgccatctcg taggcagaaa 13560  
 acggttcccc cgtagggtct ctctcttggc ctctttcta ggtcgggctg attgctcttg 13620  
 aagctctcta ggggggctca caccataggg agataacgtt ccccaccggc tcgcctcgtc 13680  
 agcgcacaag gactgctccc aaagatcttc aaagccactg ccgcgactgc cttcgcaag 13740  
 ccttgccccg cggaaatttc ctccaccgag ttogtgacaca ccctatgcc aagcttcttt 13800  
 caccctaaat tcgagagatt ggattcttac cgtggaatt ctlogcaaaa atcgtcccct 13860  
 gatcgccctt gcgacggttg cgtcgggtgc gctgggtgcg cttggcttga ccgac 13915

<210> 37

<211> 14063

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pOM621AR

<400> 37

ttgatcagcg gccgcttcgc gaagcttgtc gaccgaaaca gcagttataa ggcattgaagc 60  
 tgtccggttt ttgcaaaagt ggctgtgact gtaaaaagaa atcgaaaaag accgttttgt 120  
 gtgaaaacgg tctttttggt tccttttaac caactgccat aactcgaggc tattgacgac 180  
 agctatgggt cactgtccac caacccaaac tgtgctcagt accgccaata tttctccctt 240  
 gaggggtaca aagaggtgtc cctagaagag atccacgctg tgtaaaaatt ttacaaaaag 300  
 gtattgactt tccctacagg gtgtgtaata atttaattac aggcgggggc aaccccgctt 360  
 gttctagaag gaggtgatag tatgtcttct gcagctaccc gccgtaatte agcccccttc 420  
 gttcagcgc acatcggccc aaaccaggcc gataccagg agatcctcga ttacctgggc 480  
 tatgaatcct ccgccgcgct ggccgacgat gccctcccga agtcgatccg ccaggcaggc 540  
 ccgatcggcc tgccggaggc actggatgag acggacaccc tggccgcctt gcgtgcttac 600

ES 2 517 394 T3

gctgacaaga acgtgcagaa gcagcagctg atcggcaacg gttacttcga cacgatcaet 660  
 ccggccgtga ttcgccgcaa cgtggtggag aaccgggct ggtacaccgc ctacaccccc 720  
 taccagccgg aaatctccca ggggcgcctc gaggccctgc tgaacttcca gacgatggtg 780  
 caggacctga ccggcctgcc agtggccggt gcttcgctgt tagacgaagc caccgcagtg 840  
 gccgaggccg tgcagctgat ggctcgcggc aatgcgaagg ctgccaaaga gggcggcgtg 900  
 gtgctgctgg attcctccct gcaccagcag tccatcaccg taaccctggc gcgcgctgag 960  
 gctgcgggta tcccggtgga ggtcgtggac ctggacggcg aagatgctac cgccgcgttt 1020  
 gagggccgag agaacctcgt cggcgtggtg ctttccaacc ccggctccac cggccgcgtc 1080  
 cgcgacctgt ccggtctgat ctctcgcggc aaggagaccg gcgctctggt gacggtcgtc 1140  
 tgtgacctgc tggctcaggt tctggtgacc tcccgggct cccaagggtc cgacattgct 1200  
 gtcggtccg cccagcgtt cggcgtgccg ctattcttcg gtggcccgca cgcgggcttc 1260  
 atctcctgca ccgaggtctc gcagcgtaa cgtccgggcc gcatcgtggg cgtgtccgtg 1320  
 gatgccgagg gcacccggc ctaccgcttg gctctgcaga cccgtgagca gcacattcgc 1380  
 cgcgacaagg ccaccagtaa catctgtacc gctcaggctc tgetggccgt cgttgccggt 1440  
 ttctacgagg tctggcacgg cccagcggc ctgcgcgcca tcgccgaggg ggtgcacgcc 1500  
 cgcgcgaccg ccctggcgt tgcctgtcc gaggctggcc tgacgctggc gcacgatacc 1560  
 ttcttcgaca ccgtaccgt tgacgtgtct ggttcttctc ttggtgacgc ccccacggct 1620  
 ctgcgcgccc cagccgaggc aggetacaac ctgcgccagg ttaacgattc cttegtcggc 1680  
 atctctgtgc gcgagtccac cacggacgag gacattgcca agctgatcga ggtgctgggc 1740  
 tcccgcaccg gcgaggtaaa ctccgcgagc ttgcagctca ccgccggccc gctgggagag 1800  
 gccggcgtgc tgcgcgaggga ggacgaggag attctgaccc acccgatctt caccgccatc 1860  
 acttccgaga cccagatgat gcgctacatg cgcaagctgg ccgaccgca cctggcgtg 1920  
 gatcgtacga tgatcccgct gggctcctgc accatgaagc tgaacgcggc cgtctccatg 1980  
 gagccgatca cctggcctgg cttegcagge atccaccgc acgtcccggc cgagcaggcg 2040  
 cagggtggc tggagctcat cgaggacctg gaggagcgcc tggcgaagat caccggctac 2100  
 gccaaaggtt ccgtccagcc gaacgcgggc tcccaggcg agttcggcg cctgctggcg 2160  
 atccaccgct accaccagtc ccgcggcgac gatcagcgtg acatcgttet gatcccggcc 2220  
 tccgcgcacg gcaccaacgc tgctctgca gcgctggcgg gcctgaaggc cgtggctgtg 2280  
 aagaatgccg aagacggctc catcagcgtg ccggacctgg aggccaaagct ggagaagtac 2340  
 ggcgagcaga ccgccgccat catgctgacc taccctcca cccacggcgt gttcgaggag 2400  
 cagggtgcgc acgtctgcca gaaggtcac gacgctggcg gccagggtgta cgtcgacggc 2460  
 gctaacctga acgccctggt cggcctggcc cagccgggcg agttcggcg cgacgtatcc 2520

ES 2 517 394 T3

cacctgaacc tgcacaagac cttcaccatc cgcacagggtg gtggcggccc gggcgttggc 2580  
ccggtgtgcg tggcagagca cctgatcccg ttectgccc a cgcacccgaa cgccgacgtt 2640  
atcgagggcg atgctgccct gcagtcgggc cagccggctct ccggcgcgca gtacggctcc 2700  
gctggcgtgc tggcgatcac ctggtcctac atcgcacaga tgggcgacga aggcctgact 2760  
gaggcctccc gcatggccct ggtgaacgcc aactacgttt cccgcaagct ggaggactac 2820  
taccogacgc tgtacaaggc cgacaccggc ctggtcgccc acgagtgcac cctggacctg 2880  
cgtgaactca cgaaggcctc cggcatcacc gccgaggacg tatccaagcg cctgatggac 2940  
ttcggcttcc acgccccgac cttggccttc ccggtcgccg gcaccctgat gatggagccc 3000  
accgagtcg aggacaagga agagctggac cgcttcatcg aagcagatgat caccatccac 3060  
ggggagatcc aggaagtatt cgacggcaag gtcaccgccc aacagtccgt tctgcgccac 3120  
gcgccgttta ccgcctattc tgttgtgctg gacgacttcg aggaagctgt atccggtggt 3180  
cacttcagcc gtgccaaggc cgcatacccg gtggctagcc tgcgacacac caagtacttc 3240  
acccccgtgc gtcgtatcga caacgcctat ggcgaccgca atctcgtgtg cacctgcccg 3300  
ccctggaag acttcgcaat taacgaggac tagggtccgc tggagctaag ggcgtcacia 3360  
agagaagaag gagaacaaga catgaccgaa cttaagaaga ccgcgctgca cctggtgcac 3420  
gagaagtgg gcgcgctgatt taccgacttc ggcggtggg acatgcctct gaagtacagc 3480  
agtgagctgg acgagacca cgctgtacgc aatgccgtgg gcgtattcga cctctcccac 3540  
atgggtgagg ttcgcgtgac cggcccgcag gcagcggagt tcctggacca cgcgctgatt 3600  
tcgaagctgt cggcagtgaa ggtcggcaag gcgaagtact cgatgatctg caccgaatcc 3660  
ggtggcatca tcgacgacct gatcacctac cgctgggcg acaacgagtt cctgatcgtg 3720  
ccgaacgcgg gcaacgtgga caacgtggtc tccgactgc agggccgcac cgaggccttt 3780  
gacgtggag ttaacaacga gtcgatgag acetccatga tcgccgtaca ggggcccaag 3840  
gccgcgcagg cgatgctgga gatcgtggag aacgtcgtgg atgcaccgga ggcacccggc 3900  
gcgggcgaga ccgctgccga ggctatcgag gggctgggtt actacgcggc attcagcggc 3960  
gctgcccag gtcagcccgt gctggtggcc cgcacaggct ataccggcga ggacggtttc 4020  
gagctgatcg tggctaacga tggcgcggag accgtgtgga ccaaggctat ggaccaggct 4080  
gcgcagctgg gtggcctgcc gctggtgctg gcctgccgcg acaccctgcg cctggaggct 4140  
ggcatgccgc tgtacggcaa cgagctatcg ctgaagctca ccccggtcga tgetgggctg 4200  
ggcattcttg cggcgacgaa gtctaaggac tctttcgttg gtcgtgacgc catcgtttcc 4260  
gccaagaaa aggttaccca gcaggtactt atccggctgg cgggcgaggg tcgccgcgct 4320  
gcccgtgggg gatcacgaggt gtttgcgggt gacggcgaga aggccatcgg tgccgtgacc 4380  
tccggtgca tgctgcgcgac gctgggccac ccggtggcat tggcatacgt cggaagtcc 4440  
gcagtgctct ccggcgcggc cgtgaggggt gcgaccgtgg aggtagacat ccgcccgaag 4500

ES 2 517 394 T3

cgctttgaat acaaggttgt ggcgctgccg ttctactccc gcgagaagta acgcaagaag 4560  
 taacgaaaag ggttgtctgc ccgctggtgt aaggtttggg cagacaacca cagaagtaac 4620  
 cacacaaggt ttcacaagag aggcttaaaa caatgactgc actgccaaact gacttcctgt 4680  
 actccgaaga gcacgagtgg gttaacacct ccgctgttgt tgagggcgag accgtgcgcg 4740  
 tgggcattac ccacatcgcc gctgaggcgc tgggtgacat cgtgttcgtc gagctgccgg 4800  
 aggttggtc cgaggtttag gccggcgagg ctttcggcga ggttgagtcc accaagtccg 4860  
 tttccgacat ctacgcaccg gtttctggcg aggttgtggc tgtcaacgag gcgctggaag 4920  
 acaacgctgg cctgatcaac gaagatccat acggtgaggg ctggctgtac gaggtcaagg 4980  
 tgaccgaggg cggcgagctg atggaggctg aggcttacca gccggctaac gagtaaaaca 5040  
 agaccctatg gtcggttcca tgttcgcatt aatcctcggc ttggccctgt tgggccttgc 5100  
 cgtgtgggta ctctcgcgag caaaagatag caccggatcc gccctcccgc acgetttgcg 5160  
 ggagggcttt tcttttcccg gtatttcagt agctcggggg cgtctcattc agcaaacct 5220  
 gctccatata cgcctctggg ctctcccacc ccgacacaaa atctctcgcg agaggccttc 5280  
 agggccctta aatgtcggaa aagttgcaat ttgttaatgc tactggtttt caaatatgca 5340  
 aatgcgcagg tcaaggggct tttgggaaa tggaaccaa tcccgatttg aagaattgca 5400  
 acttttccga cattaagcgg ccttcaggaa gtgccaaaca ccggaggcac cagcatcaac 5460  
 gtcaccacct ggcatactca gcaccatcag aagcttcagc ctcactacag gcggaacctg 5520  
 accccagcgg gacctcacc ccgcccagag aaccagcgg aacttggcgc cagcgggaacc 5580  
 gcagccacca gctcccacca gcaccagca gcgccaaagg accactggag tatcatcgcc 5640  
 accatgggat tccagcaagg cagcatccgc aaagcaaaaca tgggcacaac cggcactaac 5700  
 gacggggcaa ccaccccacc agccaacacc agcaccacc ccgtagacat cgacgtccgc 5760  
 gacctgggca ccgtggacta cgaggacact tggcacctcc aggcaaatct cgccgccag 5820  
 cgcgccgaag aaaaaatccc agacaccatc ctctactcc agcatccgcc gacgtacacc 5880  
 gccggcaagc gcaccagga ttccgaccgc cctaccaacg gcctgccagt agtcgacgtc 5940  
 gaccgcggag gccgcatcac ctggcatgga cccggccagt tggtcgcata tcccatcacc 6000  
 aagctggccg acccggtgga cgtggtcgat tatgtccgcc gcctggagca ggcgctaacc 6060  
 cagacttgtg aagatcttgg cctgcacggc accggcccg tagagggcg ttcgggctg 6120  
 tggctgcctg cgggcgtcat taatggcgag ctcaagccc cagtaagat agccgcgatc 6180  
 ggcacccgcg tgacgcgcgg cgtgaccatg cacggagtgg ccctcaactg cgataacacc 6240  
 atggagtatt acgaccacat tgtgccttgt gggctggcgg atgcgggtgt cacgacgctc 6300  
 accgaggagc tggggcgcgga tgtagtggt tetgacgect actcaccct cggccacaac 6360  
 ctcttgatg ctttgaacgg cgacttgcg gtgcattcct aggggaaaac ccgaggtgga 6420

ES 2 517 394 T3

ttccctatacg gcaccacagcg taggctagtc ggcatgagtg tgaccgcaga tggacgcccg 6480  
 atgctacgca tcgaggcgaa gaatgccgaa acccccatcg agtcgaagcc tcggtggatc 6540  
 cgcacgaccg cgaaggtcgg cccggagtat cgggatatta agaatcgcgt gaagggcgct 6600  
 ggcctgcaca ccgtgtgcca agaggctggc tgcccgaata tcaacgagtg ctgggaggac 6660  
 cgcgaggcga cgttctcat cgcgggtgat acgtgttccc gccgttgca cttctgccag 6720  
 attaagtccg gccgcccgtc cccgctggat atggacgagc cacgccgcgt gccggagaat 6780  
 gtcgcgaga tgggtctcgc ctacgccacc atcaccggcg tgacgcgca tgacctggat 6840  
 gatgagggcg cgtggctgta tgccgaggtt gtgaagaaga ttcacgagct gaaccgaaac 6900  
 acgggtgtgg agaactctgac gccagathtt tccaaccgcc cggagctgct gaaggtcgtc 6960  
 ttcgattccc agccggaggt gtttgcccac aacctggaga cagttccgct catctttaag 7020  
 cgcacccgcc cggcctttaa gtacgaccgt tccctggagg tcattcaggc agctcacgat 7080  
 tacggcctgg tgacgaagtc caacctgatc ctgggcatgg gtgagaagaa ggaagaggtc 7140  
 cgcgccccta tcaaggacct ggcagacgcc ggcaccgaca ttctgacgat taccagtac 7200  
 ctgcgcccgt cttccatgca ccaccgatt gagcgttggg tgaagccgga ggagttcatg 7260  
 gagcactccg acgcagccta cgagctgggc atcaaggctg ttatgtccgg cccgttggtg 7320  
 cgttctctt acccgcccgg ccgctgtac gcgcaggcca agcaggcgcg cggcgaggct 7380  
 attccggaga acctgaagca cttggaggag actctcgatt ccaccacgtc gcaggaggcc 7440  
 tctacactgc tggagcgta cggcgcttcg gaggacacgc cggtcactgc gtcgcccgc 7500  
 tagctcggcg gggcacttcc gcccgcctt tattcatgcc ttattgtga atccatggcg 7560  
 aaggataaaa aggacgtaag ggtcaaggaa gagaagaagg cagctaaggc aaatcgctag 7620  
 cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc 7680  
 ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc 7740  
 aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa 7800  
 gcgaaccgga attgccagct gggggcccct ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa 7860  
 actggatggc tttcttgccg ccaaggatct gatggcgagc gggatcaaga tctgatcaag 7920  
 agacaggatg aggatcgttt cgcagattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 7980  
 ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 8040  
 atgccgccgt gttccggctg tcagcgagc ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc 8100  
 tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 8160  
 cggcgcttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 8220  
 tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag 8280  
 tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgatacgtc tgatccggct acctgcccat 8340  
 tcgaccacca agcgaacat cgcacgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 8400

ES 2 517 394 T3

tcgatcagga tgatctggac gaagagcadc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 8460  
 ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct 8520  
 tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg 8580  
 gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccog tgatattgct gaagagcttg 8640  
 gggcgcaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat cgcgctccc gattcgcagc 8700  
 gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 8760  
 gaccgaccaa gcgacgccc acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 8820  
 tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccggc tggatgatec tccagcgcgg 8880  
 ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc tagtttaaac tcgggatcag tgagggtttg 8940  
 taactgcggg tcaaggatct ggatttcgat cacggcacga tcatcgtcgc ggagggcaag 9000  
 ggctccaagg atcgggcctt gatgttaccg gagagcttgg caccagcct gcgcgagcag 9060  
 gggaaattgat ccggtggatg accttttgaa tgaccttaa tagattatat tactaattaa 9120  
 ttggggaccg tagaggctcc cttttttatt ttaaaaattt tttcacaana cggtttaca 9180  
 gcataacggg ttttctgcc cgcaaacggg ctgttctggg gttgctagtt tgttatcaga 9240  
 atcgcagatc cggcttcagg tttgccggct gaaagcgeta tttcttcag aattgccatg 9300  
 atttttccc cacgggaggc gtcactggct cccgtgttgt cggcagcttt gattcgataa 9360  
 gcagcatcgc ctgtttcagg ctgtctatgt gtgactgttg agctgtaaca agttgtctca 9420  
 ggtgttcaat ttcattgtct agttgctttg tttactggg ttcacctgtt ctattaggtg 9480  
 ttacatgctg ttcattctgt acattgtcga tctgttcatg gtgaacagct ttaaatgcac 9540  
 caaaaactcg taaaagctct gatgtatcta tcttttttac accgttttca tctgtgcata 9600  
 tggacagttt tccctttgat atctaacggg gaacagttgt tctacttttg tttgttagtc 9660  
 ttgatgcttc actgatagat acaagagcca taagaacctc agatccttcc gtatttagcc 9720  
 agtatgttct ctagtgtggg tcggtgtttt tgcgtgagcc atgagaacga accattgaga 9780  
 tcatgcttac tttgcatgtc actcaaaaat tttgcctcaa aactggtgag ctgaattttt 9840  
 gcagttaaag catcgtgtag tgtttttctt agtccgttac gtaggtagga atctgatgta 9900  
 atggttggtg gtattttgtc accattcatt tttatctggg tgttctcaag ttcggttacg 9960  
 agatccattt gtctatctag ttcaacttgg aaaatcaacg tatcagtcgg gcggcctcgc 10020  
 ttatcaacca ccaatttcat attgctgtaa gtgtttaa atcttacttat tggtttcaaa 10080  
 acccattggg taagcctttt aaactcatgg tagttatttt caagcattaa catgaactta 10140  
 aattcatcaa ggctaactctc tatatttgcc ttgtgagttt tcttttgtgt tagttctttt 10200  
 aataaccact cataaatcct catagagtat ttgttttcaa aagacttaac atgttccaga 10260  
 ttatatttta tgaatttttt taactggaaa agataaggca atatctcttc actaaaaact 10320

ES 2 517 394 T3

aattctaatt ttctgcttga gaacttggca tagtttgccc actggaaaat ctcaaagcct 10380  
ttaaccaaag gattcctgat ttccacagtt ctctcatca gctctctggt tgcttttagct 10440  
aatacaccat aagcattttc cctactgatg ttcatcatct gagcgtattg gttataagtg 10500  
aacgataccg tccgttcttt ccttgtaggg ttttcaatcg tggggttgag tagtgccaca 10560  
cagcataaaa ttagcttggg ttcatgctcc gtttaagtcag agcgactaat cgctagtcca 10620  
tttgctttga aaacaactaa ttcagacata catctcaatt ggtctaggtg attttaatca 10680  
ctataccaat tgagatgggc tagtcaatga taattactag tccttttctt ttgagttgtg 10740  
ggtatctgta aattctgcta gacctttgct ggaaaacttg taaattctgc tagaccctct 10800  
gtaaatcccg ctagaccttt gtgtgttttt ttgtttata ttcaagtggg tataatttat 10860  
agaataaaga aagaataaaa aaagataaaa agaataagatc ccagccctgt gtataactca 10920  
ctacttttagt cagtcccgca gtattacaaa aggatgtcgc aaacgctgtt tgctcctcta 10980  
caaaaacagac cttaaaaccc taaaggctta agtagcacc cgcgaagctc gggcaaatcg 11040  
ctgaatattc cttttgtctc cgaccatcag gcacctgagt cgctgtcttt ttcgtgacat 11100  
tcagttcgtc gcgctcacgg ctctggcagt gaatgggggt aaatggcact acagggcctc 11160  
tttatggatt catgcaagga aactaccat aatacaagaa aagcccgtca cgggcttctc 11220  
agggcgtttt atggcgggtc tgctatgtgg tgctatctga ctttttgctg ttcagcagtt 11280  
cctgcctctc gattttccag tctgacctc tcggattatc ccgtgacagg tcattcagac 11340  
tggtaatgc acccagtaag gcagcggat catcaacagg cttagtttaa accgcaaagt 11400  
cccgttctgt gaaaattttc gtgccgctg attttccgcc aaaaacttta acgaacgttc 11460  
gttataatgy tgcctatgacc ttcacgacga agtactaaaa ttggcccga tcatcagcta 11520  
tggatctctc tgatgtcgcg ctggagctcg acgctcga tgctgccctc gatttaaaaa 11580  
cggatgatcg atttttccga gctctcgata cgacggacgc gccagcatca cgagactggg 11640  
ccagtgccgc gagcgaceta gaaactctcg tggcggatct tgaggagctg gctgacgagc 11700  
tgctgtctcg gccagcgcca ggaggacgca cagtagtggg ggatgcaatc agttgctcct 11760  
actgcggtgg cctgattcct ccccgccctg acccgcgagg acggcgcgca aaatattgct 11820  
cagatgctg tgctgccgca gccagcccg agcgcgcca caaacgccac gccgaggagc 11880  
tggaggcggc taggtcgcaa atggcgtgg aagtgcctc cccgagcgaa attttgcca 11940  
tggctgtcac agagctgaa gcggcagcga gaattatgc gatcgtggcg tgcccgcag 12000  
gcatgacaaa catcgtaaat gccgcgttct gtgtgccgtg gccgccagg acgtgtcagc 12060  
gccgccacca cctgcaccga atcggcagca gcgtcgcgcg tcgaaaaagc gcacaggcgg 12120  
caagaagcga taagctgcac gaatacctga aaaatggtga acgccccgtg agcggtaact 12180  
cacagggcgt cggctaacc cagtcacaaa cctgggagaa agcgtcaaa aatgactcta 12240  
gcggattcac gagacattga cacaccggcc tggaaatttt ccgctgatct gttcgacacc 12300

ES 2 517 394 T3

catcccgagc tcgcgctgcg atcacgtggc tggacgagcg aagaccgccc cgaattcctc 12360  
 gctcacctgg gcagagaaaa tttccagggc agcaagacc gcgacttcgc cagcgcttgg 12420  
 atcaaagacc cggacacgga gaaacacagc cgaagttata ccgagttggt tcaaaatcgc 12480  
 ttgcccgggtg ccagtatggt gctctgacgc acgcgcagca cgcagccgtg cttgtcctgg 12540  
 acattgatgt gccgagccac caggccggcg ggaaaatcga gcacgtaaac cccgaggtct 12600  
 acgcgatttt ggagcgctgg gcacgcctgg aaaaagcgc agcttgatc ggcgtgaatc 12660  
 cactgagcgg gaaatgccag ctcatctggc tcattgatcc ggtgtatgcc gcagcaggca 12720  
 tgagcagccc gaatatgccc ctgctggctg caacgaccga ggaaatgacc cgcgttttcg 12780  
 gcgctgacca ggctttttca cataggtgga gccgtggcca ctgcactctc cgacgatccc 12840  
 agccgtaccg ctggcatgcc cagcacaatc gcgtggatcg cctagctgat cttatggagg 12900  
 ttgctcgcat gatctcaggc acagaaaaac ctaaaaaacg ctatgagcag gagttttcta 12960  
 gcggacgggg acgtatcgaa gcggcaagaa aagccactgc ggaagcaaaa gcacttgcca 13020  
 cgcttgaagc aagcctgccc agcgcgctg aagcgtctgg agagctgatc gacggcgtcc 13080  
 gtgtcctctg gactgtccca gggcgtgccg cccgtgatga gacggctttt cgccacgctt 13140  
 tgactgtggg ataccagtta aaagcggctg gtgagcgcct aaaagacacc aagggtcatc 13200  
 gagcctacga gcgtgcctac accgtcgtc aggcggctcg aggaggccgt gagcctgatc 13260  
 tgccgccgga ctgtgaccgc cagacggatt ggccgcgacg tgtgcgcggc tacgtcgcta 13320  
 aaggccagcc agtcgtccct gctcgtcaga cagagacgca gagccagccg aggcgaaaag 13380  
 ctctggccac tatgggaaga cgtggcggta aaaaggcgcg agaacgctgg aaagacccaa 13440  
 acagtgagta cgcccagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa cgacaagcta 13500  
 ggaaagctaa aggaaatcgc ttgaccattg caggttggtt tatgactgtt gagggagaga 13560  
 ctggctcgtg gccgacaatc aatgaaagta tgtctgaatt tagcgtgtca cgtcagaccg 13620  
 tgaatagagc acttaaggtc tgcgggcatt gaacttccac gaggacgccc aaagcttccc 13680  
 agtaaatgtg ccatctcgta ggcagaaaac ggttcccccg tagggctctc ctcttggcct 13740  
 cctttctagg tcgggctgat tgctcttgaa gctctctagg ggggctcaca ccataggcag 13800  
 ataacgttcc ccaccggctc gcctcgtaag cgcacaagga ctgctcccaa agatcttcaa 13860  
 agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgccccgcg gaaatttcct ccaccgagtt 13920  
 cgtgcacacc cctatgccaa gcttctttca ccctaaatc gagagattgg attcttaccg 13980  
 tggaaattct tcgcaaaaat cgtcccctga tcgcccttgc gacgttggcg tcggtgccgc 14040  
 tggttgcgct tggcttgacc gac 14063

<210> 38

<211> 11872

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pOM627

<400> 38

ES 2 517 394 T3

ggatcggcgg ccagggccct catggatgac catccccggc accatccttg acaccgcccg 60  
 cacccaagtt ctggaacagg gaattggcct taatcagcag cagttgatgg aggttctcac 120  
 cttgcctgaa gagcaaatcc cagacttgat ggaattagcc caccagggtc ggttgaagtg 180  
 gtgtggggaa gaaatcgagg tcgagggcat tatttcctc aaaactggcg gttgccctga 240  
 agattgtcat ttctgctcac agtctgggtt gtttgaatcg ccggtgcgtt cgggtggct 300  
 ggatattccg aatctggttg aagccgctaa acagaccgca aaaactggcg ctaccgaatt 360  
 ctgtatcgtc gccgcagtca aggggcctga tgagaggctc atgaccagc tggaggaagc 420  
 agtcctcgcg attcactctg aagttgaaat tgaagtcgca gcatcgatcg gaacgttaaa 480  
 taaggaacag gtggatcgcc tcgctgctgc cggcgtgcac cgctagcggc cgcttcgcga 540  
 agcttgctga ccgaaacagc agttataagg catgaagctg tccggttttt gcaaaagtgg 600  
 ctgtgactgt aaaaagaaat cgaaaaagac cgttttgtgt gaaaacggtc tttttgttc 660  
 cttttaacca actgccataa ctcgaggcta ttgacgacag ctatggttca ctgtccacca 720  
 accaaaactg tgctcagtac cgccaatatt tctccctga ggggtacaaa gaggtgtccc 780  
 tagaagagat ccacgctgtg taaaaatfff acaaaaaggt attgactttc cctacagggt 840  
 gtgtaataat ttaattacag gcgggggcaa ccccgctgt tctagaagga ggtgatagta 900  
 tgtcttctgc agctaccgcg cgtaattcag ccccttctgt tcagcgcac atcggcccaa 960  
 accaggccga taccaggag atcctcgatt acctgggcta tgaatcttcc gccgcgctgg 1020  
 ccgacgatgc cctcccgaag tcgatccgcc aggcaggccc gatcggcctg ccggaggcac 1080  
 tggatgagac ggacaccctg gccgccctgc gtgcttacgc tgacaagaac gtgcagaagc 1140  
 agcagctgat cggcaacgggt tacttcgaca cgatcactcc ggccgtgatt cgcgcaacg 1200  
 tggtgagaaa cccgggctgg tacaccgct acacccccta ccagccggaa atctcccagg 1260  
 ggcgcctcga ggccctgctg aacttcaga cgatggtgca ggacctgacc ggcctgccag 1320  
 tggccggtgc ttcgctgta gacgaagcca ccgagtggc cgaggccgtg cagctgatgg 1380  
 ctcgcggcaa tgcgaaggct gccaaagaagg gcggcgtggt gctgctggat tcctccctgc 1440  
 accagcagtc catcaccgta accctggcgc gcgctgaggc tgcgggtatc ccggtggag 1500  
 tcgtggacct ggacggcgaa gatgctaccg ccgcgttga gggccgcgag aacctcgtcg 1560  
 gcgtggtgct ttccaacccc ggtccaccg gccgcgtccg cgacctgtcc ggtctgatct 1620  
 ctgcggcgaa ggagaccggc gctctggtga cggctcgttg tgacctgctg gctcaggttc 1680  
 tggtgacctc cccgggctcc caagtgccc acattgctgt cggctccgcc cagcgttctg 1740  
 gcgtgccgct attctctgggt ggcccgcac cgggcttcat ctctgcacc gaggtctgc 1800

ES 2 517 394 T3

agcgtaagct gccgggccc atcgtgggcg tgtccgtgga tgccgagggc accccggcct 1860  
 accgcttggc tctgcagacc cgtgagcagc acattcgccg cgacaaggcc accagtaaca 1920  
 tctgtaccgc tcaggctctg ctggccgtcg ttgccggttt ctacgcggtc tgccacggcc 1980  
 cagccggcct gcgcgccatc gccgaggggg tgccacggcc cgccagccgc ctggccgttg 2040  
 cccgtgtccga ggctggcctg acgctggcgc acgatacctt ctccgacacc gtcaccgttg 2100  
 acgtgtctgg ttcttctctt ggtgacgccc ccacggctct gcgcgcccga gccgaggcag 2160  
 gctacaacct gcgccagggt aacgattcct tcgtcgccat ctctgtcggc gaggccacca 2220  
 cggacgagga cattgccaag ctgatcgagg tgctgggctc ccgcaccggc gaggtcaact 2280  
 ccgcgagctt cgacgtcacc gccggcccgc tggggcaggg ccgctgtctg ccgcgggagg 2340  
 acgaggagat tctgaccac ccgatctca ccgccatcac ttccgagacc cagatgatgc 2400  
 gctacatgcg caagctggcc gaccgcgacc tggcgctgga tcgtacgatg atcccgttg 2460  
 gctcctgcac catgaagctg aacgcggccg tctccatgga gccgatcacc tggcctggct 2520  
 tcgcaggcat ccaccgcac gtcccggccg agcaggcgca ggctggctg gagctcatcg 2580  
 aggacctgga ggagcgcctg gcgaagatca ccggctacgc caaggtttcc gtccagccga 2640  
 acgcgggctc ccagggcgag ttcgcccggc tgctggcgat ccaccgctac caccagtcce 2700  
 gcggcgacga tcagcgtgac atcgttctga tcccggcctc ccgcacggc accaacgctg 2760  
 cctctgcagc gctggcgggc ctgaaggctg tggctgtgaa gaatgccgaa gacggctcca 2820  
 tcgacgtgcc ggacctggag gccaaagctg agaagtacgg ccgagcagacc gccgccatca 2880  
 tgctgacctc cccctccacc cacggcgtgt tcgaggagca ggtgcgcgac gctgtccaga 2940  
 aggttcacga cgctggcggc caggtgtacg tcgacggcgc taacctgaac gccctggctg 3000  
 gcctggccca gccggcgag ttcggcggcg acgtatccca cctgaacctg cacaagacct 3060  
 tcaccatccc gcacgggtgt ggcgcccggc gcgttgccc ggtgtgcgtg gcagagcacc 3120  
 tgatcccgtt cctgccacc gaccggaacg ccgacgttat ccagggcgat gctgccctgc 3180  
 agtcgggcca gccggtctcc ggcgcgcagt acggctccgc tggcgtgctg ccgatcacct 3240  
 ggtcctacat cgcacagatg ggcgacgaag gcctgactga ggctcccgc atggccctgg 3300  
 tgaacgcaa ctacgtttcc cgcaagctgg aggactacta cccgacgctg tacaagggcg 3360  
 acaccggcct ggtcgcccac gaggtcatec tggacctgcg tgaactcag aaggcctccg 3420  
 gcateaccgc cgaggacgta tccaagcgc tgatggactt cggcttcac gccccgacct 3480  
 tggccttccc ggtcgccggc accctgatga tggagcccac ccgctcggag gacaaggaag 3540  
 agctggaccg cttcatcgaa gcgatgatca ccatccacgg ggagatccag gaagttatcg 3600  
 acggcaaggc caccgccgaa cagtcggctc tgcgccacgc gccgtttacc gcctattctg 3660  
 ttgtgcgggg cgaactcgag gaagctgtat ccggtgttca cttcagccgt gccaaaggccg 3720

ES 2 517 394 T3

catacccgtt ggctagcctg cgacacacca agtacttcac ccccgtgcgt cgtatcgaca 3780  
 acgcctatgg cgaccgcaat ctctgtgtgca cctgcccgcc cctggaagac ttcgcaatta 3840  
 acgaggacta gggctccgctg gagctaaggg cgtcacaaaag agaagaagga gaacaagaca 3900  
 tgaccgaact taagaagacc gcgctgcacc tgggtgcacga gaagttgggc gcgcgattta 3960  
 ccgacttcgg cggtcgggac atgcctctga agtacagcag tgagctggac gagcaccacg 4020  
 ctgtacgcaa tgccgtgggc gtattcagacc tctcccacat gggtgaggtt cgcgtgaccg 4080  
 gccccgaggc agcggaggtc ctggaccacg cgtgatttc gaagctgtcg gcagtgaagg 4140  
 tcggcaaggc gaagtactcg atgatctgca ccgaatccgg tggcatcatc gacgacctga 4200  
 tcacctaccg cctgggagac aacgagttcc tgatcgtgcc gaacgcgggc aacgtggaca 4260  
 acgtggctc cgcactgcag gcccgaccgc agggcttga cgtggaggtt aacaacgagt 4320  
 ccgatgcgac ctccatgac gccgtacagg ggcccaaggc cgcgcaggcg atgctggaga 4380  
 tcgtggagaa cgtcgtggat gcacccgagg catccggcgc gggcgagacc gttgccgagg 4440  
 ctatcgaggg gctgggttac tacgcggcat tcagcgggtg tgccgcaggt cagcccgtgc 4500  
 tggtgccccc cacaggctat accggcgagg acggtttcga gctgatcgtg gctaacgatg 4560  
 gtgcccagac cgtgtggacc aaggtatgg accaggctgc gcagctgggt ggccctgccgt 4620  
 gtggcctggc ctgccgcgac accctgcgcc tggaggctgg catgccgctg tacggcaacg 4680  
 agctatcgt gaagctcacc ccggtcagat ctgggctggg cattcttgcg gcgacgaagt 4740  
 ctaaggactc tttcgttggc cgtgacgcca tcgtttccgc caaggaaaag ggtaccacgc 4800  
 aggtacttat cgggctggcg gccgagggtc gccgcgctgc ccgtggggga tacgaggtgt 4860  
 ttgccggtga cggcgagaag gccatcggtg ccgtgacctc cggtgcaactg tcgccgacgc 4920  
 tgggccaccc ggtggcattg gcatacgtcg cgaagtccgc agtgtcctcc ggccgcccgc 4980  
 ctgaggggtc gaccgtggag gtagacatcc gcggcaagcg ctttgaatac aaggttgtgg 5040  
 cgtgccggtt ctactcccgc gagaagtaac gcaagaagta acgaaaaggg ttgtctgccc 5100  
 gctggtgtaa ggtttgggca gacaaccaca gaagtaacca cacaaggtt cacaagagag 5160  
 gcttaaaaca atgactgcac tgccaactga ctctctgtac tccgaagagc acgagtgggt 5220  
 taacacctcc gctgttgttg agggcgagac cgtgcgcgtg gccattacc acatcgcgc 5280  
 tgaggcgtg ggtgacatcg tgttcgtcga gctgccggag gttggctccg aggttgaggc 5340  
 cggcgaggct ttcggcgagg ttgagtcac caagtccgtt tccgacatct acgcaccggt 5400  
 ttctggcgag gttgtggctg tcaacgaggc gctggaagac aacgctggcc tgatcaacga 5460  
 agatccatac ggtgagggct ggctgtacga ggtcaaggtg accgaggccc gcgagctgat 5520  
 ggaggctgag gcttaccagg cggctaacga gtaaaacaag accctatggt cggttccatg 5580  
 ttcgcattaa tctcggctt gccctgttg ggcttgcgc tgtggttact cctgcgagca 5640  
 aaagatagca ccgatccgc cctcccgaag agcgtgcggg agggcggtag ctgcgcgttc 5700

ES 2 517 394 T3

ctatttcct gaagttgtca cactcatac atgggaagag cgcgcgaaa ctttgcgcct 5760  
ggtggcagaa gctggaatgg aagtctgttc cggcggaaac ttaggaatgg gcgaaacttt 5820  
agagcagcgc gccgagtttg cagtgcagct ggcggagctt gatccgcacg aagtcccat 5880  
gaacttcctt gatcctcgcc cgggcacccc atttgccgat agggaattga tggacagccg 5940  
tgacgctctg cgctctattg gtgcgttccg ccttgcgatg cctcacacca tgcttcgttt 6000  
tgctggcggg cgcgagctga ctttgggcca caagggttcc gagcaagccc tcctgggagg 6060  
catcaatgcg atgatcgctg gaaactacct gactacgctc ggccgcccac tggaaatga 6120  
cctcgacatg atggatcgtc tccagctgcc catcaaagtc ctaataagg acgcgtcccg 6180  
ggatttaaat cgctagcggg ctgctaaagg aagcgggaaca cgtagaaagc cagtccgacg 6240  
aaacggtgct gaccccgcat gaatgtcagc tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca 6300  
agcgcgaaaga gaaagcaggt agcttgcagt gggcttacct ggcgatagct agactggcgc 6360  
gttttatgga cagcaagcga accggaattg ccagctgggg cgcctctgg taaggttggg 6420  
aagcctgca aagtaaactg gatggctttc ttgccgcaa ggatctgatg gcgcagggga 6480  
tcaagatctg atcaagagac aggatgagga tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg 6540  
cacgcagggt ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcacaacag 6600  
acaatcggtt gctctgatgc cgcctgttcc cggctgtcag cgcaggggcg cccggttctt 6660  
tttgcgaaga ccgacctgtc cgggtgcctg aatgaaactg aggacgaggc agcgcggcta 6720  
tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg 6780  
ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg cgggggcagg atctcctgtc atctcacctt 6840  
gctcctgccg agaaaatgac catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat 6900  
ccggtacctt gccattcga ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg 6960  
atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca 7020  
gccgaaactg tcgccaggct caaggcgcgc atgcccagc gcgaggatct cgtcgtgacc 7080  
catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc 7140  
gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc taccagaca tagcgttggc taccctgat 7200  
attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatgcc 7260  
gctcccgatt cgcagcgcac cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga 7320  
ctctggggtt cgaaaatgacc gaccaagcga cgcaccaact gccatcacga gatttcgatt 7380  
ccaccgccc cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggtgga 7440  
tgatcctcca gcgcggggat ctcagctgg agttcttccg ccacgctagt ttaaaactgcg 7500  
gatcagtgag ggtttgtaac tcgggtcaa ggatctggat ttcgatcacg gcacgatcat 7560  
cgtcggggag ggcaagggtt ccaaggatcg ggccttgatg ttaccgaga gcttggcacc 7620

ES 2 517 394 T3

cagcctgcgc gagcagggga attgatccgg tggatgacct tttgaatgac ctttaataga 7680  
 ttatattact aattaattgg ggaccctaga ggtccccttt tttattttta aaattttttc 7740  
 acaaaaacggt ttacaagcat aacgggtttt gctgcccgca aacgggctgt tctgggtgtg 7800  
 ctagtgtgtt atcagaatcg cagatccggc ttcaggtttg ccggctgaaa gcgctatttc 7860  
 ttccagaatt gccatgattt tttcccacg ggaggcgtca ctggctcccg tgttgcggc 7920  
 agctttgatt cgataagcag catcgcctgt ttcaggctgt ctatgtgtga ctggtgagct 7980  
 gtaacaagt gtctcagggtg ttcaatttca tgttctagtt gctttgtttt actggtttca 8040  
 cctgttctat taggtgttac atgctgttca tctgttacat tgcgatctg ttcaggtga 8100  
 acagctttta atgcacaaa aactcgtaaa agctctgatg tatctatctt ttttacaccg 8160  
 tttcatctg tgcataatgga cagttttccc tttgatatct aacggtgaac agttgttcta 8220  
 cttttgtttg ttagtcttga tgcttctactg atagatacaa gagccataag aacctcagat 8280  
 ccttccgtat ttagccagta tgttctctag tgtggttctg tgtttttgcg tgagccatga 8340  
 gaacgaacca ttgagatcat gcttactttg catgtcactc aaaaattttg cctcaaaact 8400  
 ggtgagctga atttttgag ttaaagcatc gtgtagtgtt tttcttagtc cgttacgtag 8460  
 gtaggaatct gatgtaatgg ttgttggat tttgtcacca ttcattttta tctgggtgtt 8520  
 ctcaagttcg gttacgagat ccatttgtct atctagttca acttgaaaa tcaacgtatc 8580  
 agtcgggocg cctcgttat caaccaccaa tttcatattg ctgtaagtgt ttaaactctt 8640  
 acttattggt tcaaaaacc attgggtaag ctttttaaac tcatggtagt tattttcaag 8700  
 cattaacatg aacttaatt catcaaggct aatctctata tttgcctgt gagttttctt 8760  
 ttgtgttagt tcttttaata accactcata aatcctcata gagtatttgt tttcaaaaga 8820  
 cttaacatgt tccagattat atttatgaa ttttttaac tggaaaagat aaggcaatat 8880  
 ctcttcacta aaaactaatt ctaatttttc gcttgagaac ttggcatagt ttgtccactg 8940  
 gaaaaatctca aagccttta ccaaaggatt cctgatttcc acagttctcg tcatcagctc 9000  
 tctggttctt ttagctaata caccataagc attttcccta ctgatgttca tcatctgagc 9060  
 gtattgggta taagtgaacg ataccgtccg tcttttctt gtagggtttt caatcgtggg 9120  
 gttgagtagt gccacacagc ataaaattag cttggtttca tgctccgtta agtcatagcg 9180  
 actaatcgt agtccattg ctttgaaaac aactaattca gacatacatc tcaattggtc 9240  
 taggtgatt taatcactat accaattgag atgggctagt caatgataat tactagtctt 9300  
 tttcctttga gttgtgggta tctgtaaatt ctgctagacc tttgctggaa aacttgtaaa 9360  
 ttctgctaga ccctctgtaa attccgctag acctttgtgt gttttttttg tttatattca 9420  
 agtgggtata atttatagaa taaagaaaga ataaaaaaag ataaaaaaga tagatcccag 9480  
 ccctgtgtat aactcactac tttagtcagt tccgcagtat taaaaagga tgcgcaaac 9540  
 gctggttct cctctacaaa acagacctta aaaccctaaa ggcttaagta gcaccctcgc 9600

ES 2 517 394 T3

aagctcgggc aaatcgctga atattccttt tgtctccgac catcaggcac ctgagtcgct 9660  
gtctttttcg tgacattcag ttcgctgcgc tcacggctct ggcagtgaat gggggtaaat 9720  
ggcactacag gcgcctttta tggattcatg caaggaaact acccataata caagaaaagc 9780  
ccgtcacggg cttctcaggg cgttttatgg cgggtctgct atgtgggtgct atctgacttt 9840  
ttgctgttca gcagttcctg ccctctgatt ttccagctcg accacttcgg attatcccg 9900  
gacaggtcat tcagactggc taatgcaccc agtaaggcag cggtatcatc aacaggctta 9960  
gtttaaaccc atcggcattt tcttttgogt ttttatttgt taactgttaa ttgtcettgt 10020  
tcaaggatgc tgtctttgac aacagatggt ttcttgccct tgatgttcag caggaagctc 10080  
ggcgcmaaagc ttgattgttt gtctgcgtag aatcctctgt ttgtcatata gcttgtaatc 10140  
acgacattgt ttcctttcgc ttgaggtaca gcgaagtgtg agtaagtaaa ggttacatcg 10200  
ttaggatcaa gatccatttt taacacaagg ccagttttgt tcagcggctt gtatgggcca 10260  
gttaaagaat tagaaacata accaagcatg taaatatcgt tagacgtaat gccgtcaatc 10320  
gtcatttttg atccgcggga gtcagtgaac aggtaccatt tgcggttcat tttaaagacg 10380  
ttcgcgcggt caatttcac tgttactgtg ttagatgcaa tcagcggttt catcactttt 10440  
ttcagtggtt aatcatcggt tagctcaatc ataccgagag cgcggtttgc taactcagcc 10500  
gtgcggtttt tatcgetttg cagaagtttt tgactttctt gacggaagaa tgatgtgctt 10560  
ttgccatagt atgctttggt aaataaagat tcttcgcctt ggtagccatc ttcagttcca 10620  
gtgtttgctt caaataactaa gtatttggg cctttatctt ctacgtagtg aggatctctc 10680  
agcgtatggt tgtcgcctga gctgtagtgt ccttcacga tgaactgctg tacattttga 10740  
tacgtttttc cgtcaccgtc aaagattgat ttataatcct ctacaccgtt gatgttcaaa 10800  
gagctgtctg atgctgatac gttaaactgt gcagttgtca gtgtttgttt gccgtaatgt 10860  
ttaccggaga aatcagtgta gaataaacgg atttttccgt cagatgtaaa tgtggctgaa 10920  
cctgaccatt cttgtgtttg gtcttttagg atagaatcat ttgcatcgaa tttgtcgtg 10980  
tctttaaaga cgcggccagc gtttttcag ctgtcaatag aagtttcgcc gactttttga 11040  
tagaacatgt aaatcgatgt gtcacccgca tttttaggat ctccggctaa tgcaaagacg 11100  
atgtggtagc cgtgatagtt tgcgacagtg ccgtcagcgt tttgtaatgg ccagctgtcc 11160  
caaacgtcca ggccttttgc agaagagata tttttaattg tggacgaatc aaattcagaa 11220  
acttgatatt tttcattttt ttgctgttca gggatttga gcatatcatg gcgtgtaata 11280  
tgggaaatgc cgtatgtttc ettatatggc ttttggttgc tttctttcgc aaacgcttga 11340  
gttgcgcctc ctgccagcag tgcggtagta aaggttaata ctggtgcttg ttttgcaaac 11400  
tttttgatgt tcatcgttca tgtctccttt tttatgtact gtgttagcgg tetgcttctt 11460  
ccagccctcc tgtttgaaga tggcaagtta gttacgcaca ataaaaaaag acctaaaata 11520  
tgtaaggggt gacgccaaag tatacacttt gccctttaca catttttaggt cttgcctgct 11580  
ttatcagtaa caaacccgcg cgatttactt ttcgacctca ttctattaga ctctcgtttg 11640  
gattgcaact ggtctatttt cctcttttgt ttgatagaaa atcataaaag gatttgcaga 11700  
ctacgggctt aaagaactaa aaaatctatc tgtttctttt cattctctgt attttttata 11760  
gtttctgttg catgggcata aagttgcctt tttaatcaca attcagaaaa tatcataata 11820  
tctcatttca ctaaataata gtgaacggca ggtatatgtg atgggttaaa aa 11872

ES 2 517 394 T3

<210> 39  
 <211> 9206  
 <212> ADN  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> Plásmido pOM180

<400> 39  
 ggatcggcgg ccagggcct catgggccgg gcgtgcgcaa tagactcgtc accaaaaccg 60  
 atggagtgtt tttgacgctg gaagatggca gcaccgtgat tgacgcgatg agctcctggt 120  
 ggtcggcaat tcatggacac ggacaccccc gactgaaagc tgccgcccaa aaacaaatcg 180  
 acaccatgag tcacgtcatg tttggcggac taaccacga gcccgccatt aagctcacc 240  
 acaaactcct caatctcact ggaaattcct ttgaccacgt cttttattcc gattcgggct 300  
 cggctctcagt ggaggtcgcc atcaaaatgg cactgcaggc ctccaaagga caaggccacc 360  
 cggaacgaac aaaactcctc acctggcggg ccggctacca cggagacaca ttcaccgcga 420  
 tgagcgtgtg cgaccagaa aatggcatgc atagcctctg gaaaggcaca ctccccgagc 480  
 agattttcgc ccccgcccca ccagttcggg ggtcatcgcc gcaggcgatt tccgagtacc 540  
 tgcgcagcat ggaattgctt atcgacgaga ccgtctccgc aatcatcatc gaaccgatcg 600  
 tccaaggcgc tggaggcatg cgcgcggccg cacagcgatc ccagaggaaa tatcctctgg 660  
 ggtcgtctgt tcgaccttaa agtttggtg ccatgtgaat ttttagcacc ctcaacagtt 720  
 gagtctggc actctcgggg gtagagtgcc aaataggtt tttgacacac agttgttcac 780  
 ccgcgacgac ggctgtgctg gaaaccacac accggcacac acaaaat tctagaagga 840  
 ggtgatagta tgggtttcca gcaaggcagc atccgcaaag caaacatggg cacaaccggc 900  
 actaacgacg gggcaaccac cccaccagcc aacaccagca ccccgccgt agacatcgac 960  
 gtcccgacc tgggcaccgt ggactacgag gacacttggc acctccagge aatctcgcc 1020  
 gcccgcgcg ccgaagaaaa aatcccagac accatcctcc tactccagca tccgccgacg 1080  
 tacaccgccg gcaagcgac ccaggattcc gaccgcccta ccaacggcct gccagtagtc 1140  
 gacgtcgacc gcgagggccg catcacctgg catggaccog gccagttggt cgcataatccc 1200  
 atcatcaagc tggccgaccc ggtggacgtg gtogattatg tccgccgcct ggagcaggcg 1260  
 ctaatccaga cttgtgaaga tcttggcctg cacggcaccg gcccgctaga ggggcgttcg 1320

ES 2 517 394 T3

ggcggtgtggc tgcctgctggg cgtcattaat ggcgagctca agcccgcacg taagatagcc 1380  
 gcgatcggca tccgcgtgac gcgcggcgtg accatgcacg gagtggccct caactgcgat 1440  
 aacaccatgg agtattacga ccacattgtg ccttgtgggc tggcggatgc ggggtgcacg 1500  
 acgctcaccg aggagctggg gcgcgatggt agtgtttctg acgcctactc atccctcgcc 1560  
 cacaacctcg ttgatgcttt gaacggcgac ttgccggtgc attcctaggg gaaaaccgca 1620  
 ggtggattcc tatacggcac ccagcgtagg ctagtcggca tgagtgtgac cgcagatgga 1680  
 cgccggatgc tacgcacga ggcgaagaat gccgaaaccc ccatcgagtc gaagcctcgg 1740  
 tggatccgca cgaccgcgaa ggtcggcccc gagtatcggg atattaagaa tcgcgtgaag 1800  
 ggcgctggcc tgcacaccgt gtgccaaagag gctggctgcc cgaatatcaa cgagtgcctg 1860  
 gaggaccgcg aggcgacggt cctcatcggc ggtgatacgt gttcccgcg ttgcgacttc 1920  
 tgccagatta agtccggccg cccgtccccg ctggatatgg acgagccacg ccgcgtggcg 1980  
 gagaatgtcc gcgagatggg tctgcgctac gccacatca ccggcgtgac gcgcgatgac 2040  
 ctggatgatg agggcgcgtg gctgtatgcc gaggttga agaagattca cgagctgaac 2100  
 ccgaacacgg gtgtggagaa tctgacgcca gatTTTTCCA accgcccgga gctgctgaag 2160  
 gtcgtcttcg attcccagcc ggaggtgttt gccacaacc tggagacagt tccgcgcatc 2220  
 tttaaagcga tccgccggc ctttaagtac gaccgttccc tggaggtcat tcaggcagct 2280  
 cagattacg gcctggtgac gaagtccaac ctgatcctgg gcatgggtga gaagaaggaa 2340  
 gaggtcgcg cggctatcaa ggacctggca gacgccgca ccgacattct gacgattacc 2400  
 cagtacctgc gccctcttc catgcaccac ccgattgagc gttgggtgaa gccggaggag 2460  
 ttcattggagc actccgacgc agcctacgag ctgggcatca aggctgttat gtccggcccc 2520  
 ttggtgctgt cctcttaccg cgccggccgc ctgtacgcgc agccaagca ggcgcgccc 2580  
 gaggetatc cggagaacct gaagcaactg gaggagactc tcgattccac cacgtcgag 2640  
 gaggcctcta cactgctgga gcgctacggc gcttcggagg acacgccggt cactgctcgc 2700  
 cgccgctagc tcggcggggc actttcgccc cgcccttatt catgccttat tgttgaatcc 2760  
 atggcgaagg ataaaaagga cgtaagggtc aaggaagaga agtgatccgc cctcccgcac 2820  
 gctttgctgg agggcttttc ttttaccggt accggaactg gggttgggaa aaccttctcc 2880  
 acagccggtt tggttcgata cttagccgat caaggacacg atgttctgcc cgtaaagcta 2940  
 gtccaaaccg gtgaacttcc aggcgagggg gacatcttta acattgaacg cttgactgga 3000  
 attgctggag aggaatttgc tcgtttcaaa gaccctctg cgccaaatct ggcagcccga 3060  
 cgagaggggg tcgagccaat acagtttgat cagattatct cgtggcttcg tggttttgac 3120  
 gaccagatc gcatcattgt ggtggagggc gctgggtggc tgetggtcag attaggggaa 3180  
 gatttcaccc tggcagatgt tgcctccgct ttgaatgcac ccttagtgat tgtgacaagc 3240

ES 2 517 394 T3

accggattgg gaagcctcaa cgetgctgaa ttaagcgttg aggcagcaaa ccgccgagga 3300  
 ctcacagtgt tgggagtcct cggcggttcg atccctcaaa atcctgatct agctacgatg 3360  
 cttaatctcg aagaatttga gagagtcacc ggcgtgccct tttggggagc tttgccggaa 3420  
 gggttgtcac gggtgagggg gttcgtcgaa aagcaatctt ttccggccct tgatgccttt 3480  
 aagaaaccgc cggcaaggct cccaacgcgt cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta 3540  
 aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtcg gcagaaacgg tgetgacccc ggatgaatgt 3600  
 cagctactgg gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg 3660  
 cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga 3720  
 attgccagct ggggcgccct ctggttaagg tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc 3780  
 tttcttgccg ccaaggatct gatggcgtag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg 3840  
 aggatcgttt cgcgatgatt aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt 3900  
 ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggetgctctg atgccgccgt 3960  
 gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggctg 4020  
 cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc 4080  
 ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga 4140  
 agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgcctct gccgagaaag tatccatcat 4200  
 ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtc tgatccggct acctgcccat tcgaccacca 4260  
 agcgaaacat cgcatcgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggctctg tcgatcagga 4320  
 tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc 4380  
 gcgcgatgcc gagcggcagg atctcgtcgt gaccatggc gatgcctgct tgccgaatat 4440  
 catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgaactg gcccggtgg gtgtggcggg 4500  
 ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg 4560  
 ggetgaccgc ttctcgtgct tttacggtat cgcctgctcc gattcgcagc gcatcgcctt 4620  
 ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa 4680  
 gcgacgcccc acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg 4740  
 ggcttcggaa tcgttttccg ggacgcgggc tggatgatcc tccagcggg ggatctcatg 4800  
 ctggagttct tcgcccacgc tagtttaaac tgcggatcag tgagggttg taactgcggg 4860  
 tcaaggatct ggatttcgat cacggcacga tcatcgtgcg ggagggcaag ggctccaagg 4920  
 atcgggcctt gatgttaccg gagagcttgg caccagcct gcgcgagcag gggaattgat 4980  
 ccggtggatg accttttgaa tgacctttaa tagattatat tactaattaa ttggggaccc 5040  
 tagaggctcc cttttttatt ttaaaaattt tttcacaaaa cggtttacia gcataacggg 5100  
 ttttctgccc cgcaaacggg ctgttctggt gttgctagtt tgttatcaga atcgcagatc 5160  
 cggcttcagg tttgccggt gaaagcgcga tttcttcag aattgccatg attttttccc 5220

ES 2 517 394 T3

cacgggaggc gtcactggct cccgtgttgt cggcagcttt gattcgataa gcagcatcgc 5280  
ctgtttcagg ctgtctatgt gtgactgttg agctgtaaca agttgtctca ggtgttcaat 5340  
ttcatgttct agttgctttg ttttactggg ttcacctggt ctattagggtg ttacatgctg 5400  
ttcatctggt acattgtcga tctgttcatg gtgaacagct ttaaattgac caaaaactcg 5460  
taaaagctct gatgtatcta tcttttttac accgttttca tctgtgcata tggacagttt 5520  
tccctttgat atctaacggg gaacagttgt tctacttttg tttgttagtc ttgatgcttc 5580  
actgatagat acaagagcca taagaacctc agatccttcc gtatttagcc agtatgttct 5640  
ctagtgtggg tcgttggttt tgcgtgagcc atgagaacga accattgaga tcatgcttac 5700  
tttgcagtgc actcaaaaat tttgcctcaa aactgggtgag ctgaattttt gcagttaaag 5760  
catcgtgtag tgtttttctt agtccgttac gtaggtagga atctgatgta atggttgttg 5820  
gtattttgtc accattcatt tttatctggg tgttctcaag ttcggttacg agatccattt 5880  
gtctatctag ttcaacttgg aaaatcaacg tatcagtcgg gcggcctcgc ttatcaacca 5940  
ccaatttcat attgctgtaa gtgtttaaat ctttacttat tggtttcaaa acccattggg 6000  
taagcctttt aaactcatgg tagttatttt caagcattaa catgaactta aattcatcaa 6060  
ggctaacttc tatatttgcc ttgtgagttt tcttttgtgt tagttctttt aataaccact 6120  
cataaatcct catagagtat ttgttttcaa aagacttaac atgttccaga ttatatttta 6180  
tgaatttttt taactggaaa agataaggca atatctcttc actaaaaact aattctaatt 6240  
tttcgcttga gaacttggca tagtttgccc actggaaaat ctcaaagcct ttaaccaaag 6300  
gattcctgat ttccacagtt ctcgtcatca gctctctggg tgettttagct aatacaccat 6360  
aagcattttc cctactgatg ttcatcatct gagcgtattg gttataagtg aacgataccg 6420  
tccgttcttt cctttagggg ttttcaatcg tgggggtgag tagtgccaca cagcataaaa 6480  
ttagcttggg ttcatgctcc gtttaagtcat agcgactaat cgetagttca tttgctttga 6540  
aaacaactaa ttcagacata catctcaatt ggtctagggt attttaatca ctataccaat 6600  
tgagatgggc tagtcaatga taattaactag tccttttctt ttgagttgtg ggtatctgta 6660  
aattctgcta gacctttgct ggaaaacttg taaattctgc tagaccctct gtaaattccg 6720  
ctagaccttt gtgtgttttt tttgtttata ttcaagtggg tataatttat agaataaaga 6780  
aagaataaaa aaagataaaa agaataagat ccagccctgt gtataactca ctacttttagt 6840  
cagttccgca gtattacaaa aggatgtcgc aaacgctggt tgctcctcta caaacagac 6900  
cttaaaaccc taaaggctta agtagcacc cgcgaagctc gggcaaactc ctgaatattc 6960  
cttttgtctc cgaccatcag gcacctgagt cgctgtcttt ttcgtgacat tcagttcgtc 7020  
gcgctcacgg ctctggcagt gaatgggggt aaatggcact acaggcgcct tttatggatt 7080  
catgcaagga aactacccat aatacaagaa aagcccgtca cgggcttctc agggcgtttt 7140

ES 2 517 394 T3

atggcggggtc tgctatgtgg tgctatctga ctttttgetg ttcagcagtt cctgccctct 7200  
gattttccag tctgacct tccgattatc cctgacagc tcattcagac tggctaatagc 7260  
accagtaag gcagcgggat catcaacagg cttagttaa acccatcggc attttctttt 7320  
gcgtttttat ttgttaactg ttaattgtcc ttgttcaagg atgctgtcct tgacaacaga 7380  
tgttttcttg cctttgatgt tcagcaggaa gctcggcgca aacgttgatt gtttgtctgc 7440  
gtagaatcct ctgtttgtca tatagcttgt aatcacgaca ttgtttcctt tcgcttgagg 7500  
tacagcgaag tgtgagtaag taaaggttac atcgtagga tcaagatcca tttttaacac 7560  
aaggccagtt ttgttcagcg gcttgtatgg gccagttaaa gaattagaaa cataaccaag 7620  
catgtaaata tcgttagacg taatgccgtc aatcgtcatt tttgatccgc gggagtcagt 7680  
gaacaggtac catttgccgt tcattttaaa gacgttcgcg cgttcaattt catctgttac 7740  
tgtgttagat gcaatcagcg gtttcatcac ttttttcagt gtgtaatcat cgttttagctc 7800  
aatcataccg agagcgcctt ttgctaactc agccgtgctt tttttatcgc tttgcagaag 7860  
tttttgactt tcttgacgga agaatgatgt gcttttgcca tagtatgctt tgtaaataa 7920  
agattcttcg ccttggtagc catcttcagt tccagtgtt gcttcaaata ctaagtattt 7980  
gtggccttta tcttctacgt agtgaggatc tctcagcgtg tggttgtcgc ctgagctgta 8040  
gttgccctca tcgatgaact gctgtacatt ttgatcgtt ttcccgtaac cgtcaaagat 8100  
tgatttataa tcctctacac cgttgatgtt caaagagctg tctgatgctg atacgttaac 8160  
ttgtgcagtt gtcagtgtt gtttgccgta atgtttaccg gagaaatcag tgtagaataa 8220  
acggattttt ccgtcagatg taaatgtggc tgaacctgac cattcttctg tttggtcttt 8280  
taggatagaa tcatttgcac cgaatttctc gctgtcttta aagacgcggc cagcgttttt 8340  
ccagctgtca atagaagttt ccgcgacttt ttgatagaac atgtaaatcg atgtgtcatc 8400  
cgcattttta ggatctccgg ctaatgcaaa gacgatgtgg tagccgtgat agtttgcgac 8460  
agtgcctgca gcgttttgta atggccagct gtcccaaacg tccaggcctt ttgcagaaga 8520  
gatattttta attgtggacg aatcaaatc agaaactga tatttttcat ttttttgctg 8580  
ttcagggatt tgcagcatat catggcgtgt aatatgggaa atgccgatg tttccttata 8640  
tggcttttg ttcgtttctt tcgcaaacgc ttgagttgcg cctcctgcca gcagtgcggt 8700  
agtaaaggtt aatactgttg cttgttttgc aaactttttg atgttcatcg ttcattgtctc 8760  
cttttttatg tactgtgta gcggtctgct tcttcagcc ctctgtttg aagatggcaa 8820  
gttagttacg cacaataaaa aaagacctaa aatatgtaag gggtgacgcc aaagtataca 8880  
ctttgccctt tacacatttt aggtcttgcc tgctttatca gtaacaaacc cgcgcgattt 8940  
acttttcgac ctcaattctat tagactctcg tttggattgc aactggtcta ttttctctt 9000  
ttgtttgata gaaaatcata aaaggatttg cagactcgg gcctaaagaa ctaaaaaatc 9060  
tatctgttct ttttcattct ctgtattttt tatagtttct gttgcatggg cataaagttg 9120  
cctttttaat cacaattcag aaaatatcat aatatctcat ttcactaaat aatagtgaac 9180  
ggcaggtata tgtgatgggt taaaaa 9206

<210> 40

<211> 10003

5 <212> ADN

<213> artificial

ES 2 517 394 T3

<220>

<223> Plásmido pOM331

<400> 40

```

ggatcggcgg ccagggccct catgagatga gtctttgatc aaggggtggcg cttttgactc      60
ccttggacac gcacgaaaag gcctcatgct ggtcttcgaa gatgccgttg attccgcat      120
cgctaccaa aaagctgctg acaagggaca atttgatctc tttgcagctt tcgactcgga      180
taacaacgac gatgtggcaa gtttcttcca gatcaccggt cctgatgacg aatgggaccg      240
taagcatgag ctcgactcgc agcgagaaat gctgggtctg tatgtttctg gacaccact      300
cgatggctat gaagatgcca ttgctgcccc ggttgatata gactgacca ccattggtgc      360
cggtgaactc aagcacggcg cagaagtgc cgtgggtggc attatctctg gtgtggatcg      420
acggttctcc aagaaggacg gttccccttg ggcgattgtc accattgaag atcacaacgg      480
cgcgtccggt gaattgttgg tcttcaacaa ggtgtattcc atcgttggat ccatgattgt      540
ggaagacaac atcatcttgg ccaaggcaca catctccatt cgagatgatc gtatgagcct      600
tttctgtgat gatctccgcg ttccagagct tgggccagga aacgggcaag gacttccgct      660
tcgtttgtcc atgcgtactg atcagtgcac catgtccaac attgccaagc tcaagcaggt      720
gctggtggac aacaagggtg aatctgatgt gtacctcaat ttgatcgatg gggataactc      780
cacggtcatg attttgggtg atcacttaag agtcaaccga tccgcaagtt tgatgggcga      840
cctcaaggca acgatggggc caggcatcct cggttaatca catcacactg ggattacccc      900
gtgtaggggt gaaaaccgca atgatgaata aaattccggg tgcagtgacc gtaggtgagg      960
taaacgcggt tagagtcgaa tgagagtttg atactttctt tcgactttta gattggattt     1020
tcaatgagcc agaaccgcat caggaccact cacgttggtt ccttgccccg taccagag      1080
ctacttgatg caaacatcaa gcgttctaac ggtgagattg gggaggagga attcttcag      1140
attctgcagt cttctgtaga tgacctgagg ccgcacagcg atcccagagg aaatatcctc     1200
tggggtcgct gtgtcgacct taaagttagg ctgccatgtg aatthtttagc accctcaaca     1260
gttgagtgct ggcactctcg ggggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt     1320
caccgcgac gacggtctgt ctggaaccac acaaccggca cacacaaaat ttttctagaa     1380
ggaggagaaa acatgtccac tgaaatcaaa actcaggtcg tggacttgg ggcaggcccc     1440
gcaggttact ccgctgcctt ccggttgcgt gatttaggtc tggaaaccgt aatcgtagaa     1500

```

ES 2 517 394 T3

cgttacaaca cccttggcgg tgtttgcctg aacgtcggct gtatcccttc taagcactg 1560  
 ctgcacgtag caaaagttat cgaagaagcc aaagcgctgg ctgaacacgg tatcgtcttc 1620  
 ggcgaaccga aaaccgatat cgacaagatt cgtacctgga aagagaaagt gatcaatcag 1680  
 ctgaccggtg gtctggctgg tatggcgaaa ggccgcaaag tcaaagtggc caacggctctg 1740  
 ggtaaattca ccggggctaa caccctggaa gttgaaggtg agaacggcaa aaccgtgatc 1800  
 aacttcgaca acgcgatcat tgcagcgggt tctcgcccga tccaactgcc gtttattccg 1860  
 catgaagatc cgcgtatctg ggactccact gacgcgctgg aactgaaaga agtaccagaa 1920  
 cgcctgctgg taatgggtgg cggtatcatc ggtctgaaa tgggcaccgt ttaccacgcg 1980  
 ctgggttcac agattgacgt ggttgaaatg ttcgaccagg ttatcccggc agctgacaaa 2040  
 gacatcgtaa aagtcttcac caagcgtatc agcaagaaat tcaacctgat gctggaaacc 2100  
 aaagttaccg ccggtgaagc gaaagaagac ggcatttatg tgacgatgga aggcaaaaa 2160  
 gcacccgctg aaccgcagcg ttacgacgcc gtgctggtag cgattggtcg tgtgccgaac 2220  
 ggtaaaaacc tcgacgcagg caaagcaggc gtggaagttg acgaccgtgg tttcatccgc 2280  
 gttgacaaaac agctgcgtac caacgtaccg cacatctttg ctatcggcga tatcgtcggc 2340  
 caaccgatgc tggcacacaa aggtgttcac gaaggtcacg ttgccgctga agttatcgcc 2400  
 ggtaaagaaac actacttoga tccgaaagt atcccgcca tcgcctatac cgaaccagaa 2460  
 gttgcatggg tgggtctgac tgagaaagaa gcgaaagaga aaggcatcag ctatgaaacc 2520  
 gccaccttcc cgtgggctgc tcttggctgt gctatcgctt ccgactgcgc agacggtatg 2580  
 accaagctga ttttcgacaa agaatctcac cgtgtgatcg gtgggtgcgat tgtcggctact 2640  
 aacggcggcg agctgctggg tgaatcggc ctggcaatcg aaatgggttg tgatgctgaa 2700  
 gacatcgcac tgaccatcca cgcgcaccgg actctgcacg agtctgtggg cctggcggca 2760  
 gaagtgttcg aaggtagcat taccgacctg ccgaaccgga aagcgaagaa gaagtaattt 2820  
 ttcgtttgcc ggaacatccg gcaattaaaa aagcggctaa ccacgccgct ttttttacgt 2880  
 ctgcaattta cttttccagt cttcttgctc cacggatccg ccctcccgca cgctttgcgg 2940  
 gagggcggta ccaggtcact gacatcccat tcggtgacat cattggtgag atcctgcgcg 3000  
 cagaggtcgg tggcttctcc ttcgaaggcg catctcctcg tcacgcacac gagtggcgtg 3060  
 tatgggaaga aaacaagctt cctgaaggct ctgttatcta ccctgggtgt gtgtctcact 3120  
 ccatcaacgc tgtggagcac ccacgcctgg ttgctgatcg tategttcag ttcgccaagc 3180  
 ttgttggccc tgagaacgtc attgcgtcca ctgactgtgg tctgggcgga cgtctgcatt 3240  
 cccagatcgc atgggcaaaag ctggagtccc tagtagaggg cgctcgcatt gcatcaaagg 3300  
 aactgttcta agctagacaa cgagggttgc tagtctaagc agcaaaatga gcggtctgtg 3360  
 ttccttcagc aaaattatct gaaggaacaa tagccgctca ttttatgtca gtgtgctttt 3420  
 aagcgtcgac gttgatgcca aactgggtga gcatgtcacg cagagtctgc ttgaacgatg 3480

ES 2 517 394 T3

ggtcgacggg caccatgaag gatgctgctg tggaagcaag agtgggtgatt gcgagcaatc 3540  
 cctgcagtac cgcaaaagga atggcaagcc attctggtgg ggagacaatg gaaccaatca 3600  
 ctggcatttc ggacaaccga tcgatcagtg cttgctgctc ttcgctgatt tcacgtcatc 3660  
 catcgctggt gtctttgccc gaggagctca agcttggggc cgcaggaatg tcgccattgc 3720  
 tgagcattga gctgccttca gagctgcctg gccaggtttc gtttccatcg actggatttc 3780  
 catcatcatc aaggatctgt gatgaggtga tgttgtctga gagctgtgtc agtgcgtcag 3840  
 aggactgagc ctgggcaact ggagtgaaca cggacaatgc cacagcgtt gctgtaacaa 3900  
 gggtaaaagt acttcgacgc aaagacaaaa cttttctcct ggcaataaat atgcggattt 3960  
 actatggaaa caagatagaa gattggatag cgaaagctat cctcaactcg tggaaagtgt 4020  
 agtgccacaa ccacagtatt ggctagaaaa caatctatag cattgttcta caaagagctt 4080  
 gttggaaata aaacctatgc caaagtagggt gcaattctag gagaagatta cactagtcaa 4140  
 ccatgagtga aacatacgtg tctgagaaaa gtccaggagt gatggctagc ggagcggagc 4200  
 tgattcgtgc cgccgacatt caaacggcgc aggcacgaat ttctctcgtc attgcaccaa 4260  
 ctccattgca gtattgccct cgtctttctg agatcgagct cacgcgtccc gggatttaaa 4320  
 tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaaag ccagtccgca gaaacgggtc 4380  
 tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc aagcgcгааг 4440  
 agaaagcagg tagcttgctg tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc ggttttatgg 4500  
 acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg gaagccctgc 4560  
 aaagtaaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg atcaagatct 4620  
 gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt 4680  
 tctcggccgc cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc 4740  
 tgctctgatg ccgccgtggt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag 4800  
 accgacctgt ccgggtccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg 4860  
 gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc gggaaaggac 4920  
 tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctctctg catctcacct tgctcctgcc 4980  
 gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc 5040  
 tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc 5100  
 ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg 5160  
 ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgcg ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat 5220  
 gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaaat gcccgctttt ctggattcat cgaactgtggc 5280  
 cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgta tattgctgaa 5340  
 gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgtccccgat 5400

ES 2 517 394 T3

tcgcagcgca tcgcctteta tcgccttett gacgagttct tctgagcggg actctggggt 5460  
 tcgaaatgac cgaccaagcg acgccaacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg 5520  
 ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg atgatcctcc 5580  
 agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag tttaaactgc ggatcagtga 5640  
 gggtttgtaa ctgcggttca aggatctgga ttctgatcac ggcacgatca tcgtgcggga 5700  
 gggcaagggc tccaaggatc gggccttgat gttacccgag agcttggcac ccagcctgcg 5760  
 cgagcagggg aattgatccg gtggatgacc ttttgaatga cctttaatag attatattac 5820  
 taattaattg gggaccctag aggtcccctt ttttatttta aaaatttttt cacaaaacgg 5880  
 tttacaagca taacgggttt tgctgcccgc aaacgggctg ttctggtgtt gctagtttgt 5940  
 tatcagaatc gcagatccgg cttcaggttt gccggctgaa agcgctatct cttccagaat 6000  
 tgcoatgatt ttttcccac gggaggcgtc actggctccc gtggttgcgg cagctttgat 6060  
 tcgataagca gcatgcctg tttcaggctg tctatgtgtg actggtgagc tgtaacaagt 6120  
 tgtctcaggt gttcaatttc atgttctagt tgccttgttt tactggtttc acctgtteta 6180  
 ttagggtgta catgctgttc atctgttaca ttgtcgatct gttcatggtg aacagcttta 6240  
 aatgcaccaa aaactcgtaa aagctctgat gtatctatct tttttacacc gttttcatct 6300  
 gtgcatatgg acagttttcc ctttgatato taacggtgaa cagttgttct acttttgttt 6360  
 gttagtcttg atgcttcaact gatagataca agagccataa gaacctcaga tccttccgta 6420  
 tttagccagt atgttcteta gtgtggttcg ttgtttttgc gtgagccatg agaacgaacc 6480  
 attgagatca tgcttacttt gcatgtcact caaaaatttt gcctcaaac tggtagactg 6540  
 aatttttgca gttaaagcat cgtgtagtgt ttttcttagt ccgttacgta ggtaggaatc 6600  
 tgatgtaatg gttgttggtg tttgttcacc attcattttt atctggttgt tctcaagttc 6660  
 ggttacgaga tccatttgtc tatctagttc aacttgaaa atcaacgtat cagtcgggcg 6720  
 gcctcgctta tcaaccacca atttcatatt gctgtaagtg tttaaatctt tacttattgg 6780  
 tttcaaaacc cattgggtta gcctttttaa ctcatggtag ttattttcaa gcattaacat 6840  
 gaacttaaat tcatcaaggc taatctctat atttgccttg tgagttttct tttgtgttag 6900  
 ttcttttaat aaccactcat aaatcctcat agagtatttg ttttcaaaag acttaacatg 6960  
 ttccagatta tattttatga atttttttaa ctggaaaaga taaggcaata tctcttcaact 7020  
 aaaaactaat tctaattttt cgcttgagaa ctggcatag tttgtccact ggaaaatctc 7080  
 aaagccttta accaaaggat tcctgatttc cacagttctc gtcacatcagct ctctggttgc 7140  
 tttagctaata acaccataag cattttccct actgatgttc atcatctgag cgtattgggt 7200  
 ataagtgaac gataccgtcc gttctttcct ttaggggttt tcaatcgtgg ggttgagtag 7260  
 tgccacacag cataaaatta gcttggtttc atgctccgtt aagtcatagc gactaatcgc 7320  
 tagttcattt gctttgaaaa caactaatc agacatacat ctcaattggt ctaggtgatt 7380

ES 2 517 394 T3

ttaatcacta taccaattga gatgggetag tcaatgataa ttactagtcc ttttcctttg 7440  
 agttgtgggt atctgtaa atctgtagac ctttgctgga aaacttgtaa attctgctag 7500  
 accctctgta aattccgcta gacctttgtg tgtttttttt gtttatattc aagtggttat 7560  
 aatttataga ataaagaaag aataaaaaa gataaaaaga atagatccca gccctgtgta 7620  
 taactcacta ctttagtcag ttccgcagta ttacaaaagg atgtcgcaaa cgctgtttgc 7680  
 tcctctacaa aacagacctt aaaaccctaa aggcttaagt agcacctcgc caagctcggg 7740  
 caaatogctg aatattcctt ttgtctcoga ccacagga cctgagtcgc tgtetttttc 7800  
 gtgacattca gttcgtcgcg ctcacggctc tggcagtgaa tgggggtaaa tggcactaca 7860  
 ggcgcctttt atggattcat gcaaggaaac taccataat acaagaaaag cccgtcacgg 7920  
 gcttctcagg gcgttttatg ggggtctgc tatgtgtgc tatctgactt tttgctgttc 7980  
 agcagttcct gccctctgat tttccagtct gaccactcgc gattatcccg tgacaggtca 8040  
 ttcagactgg ctaatgcacc cagtaaggca gcggtatcat caacaggctt agtttaaacc 8100  
 catcggcatt ttcttttgcg tttttatgtt ttaactgtta attgtccttg ttcaaggatg 8160  
 ctgtctttga caacagatgt tttcttgctt ttgatgttca gcaggaagct cggcgcaaac 8220  
 gttgattgtt tgtctgcgta gaatcctctg tttgtcatat agcttgtaat cacgacattg 8280  
 tttcctttcg cttgaggtac agcgaagtgt gagtaagtaa aggttacatc gttaggatca 8340  
 agatccattt ttaacacaag gccagttttg ttcagcggct tgtatgggccc agttaaagaa 8400  
 ttagaaacat aaccaagcat gtaaatacgc ttagacgtaa tgccgtcaat cgtcattttt 8460  
 gatccgctgg agtcagtgaa caggtagcat ttgccgttca ttttaaagac gttcgcgcgt 8520  
 tcaatttcat ctgttactgt gtttagatgca atcagcgggt tcatcacttt tttcagtggt 8580  
 taatcatcgt ttagctcaat cataccgaga gcgcccgttg ctaactcagc cgtgcgtttt 8640  
 ttatcgtctt gcagaagttt ttgactttct tgacggaaga atgatgtgct tttgccatag 8700  
 tatgctttgt taaataaaga ttcttcgctt tggtagccat cttcagttcc agtgtttgct 8760  
 tcaaatacta agtattttgt gcctttatct tctacgtagt gaggatctct cagcgtatgg 8820  
 ttgtcgcctg agctgtagtt gccttcacgc atgaactgct gtacattttg atacgttttt 8880  
 ccgtcacctg caaagattga tttataatcc tctacaccgt tgatgttcaa agagctgtct 8940  
 gatgctgata cgttaacttg tgcagttgct agtgtttgtt tgccgtaatg tttaccggag 9000  
 aatcagtggt agaataaacg gatttttccg tcagatgtaa atgtggctga acctgacct 9060  
 tcttgtgttt ggtcttttag gatagaatca tttgcatcga atttgtcgcgt gtctttaaag 9120  
 acgcgccag cgtttttcca gctgtcaata gaagtctcgc cgactttttg atagaacatg 9180  
 taaatcgatg tgtcatccgc attttttaga tctccgcta atgcaaagac gatgtggtag 9240  
 ccgtgatagt ttgcgacagt gccgtcagcg ttttgtaatg gccagctgtc ccaaactcc 9300

ES 2 517 394 T3

aggccttttg cagaagagat atttttaatt gtggacgaat caaattcaga aacttgatat 9360  
 ttttcatttt tttgctgttc agggatttgc agcatatcat ggcggtgtaat atgggaaatg 9420  
 ccgatatgtt ccttatatgg cttttggttc gtttctttcg caaacgcttg agttgcgctc 9480  
 cctgccagca gtgcggtagt aaaggtaat actggtgctt gttttgcaaa ctttttgatg 9540  
 ttcacogttc atgtctcctt ttttatgtac tgtgtagcg gtctgcttct tccagccctc 9600  
 ctgtttgaag atggcaagtt agttacgcac aataaaaaaa gacctaaaat atgtaagggg 9660  
 tgacgccaaa gtatacactt tggcctttac acattttagg tcttgccctgc tttatcagta 9720  
 acaaaccgcg gcgatttact tttcgacctc attctattag actctcgttt ggattgcaac 9780  
 tggctatatt tcctcttttg tttgatagaa aatcataaaa ggatttgacg actacggggc 9840  
 taaagaacta aaaaatctat ctgtttcttt tcattctctg tattttttat agtttctgtt 9900  
 gcatgggcat aaagtgccct ttttaatcac aattcagaaa atatcataat atctcatttc 9960  
 actaataat agtgaacggc aggtatatgt gatgggtaa aaa 10003

<210> 41

<211> 11325

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pOM344

<400> 41

ttgatcagcg gccgcacagc gatcccagag gaaatatacct ctggggtcgc tgtgtcgacc 60  
 ttaaagtttg gctgccatgt gaatttttag caccctcaac agttgagtgc tggcactctc 120  
 gggggtagag tgccaaatag gttgtttgac acacagttgt tcacccgcga cgacggctgt 180  
 gctggaaacc cacaaccggc acacacaaaa tttttctaga ggaggtgaaa gtatggcaca 240  
 gcagaccctt ttgtacgaac aacacacgct ttgcccggct cgcattggtg atttccacgg 300  
 ctggatgatg ccgctgcatt acggttcgca aatcgacgaa catcatgcyg tacgtaccga 360  
 tgccggaatg tttgatgtgt cacatatgac catcgctgat ctccgcccga gccgcaccgg 420  
 ggagtttctg cgttatctgc tggcgaacga tgtggcgaag ctcacccaaa gcggcaaagc 480  
 cctttactcg gggatgttga atgcctctgg cgggtgtgata gatgacctca tcgtctacta 540  
 ctttactgaa gatttcttcc gcctcgttgt taactccgcc acccgcgaaa aagacctctc 600  
 ctggattacc caacacgctg aacctttcgg catcgaaatt accgttcgtg atgacctttc 660  
 catgattgcc gtgcaagggc cgaatgcgca ggcaaaaagct gccacactgt ttaatgacgc 720  
 ccagcgtcag gcggtggaag ggatgaaacc gttctttggc gtgcaggcgg gcgatctgtt 780  
 tattgccacc actggttata ccggtgaagc gggctatgaa attgcccctgc ccaatgaaaa 840  
 agcggccgat ttctggcgtg cgctggtgga agcgggtgtt aagccatgtg gcttggggcg 900  
 gcgtgacacg ctgcgtctgg aagcgggcat gaatctttat ggtcaggaga tggacgaaac 960

ES 2 517 394 T3

catctctcct ttagccgcca acatgggctg gaccatcgcc tgggaaccgg cagatcgtga 1020  
ctttatcggc cgtgaagccc tggaagtgca gcgtgagcat ggtacagaaa aactgggttg 1080  
tctggtgatg accgaaaaag gcgtgctgcg taatgaactg ccggtacgct ttaccgatgc 1140  
gcagggcaac cagcatgaag gcattatcac cagcggctact ttctccccga cgtgggtta 1200  
cagcattgcg ctggcgcgcg tgccggaagg tattggcgaa acggcgattg tgcaaattcg 1260  
caaccgtgaa atgccgggta aagtgacaaa acctgttttt gtgcgtaacg gcaaagccgt 1320  
cgcgtgattt acttttttgg agattgattg atgagcaacg taccagcaga actgaaatac 1380  
agcaagaac acgaatggct gcgtaaagaa gccgacggca cttacaccgt tggattacc 1440  
gaacatgctc aggagctggt aggcgatatg gtgtttgttg acctgccgga agtgggcgca 1500  
acggttagcg cgggcgatga ctgcgcggtt gccgaatcgg taaaagcggc gtcagacatt 1560  
tatgcgccag taagcgggta aatcgtggcg gtaaacgacg cactgagcga ttccccgaa 1620  
ctggtgaaca gcgaaccgta tgcaggcggc tggatcttta aatcaaagc cagcgtgaa 1680  
agcgaactgg aatcactgct ggatgcgacc gcatacgaag cattgttaga agacgagtaa 1740  
cggctttatt cctctctcgc gggagaggat cagggtgagg aaaatztatg cctcaccctc 1800  
actctcttcg taaggagaga ggttcacaat tcaactgcacg tttcaggaac catcgctcat 1860  
gacacagacg ttaagccagc ttgaaaaacag cggcgctttt attgaacgcc atacggacc 1920  
ggacgccgcg caacagcaag aatgctgaa tgccgttggg gcacaatcgt taaacgcgct 1980  
gaccggccag attgtgccga aagatattca acttgcgaca ccaccgcagg ttggcgcacc 2040  
ggcgcaccga tacgccgcac tggcagaact caaggctatt gccagtcgca ataaacgctt 2100  
cacgtcttac atcggcatgg gttacaccgc cgtgcageta ccgccggtta tcctgcgtaa 2160  
catgctggaa aatccgggct ggtataaccg gtacactcgg tatcaacctg aagtctccca 2220  
gggcccgcctt gaagcactgc tcaacttcca gcaggtaacg ctggatttga ctggactgga 2280  
tatggcctct gcttctcttc tggacgaggg caccgctgcc gccgaagcaa tggcgtggc 2340  
gaaaacgcgtc agcaaaactga aaaatgcca cgccttcttc gtggcttccg atgtgcatcc 2400  
gcaaacgctg gatgtgggtec gtactcgtgc cgaaaccttt ggttttgaag tgattgtcga 2460  
tgacgcgcaa aaagtgctcg accatcagga cgtcttcggc gtgctgttac agcaggtagg 2520  
cactaccggt gaaattcacg actacaactgc gcttattagc gaactgaaat cacgcaaaat 2580  
tgtggtcagc gttgcgcgcg atattatggc gctggtgctg ttaactgcgc cgggtaaaca 2640  
gggcccggat attgtttttg gttcggcgca acgcttcggc gtgccgatgg gctacgggtg 2700  
cccacacgcg gcattctttg cggcgaaaga tgaatacaaa cgetcaatgc cgggccgtat 2760  
tatcgggtga tcgaaagatg cagctggcaa taccgcgctg cgcattggcg tgcaactcgc 2820  
cgagcaacat atccgcgctg agaaagcgaa ctccaacatt tgtacttccc aggtactgct 2880

ES 2 517 394 T3

ggcaaacatc gccagcctgt atgccgttta tcacggcccc gttggcctga aacgtatcgc 2940  
 taaccgcatt caccgtctga ccgatatcct ggcggcgggc ctgcaacaaa aaggtctgaa 3000  
 actgcgccat gcgcactatt tcgacacctt gtgtgtggaa gtggccgaca aagcgggcgt 3060  
 actgacgcgt gccgaagcgg ctgaaatcaa cctgcgtagc gatattctga acgcggttgg 3120  
 gatcaccctt gatgaaacaa ccacgcgtga aaacgtaatg cagcttttca acgtgctgct 3180  
 gggcgataac cacggcctgg acatcgacac gctggacaaa gacgtggctc acgacagccg 3240  
 ctctatccag cctcgcgatgc tgcgcgacga cgaatcctc acccatccgg tgtttaatcg 3300  
 ctaccacagc gaaaccgaaa tgatgcgcta tatgcaactc ctggagcgta aagatctggc 3360  
 gctgaatcag gcgatgatcc cgctgggttc ctgcaccatg aaactgaacg ccgccgccga 3420  
 gatgatccca atcacctggc cggaaattgc cgaactgcac ccgttctgcc cgccggagca 3480  
 ggcogaaggt tatcagcaga tgattgcgca gctggctgac tggctggtga aactgaccgg 3540  
 ttacgacgcc gtttqtatgc agccgaactc tggcgcacag ggcgaatacg cgggcctgct 3600  
 ggcgattcgt cattatcatg aaagccgcaa cgaagggcat cgcgatatct gcctgatccc 3660  
 ggcttctcgc cacggaacta accccgcttc tgcacatatg gcaggaatgc aggtggtggt 3720  
 tgtggcgtgt gataaaaacg gcaacatcga tctgactgat ctgcgcgcga aagcggaaac 3780  
 ggcgggcgat aacctctcct gtatcatggt gaacttatcct tctaccacg gcgtgtatga 3840  
 agaaacgatc cgtgaagtgt gtgaagtcgt gcatcagttc ggcggtcagg tttaccttga 3900  
 tggcgcgaac atgaacgcc aggttgcat cacctcgcgc ggctttattg gtgcggacgt 3960  
 ttcacacctt aacctacata aaactttctg cattccgcac ggcggtggtg gtccgggtat 4020  
 gggaccgatc ggcgtgaaag cgcatttggc accgtttgta ccgggtcata gcgtggtgca 4080  
 aatcgaaggc atgttaaccc gtcagggcgc ggtttctcgc gcaccgttcg gtagegcctc 4140  
 tatectgcca atcagctgga tgtacatccg catgatgggc gcagaagggc tgaaaaaagc 4200  
 aagccaggtg gcaatcctca acgccaacta tattgccagc cgcctgcagg atgccttccc 4260  
 ggtgctgtat accggtcgcg acggtcgcgt ggcgcacgaa tgtattctcg atattcgccc 4320  
 gctgaaagaa gaaaccggca tcagcgagct ggatattgcc aagcgcctga tcgactacgg 4380  
 tttccacgcg ccgacgatgt cgttccccgt ggcgggtacg ctgatggttg aaccgactga 4440  
 atctgaaagc aaagtggaac tggatcgctt tatcgacgcg atgctggcta tccgcgcaga 4500  
 aattgaccag gtgaaagccg gtgtctggcc gctggaagat aaccgcctgg tgaacgcgcc 4560  
 gcacattcag agcgaactgg tcgccgagtg ggcgcacccg tacagccgtg aagttgcggt 4620  
 attcccggca ggtgtggcag acaaaactg gccgacagtg aaacgtctgg atgatgttta 4680  
 cggcgaccgt aacctgttct gctcctgcgt accgattagc gaataccagt aattcactga 4740  
 ttcgactatt ttctaaagc gcttcggcgc ctttttagtc agatgacaaa gtacaaaagt 4800  
 gctcagacag tcccctcgcc ggatccgccc tcccgcacgc tttgcccggag ggcttttctt 4860

ES 2 517 394 T3

ttccccggtat ttaaatacgt agcgggctgc taaaggaagc ggaacacgta gaaagccagt 4920  
 ccgcagaaac ggtgctgacc ccggatgaat gtcagctact gggctatctg gacaagggaa 4980  
 aacgcaagcg caaagagaaa gcaggtagct tgcagtgggc ttacatggcg atagctagac 5040  
 tgggcggttt tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag 5100  
 gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc 5160  
 aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat 5220  
 ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagagggc tatteggcta tgactgggca 5280  
 caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca gggcgccccg 5340  
 gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg 5400  
 cggctatcgt ggctggccac gacgggctgt ccttgcgcag ctgtgctcga cgttgtcact 5460  
 gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct 5520  
 caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgccgcg gctgcatacg 5580  
 cttgatccgg ctacctgcc attcaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt 5640  
 actcggatgg aagccggctc tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 5700  
 gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcacgc ccgacggcga ggatctcgtc 5760  
 gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga 5820  
 ttcacogact gtggccggtt ggggtgtggc gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 5880  
 cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttctcgt gctttacggt 5940  
 atcgcgctc ccgattogca gcgcacgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga 6000  
 gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt 6060  
 tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgtttc cgggacgccg 6120  
 gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt cttcgccac gctagttaa 6180  
 actcgggatc agtgaggggt tgtaactgcg ggtcaaggat ctggatttcg atcacggcac 6240  
 gatcatcgtg cgggagggca agggctccaa ggatcgggcc ttgatgttac ccgagagctt 6300  
 ggcacccagc ctgcgcgagc aggggaattg atccggtgga tgacctttg aatgacctt 6360  
 aatagattat attactaatt aattggggac cctagaggtc ccctttttta ttttaaaat 6420  
 tttttcacia aacggtttac aagcataaac ggttttctg cccgcaaagc ggctgttctg 6480  
 gtgttgctag tttgttatca gaatcgaga tccggcttca ggtttgccgg ctgaaagcgc 6540  
 tatttcttc agaattgcca tgatttttc cccacgggag gcgtcactgg ctcccgtgtt 6600  
 gtcggcagct ttgattogat aagcagcatc gcctgtttca ggetgtctat gtgtgactgt 6660  
 tgagetgtaa caagttgtct cagggttca atttcatgtt ctagtgtctt tgtttactg 6720  
 gttcacctg ttctattag tgttacatgc tgttcatctg ttacattgtc gatctgttca 6780

ES 2 517 394 T3

tggatgaacag ctttaaatgc accaaaaact cgtaaaagct ctgatgtatc tatctttttt 6840  
 acaccgtttt catctgtgca tatggacagt tttccctttg atatctaacg gtgaacagtt 6900  
 gttctacttt tgtttgtag tcttgatgct tcaactgatag atacaagagc cataagaacc 6960  
 tcagatcctt ccgtatttag ccagtatggt ctctagtgtg gttcgttgtt tttgcgtgag 7020  
 ccatgagaac gaaccattga gatcatgctt actttgcatg tcaactcaaaa attttgccctc 7080  
 aaaactggtg agctgaattt ttgcagttaa agcatcgtgt agtgtttttc ttagtccggt 7140  
 acgtaggtag gaatctgatg taatggttgt tggatattttg tcaccatca tttttatctg 7200  
 gttgttctca agttcgggta cgagatccat ttgtctatct agttcaactt ggaaaatcaa 7260  
 cgtatcagtc gggcggcctc gcttatcaac caccaatttc atattgctgt aagtgtttaa 7320  
 atctttactt attggtttca aaaccattg gttaagcctt ttaaaactcat ggtagtattt 7380  
 ttcaagcatt aacatgaact taaattcatc aaggctaate tctatatttg ccttgtgagt 7440  
 tttcttttgt gttagtctt ttaataacca ctcataaatc ctcatagagt atttgttttc 7500  
 aaaagactta acatgttcca gattatattt tatgaatttt ttttaactgga aaagataagg 7560  
 caatatctct tcaactaaaa ctaattctaa tttttcgtt gagaacttgg catagtttgt 7620  
 ccactggaaa atctcaaagc ctttaaccaa aggattcctg atttccacag ttctcgtcat 7680  
 cagctctctg gttgcttag ctaatacacc ataagcattt tcctactga tgttcatcat 7740  
 ctgagcgtat tggttataag tgaacgatac cgtccgttct tcctttagtag ggttttcaat 7800  
 cgtggggttg agtagtgcca cacagcataa aattagcttg gtttcatgct ccgtaagtc 7860  
 atagcgacta atcgctagtt catttgcttt gaaaacaact aattcagaca tacatctcaa 7920  
 ttggtctag tagattttaat cactatacca attgagatgg gctagtcaat gataattact 7980  
 agtccctttc ctttgagttg tgggtatctg taaattctgc tagaccttg ctggaaaact 8040  
 tgtaaatct gctagacct ctgtaaatc cgetagacct ttgtgtgtt tttttgttta 8100  
 tattcaagt gttataatt atagaataaa gaaagaataa aaaaagataa aaagaataga 8160  
 tcccagccct gtgtataact cactacttta gtcagttccg cagtattaca aaaggatgct 8220  
 gcaaacgctg tttgctctc tacaaaacag accttaaac cctaaaggct taagtagcac 8280  
 cctcgaagc tcgggcaaat cgctgaatat tccttttgc tccgaccatc aggcacctga 8340  
 gtcgctgtct tttcgtgac attcagttcg ctgcgctcac ggetctggca gtgaatgggg 8400  
 gtaaatggca ctacagggc cttttatgga tcatgcaag gaaactacc ataatacaag 8460  
 aaaagcccgt cacgggcttc tcaaggcggt ttatggcggg tctgctatgt ggtgctatct 8520  
 gactttttgc tgttcagcag ttctgcctc ctgattttcc agtctgacca cttcgatta 8580  
 tcccgtgaca ggtcattcag actggctaata gcaccagta aggcagcggg atcatcaaca 8640  
 ggcttagttt aaaccgcaa gtcccgttc gtgaaaattt tcgtgccggt tgattttccg 8700  
 ccaaaaactt taacgaacgt tcgttataat ggtgtcatga cttcacgac gaagtactaa 8760

ES 2 517 394 T3

aattgcccc aatcatcagc tatggatctc tctgatgtcg cgetggagtc cgacgcgctc 8820  
gatgtgccc tcgatttaaa aacggtgatc ggatTTTTcc gagctctcga tacgacggac 8880  
gcccagcat cacgagactg ggccagtgc gcgagcgacc tagaaactct cgtggcggat 8940  
cttgaggagc tggctgacga gctgctgct cggccagcgc caggaggacg cacagtagtg 9000  
gaggatgcaa tcagttgctc ctactcgggt ggcctgattc ctccccggcc tgaccgcga 9060  
ggacggcgcg caaaatattg ctcagatgctg tctcgtgccc cagccagccg cgagcgcgcc 9120  
aacaaacgcc acgccgagga gctggaggcg gctaggtcgc aaatggcgtt ggaagtgcgt 9180  
ccccgagcgc aaatTTTggc catggtcgtc acagagctgg aagcggcagc gagaattatc 9240  
gcatcgtgg cggTgcccgc aggcattgaca aacatcgtaa atgccgcgtt tctgtgccc 9300  
tggcgcacca ggacgtgtca gcgccccac cacctgcacc gaatcggcag cagcgtcgcg 9360  
cgtcgaaaaa gcgcacaggc ggcaagaagc gataagctgc acgaatacct gaaaaatgtt 9420  
gaacgccccg tgagcggtaa ctcacagggc gtcggctaac ccccagtcca aacctgggag 9480  
aaagcgtca aaaatgactc tagcggattc acgagacatt gacacaccgg cctggaaatt 9540  
ttccgctgat ctgttcgaca cccatcccga gctcgcctg cgatcacgtg gctggacgag 9600  
cgaagaccgc cgcgaattcc tcgctcacct gggcagagaa aatttccagg gcagcaagac 9660  
ccgcgacttc gccagcgtt ggatcaaaga cccggacacg gagaaacaca gccgaagtta 9720  
taccgagttg gttcaaaatc gcttgcccgg tgcagtagt ttgctctgac gcacgcgcag 9780  
cacgcagccc tgetttgctt ggacattgat gtgccgagcc accaggccgg cgggaaaatc 9840  
gagcagctaa accccgaggt ctacgcgatt ttggagcgtt gggcacgcct ggaaaaagcg 9900  
ccagcttggg tcggcgtgaa tccactgagc gggaaatgcc agctcatctg gctcattgat 9960  
ccggtgtatg ccgcagcagg catgagcagc ccgaatatgc gcctgctggc tgcaacgacc 10020  
gaggaaatga cccgcgtttt cggcgtgac caggctttt cacataggct gagccgtggc 10080  
cactgcactc tccgacgac ccagccgtac cgtggcatg cccagcaca tcgctggat 10140  
cgcctagctg atcttatgga ggttgcctgc atgatctcag gcacagaaaa acctaaaaaa 10200  
cgtatgagc aggagtttct tagcggacgg gcacgtatcg aagcggcaag aaaagccact 10260  
gcggaagcaa aagcaattgc cacgcttga gcaagcctgc cgagcgcgcc tgaagcgtct 10320  
ggagagctga tcgacggcgt ccgtgtcctc tggactgctc caggcgtgc cccccgtgat 10380  
gagacggctt ttcgccacgc tttgactgtg ggataccagt taaaagcggc tggtagcgc 10440  
ctaaaagaca ccaaggttca tcgagcctac gagcgtgcct acaccgtcgc tcaggcggct 10500  
ggagagggcc gtgagcctga tctgccccc gactgtgacc gccagacgga ttggccgcga 10560  
cgtgtgcgcg gctacgtcgc taaaggccag ccagtcgtcc ctgctcgtca gacagagacg 10620  
cagagccagc cgagggcgaag agctctggcc actatgggaa gacgtggcgg taaaaagcc 10680

ES 2 517 394 T3

gcagaacgct ggaaagaccc aaacagtgag tacgcccgag cacagcgaga aaaactagct 10740  
aagtccagtc aacgacaagc taggaaagct aaaggaaatc gcttgaccat tgcaggttgg 10800  
tttatgactg ttgagggaga gactggctcg tggccgacaa tcaatgaagc tatgtctgaa 10860  
tttagcgtgt cacgtcagac cgtgaataga gcacttaagg tctgcgggca ttgaacttcc 10920  
acgaggacgc cgaaagcttc ccagtaaatg tgccatctcg taggcagaaa acggttcccc 10980  
cgtagggctc ctctcttggc ctcccttcta ggtcgggctg attgctcttg aagetcteta 11040  
ggggggctca caccataggc agataacgtt cccaccggc tcgcctcgta agcgacaag 11100  
gactgctccc aaagatcttc aaagccactg ccgcgactgc cttcgcgaag ccttgccccg 11160  
cggaaatttc ctccaccgag ttcgtgcaca cccctatgcc aagcttcttt caccctaaat 11220  
tcgagagatt ggattcttac cgtggaatt cttcgcaaaa atcgtcccct gatcgccctt 11280  
gcgacgttgg cgtcggtgcc gctggttgcg cttggcttga ccgac 11325

<210> 42

<211> 200

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Promotor P15

<400> 42

tcgaggetat tgacgacagc tatggttcac tgtccaccaa ccaaaactgt gctcagtacc 60  
gccaatatatt ctcccttgag gggatcaaa aggtgtccct agaagagatc cacgctgtgt 120  
aaaaatttta caaaaaggta ttgactttcc ctacagggtg tgtaataatt taattacagg 180  
cgggggcaac cccgcctggt 200

10 <210> 43

<211> 5666

<212> ADN

<213> artificial

<220>

15 <223> Plásmido pHF96

<400> 43

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcttcc gaccaaacca cactgcccac 60  
gaatcctaga aatgggatcc gtgggcattc gtgtctggtt taacggcctt gaaaccggac 120  
aggattgccc aaagtagtgc aatttccagt tcgtgggcat gtgtgtttgg tcaggtttag 180  
tcgggtcgaa aaatgaactc ggaatcggta aaaagtgacc tcacagaatc gcttctaagg 240  
gccgttcaaa gtgttgcceta tacaaacaca tgttctgact gcccgacctc ttaaaatggc 300  
gttaaatggc gcgaaatgga aaacgcctcg tggcctggat ggagcgtag tacgagacca 360  
gtacgagacc agacacacgt gacaaaaat cctgaaaagt ggaatcattg tcacgcctgt 420  
ctggttttagc tctggttcgg gacgggcgtg gaatggaggc agtgcaccga gaccttgacc 480

ES 2 517 394 T3

cgcgcccca caagcaaaa gtccccaaa caaacccacc ccgcccggaga cgtgaataaa 540  
 attcgcagct cattccatca gcgtaaacgc agctttttgc atggtgagac acctttgggg 600  
 gtaaatctca cagcatgaat ctctgggtta gatgactttc tgggtggggg agggtttaga 660  
 atgtttctag tcgcacgcca aaacccggcg tggacacgtc tgcagccgac gcggtcgtgc 720  
 ctgtttaga cggacattcc tagtttttcc aggagtaact tgatatctta gagatccatt 780  
 tgcttgaacc gccttcccat ctttgaattc attcaagggt gtaaggcggg tttcgctctt 840  
 ttaatacagt tttaaaggta gatttgggag agaagatttc cottaagaaa ggttcttaac 900  
 aaccatgccg cctgcgacgc tgttcaatgt tttgacttca gctggacttg accctcacca 960  
 gtcaggatgat gccattggtg tcgagctcgc ccatttcaca ttgacgttca cgtgggatga 1020  
 gtggctgcga gctcaagcga cgtgggtggg ggagttgagt gcgtcggatt atgtcgttc 1080  
 tattgtggcg attaaactctg cccatgatgc acgggcaacg ccgaagatga tgttgatgc 1140  
 cccgactggt ctgacaacgg tgcttaaggc ggataagggt cagttgcagg cgtttgccgt 1200  
 ggaggcgcctg ccgattggcg atggcctcag cgaggctcag ttggcggggg ttgtggctgc 1260  
 cgcgtttgat ggcccatcgc acctcactcg tgagtttcat gcactttacc cggagcgcctc 1320  
 gccgcaggag cgcggcgcaa tgctcaacat taagcttgc gacgcctccc cctctcaaac 1380  
 agttacgccc gtgcgagtag ctaactggtt catggatcag ggggtggagg aagttcctta 1440  
 tgatgcagct tctagaccg ggatttaaat cgctagcggg ctgctaaagg aagcgggaaca 1500  
 cgtagaaagc cagtccgag aaacggtgct gaccccgat gaatgtcagc tactgggcta 1560  
 tctggacaag ggaaaacgca agcgcгаааа gaaagcaggt agcttgcaat gggcttacat 1620  
 ggcgatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg ccagctgggg 1680  
 cgccctctg taaggttggg aagccctgca aagtaaactg gatggcttcc ttgccgcaa 1740  
 ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga tcgtttcgca 1800  
 tgattgaaca agatggattg cacgcagggt ctccggccgc ttgggtggag aggetattcg 1860  
 gctatgactg ggcacaacag acaatcggt gctctgatgc cgcctgttc cggetgtcag 1920  
 cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg aatgaactgc 1980  
 aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc 2040  
 tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg 2100  
 atctcctgtc atctcacctt gctcctgcc agaaagtac catcatggt gatgcaatgc 2160  
 ggcggtgca tacgcttgat cggctacct gccattcga ccaccaagcg aaacatcgca 2220  
 tcgagcgagc acgtaactcg atggaagccg gtcttgcga tcaggatgat ctggacgaag 2280  
 agcatcaggg gctcgcgcca gccgaaactgt tcgccaggct caaggcgcgc atgccgacg 2340  
 gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgc gaatatcatg gtggaaaatg 2400

ES 2 517 394 T3

gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggccggaccgc tatcaggaca 2460  
 tagcgttggc taccocgtgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc 2520  
 tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcac cgccttctat cgccttcttg 2580  
 acgagttctt ctgagcggga ctctggggtt cgaatgacc gaccaagcga cgcaccaact 2640  
 gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc ctctatgaa aggttgggct tcggaatcgt 2700  
 tttccgggac gccggctgga tgatcctcca gcgggggat ctcatgctgg agttcttcgc 2760  
 ccacgctagc ggcgccggc cggcccggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa 2820  
 aataccgcat caggcgcctc tccgcttccct cgctcactga ctgctgcgc tcggtcgttc 2880  
 ggctgcggcg agcggatca gctcactcaa agcgggtaac acggttatcc acagaatcag 2940  
 gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa 3000  
 aggcgcgctt gctggcgttt ttccatagcc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc 3060  
 gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc 3120  
 ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg 3180  
 cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt 3240  
 cgggtgtagt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgaac 3300  
 gctgcgcctt atccggtaac tctcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc 3360  
 cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag 3420  
 agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg 3480  
 ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttagtag ctcttgatcc ggcaaaaaa 3540  
 ccaccgctgg tagcgggtgg tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag 3600  
 gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtgga aacgaaaact 3660  
 cacgtaagc gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa 3720  
 aggcggccgc cggccgccat cggcattttc ttttgcgttt ttatttgta actgttaatt 3780  
 gtccttgctc aaggatgctg tctttgacaa cagatgtttt cttgcctttg atgttcagca 3840  
 ggaagctcgg cgcaaacgtt gattgtttgt ctgcgtagaa tcctctgttt gtcatatagc 3900  
 ttgtaatcac gacattgttt cctttcgttt gaggtacagc gaagtgtgag taagtaaagg 3960  
 ttacatcgtt aggatcaaga tccatthtta acacaaggcc agttttgttc agcggcttgt 4020  
 atgggccagt taaagaatta gaaacataac caagcatgta aatatcgta gacgtaatgc 4080  
 cgtcaatcgt catthttgat ccgcgggagt cagtgaacag gtaccatttg ccgttcattt 4140  
 taaagacgtt cgcgcgttca atttcatctg ttactgtgtt agatgcaatc agcggtttca 4200  
 tcactthttt cagtgtgtaa tcatcgttta gctcaatcat accgagagcg ccgtttgcta 4260  
 actcagccgt gcgtthttta tcgctttgca gaagthtttg actthcttga cggagaagtg 4320  
 atgtgcttht gccatagtat gctthgttaa ataaagattc ttcgccttgg tagccatctt 4380

ES 2 517 394 T3

cagttccagt gtttgettca aataactaagt atttgtggcc tttatcttct acgtagtgag 4440  
gatctctcag cgtatgggtg tgcctgagc tgtagttgcc ttcacgatg aactgctgta 4500  
cattttgata cgtttttccg tcaccgtcaa agattgattt ataatectet acaccgttga 4560  
tgttcaaaga gctgtctgat gctgatacgt taacttgtgc agttgtcagt gtttgtttgc 4620  
cgtaaatgtt accggagaaa tcagtgtaga ataacggat tttccgtca gatgtaaag 4680  
tggctgaacc tgaccattct tgtgtttggt cttttaggat agaatectt gcacogaatt 4740  
tgcgctgtc tttaaagacg cggccagcgt tttccagct gtcaatagaa gtttgcgca 4800  
ctttttgata gaacatgtaa atcgatgtgt catccgcatt tttaggatct cgggctaag 4860  
caaaagacgat gtggtagccg tgatagtttg cgacagtgcc gtcagcgttt tgtaatggcc 4920  
agctgtccca aacgtccagg ccttttgcag aagagatatt ttaattgtg gacgaatcaa 4980  
attcagaaac ttgatatttt tcattttttt gctgttcagg gatttgcagc atatcatggc 5040  
gtgtaaatatg ggaaatgccg tatgtttcct tatatggcct ttggttcgct tctttcgcaa 5100  
acgcttgagt tgcgcctcct gccagcagtg cggtagtaaa ggtaataact gttgcttgtt 5160  
ttgcaaacct tttgatgttc atcgttcatg tctccttttt tatgtactgt gttagcggtc 5220  
tgcttcttcc agccctcctg tttgaagatg gcaagttagt tacgcacaat aaaaaagac 5280  
ctaaaatatg taaggggtga cgccaaagta tacactttgc cttttacaca ttttaggtct 5340  
tgcctgcttt atcagtaaca aaccgcgcg atttactttt cgacctcatt ctattagact 5400  
ctcgtttgga ttgcaactgg tctattttcc tcttttgttt gatagaaaat cataaaagga 5460  
tttgcagact acgggcctaa agaactaaaa aatctatctg tttcttttca ttctctgtat 5520  
tttttatagt ttctgttga tgggcataaa gttgcctttt taatcacaat tcagaaaata 5580  
tcataaatc tcatttcact aaataatagt gaacggcagg tatatgtgat gggtaaaaa 5640  
ggatcggcgg ccgctcgatt taaatc 5666

<210> 44

<211> 40

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido HS1304

<400> 44

tacgaaagga tttttacc atgactaact ctctgcaac 40

10 <210> 45

<211> 32

<212> ADN

<213> artificial

<220>

15 <223> HS1305

<400> 45

## ES 2 517 394 T3

agcgcgtcta gattagaaca gccccgagat aa 32  
<210> 46  
<211> 32  
<212> ADN  
5 <213> artificial  
<220>  
<223> HS1302  
<400> 46  
gctagaacgc gtgagctgcc aattattccg gg 32  
10 <210> 47  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> artificial  
<220>  
15 <223> HS1303  
<400> 47  
gttgcagaag agttagtcat gggtaaaaaa tccttcgta 40  
<210> 48  
<211> 6965  
20 <212> ADN  
<213> artificial  
<220>  
<223> Plásmido pH655  
<400> 48

ES 2 517 394 T3

ctagagttct	gtgaaaaaca	ccgtggggca	gtttctgctt	cgcggtgttt	tttatttgtg	60
gggcactaga	cccgggattt	aatcgctag	cgggctgcta	aaggaagcgg	aacacgtaga	120
aagccagtcc	gcagaaaacg	tgctgacccc	ggatgaatgt	cagctactgg	gctatctgga	180
caagggaaaa	cgcaagcgca	aagagaaagc	aggtagcttg	cagtgggctt	acatggcgat	240
agctagactg	ggcggtttta	tggacagcaa	gcgaaccgga	attgccagct	ggggcgccct	300
ctggttaaggt	tgggaagccc	tgcaaagtaa	actggatggc	tttcttgccg	ccaaggatct	360
gatggcgtag	gggatcaaga	tctgatcaag	agacaggatg	aggatcgttt	cgcatgattg	420
aacaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttgggt	ggagaggcta	ttcggctatg	480
actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	atgccgccgt	gttccggctg	tcagcgcagg	540
ggcgcccggg	tctttttgtc	aagaccgacc	tgtccggtgc	cctgaatgaa	ctgcaggacg	600
aggcagcgcg	gctatcgtgg	ctggccacga	cgggcggtcc	ttgcgcagct	gtgetcgacg	660
ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	tattgggcga	agtgccgggg	caggatctcc	720
tgcatctca	ccttgctcct	gccgagaaag	tatccatcat	ggctgatgca	atcggcgggc	780
tgcatcagct	tgatccggct	acctgcccat	tcgaccacca	agcgaacat	cgcatcgagc	840

ES 2 517 394 T3

gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 900  
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 960  
atctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 1020  
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcggg ccgctatcag gacatagcgt 1080  
tggetacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 1140  
tttacggtat cggcgtccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt 1200  
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccc acctgccatc 1260  
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 1320  
ggacgccggc tggatgatec tccagcggg ggatctcatg ctggagtctc tcgcccacgc 1380  
tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 1440  
gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgtca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc 1500  
ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 1560  
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggc agcaaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 1620  
cgttgctggc gtttttccat aggcctccgc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 1680  
caagtcaag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa 1740  
gctcctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgccttc 1800  
tccctcggg aagcgtggcg etttctcata gctcacctg taggtatctc agttcgggtg 1860  
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 1920  
ccttatccg taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgactta tcgccactgg 1980  
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct 2040  
tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc 2100  
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 2160  
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 2220  
aagaagatcc tttgatctt tctacgggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 2280  
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 2340  
gcccgggccg cgcaaaagtcc cgcttcgtga aaattttcgt gcccgctgat tttccgcaa 2400  
aaactttaac gaacgttcgt tataatgggt tcatgacctt cacgacgaag tactaaaatt 2460  
ggccecgaatc atcagctatg gatctctctg atgtcgcgct ggagtccgac gcgctcgtg 2520  
ctgccgtcga tttaaaaacg gtgatcggat ttttccgagc tctcgatacg acggacgcgc 2580  
cagcatcacg agactgggccc agtgccgcga gcgacctaga aactctcgtg gcggatcttg 2640  
aggagctggc tgacgagctg cgtgctcggc cagcgcagg aggacgcaca gtagtggagg 2700  
atgcaatcag ttgcgcctac tgcggtgccc tgattcctcc ccggcctgac ccgcgaggac 2760

ES 2 517 394 T3

ggcgcgcaaa atattgctca gatgcgtgtc gtgccgcagc cagccgcgag cgcgccaaca 2820  
 aacgccacgc cgaggagctg gagggggcta ggtcgcaaat ggcgctgga gtgcgtcccc 2880  
 cgagcgaaat tttggccatg gtcgtcacag agctggaagc ggcagcgaga attatcgcg 2940  
 tcgtggcgggt gcccgcaggc atgacaaaaca tcgtaaatgc cgcgtttcgt gtgccgtggc 3000  
 cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc gtcgcgcgctc 3060  
 gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa aatgttgaac 3120  
 gccccgtgag cggtaactca cagggcgctc gctaaccccc agtccaaacc tgggagaaaag 3180  
 cgctcaaaaa tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg gaaattttcc 3240  
 gctgatctgt tcgacaccca tcccagagctc gcgctgcgat cacgtggctg gacgagcgaa 3300  
 gaccgcccgc aattcctcgc tcacctgggc agagaaaatt tccagggcag caagaccgcg 3360  
 gacttcgcca gcgcttgat caaagaccgc gacacggaga aacacagccg aagttatacc 3420  
 gagttggttc aaaatcgctt gcccggtgcc agtatgttg tctgacgcac gcgcagcacg 3480  
 cagccgtgct tgtcctggac attgatgtgc cgagccacca ggcggcgggg aaaatcgagc 3540  
 acgtaaaccc cgaggtctac gcgattttgg agcgctgggc acgcctggaa aaagcgccag 3600  
 cttggatcgg cgtgaatcca ctgagcggga aatgccagct catctggctc attgatccgg 3660  
 tgtatgccgc agcagggcatg agcagcccga atatgcgcct gctggctgca acgaccgagg 3720  
 aatgaccgcg cgttttcggc gctgaccagg ctttttcaca taggctgagc cgtggccact 3780  
 gcactctccg acgatcccag ccgtaccgct ggcatgccc gcaaatcgc gtggatcgcc 3840  
 tagctgatct tatggagggt gctcgcatga tctcaggcac agaaaaacct aaaaaacgct 3900  
 atgagcagga gttttctagc ggacgggcac gtatcgaagc ggcaagaaaa gccactcggg 3960  
 aagcaaaagc acttgccacg cttgaagcaa gcctgccgag cgcgctgaa gcgtctggag 4020  
 agctgatcga cggcgtccgt gtccctctga ctgctccagg gcgtgccgcc cgtgatgaga 4080  
 cggtttttcg ccacgctttg actgtgggat accagttaaa agcggctggg gagcgcctaa 4140  
 aagacaccaa gggtcacga gcctacgagc gtgcctacac cgtcgctcag gcggtcggag 4200  
 gaggccgtga gcctgatctg ccgccggact gtgaccgcca gacggattgg ccgacgctg 4260  
 tgcgcccgta cgtcgctaaa ggccagccag tcgtccctgc tcgtcagaca gagacgcaga 4320  
 gccagccgag gcgaaaagct ctggccacta tgggaagacg tggcggtaaa aaggccgag 4380  
 aacgctgga agaccctaac agtgagtacg cccgagcaca gcgagaaaa ctagctaagt 4440  
 ccagtcaacg acaagctagg aaagctaaag gaaatcgctt gaccattgca ggttggttta 4500  
 tgactgttga gggagagact ggctcgtggc cgacaatcaa tgaagctatg tctgaattta 4560  
 gcgtgtcacg tcagaccgtg aatagagcac ttaaggtctg cgggcattga acttccacga 4620  
 ggacgccgaa agcttcccag taaatgtgcc atctcgtagg cagaaaacgg ttcccccgta 4680  
 gggctctctc cttggcctcc tttctaggtc gggctgattg ctcttgaagc tctctagggg 4740

ES 2 517 394 T3

ggctcacacc ataggcagat aacgttcccc accggctcgc ctcgtaagcg cacaaggact 4800  
 gctcccaaag atcttcaaag ccaactgccgc gactgccttc gcgaagcett gccccgcgga 4860  
 aatttcctcc accgagttcg tgcacacccc tatgccaaagc ttctttcacc ctaaattcga 4920  
 gagattggat tcttaccgtg gaaattcttc gcaaaaatcg tcccctgac gccettgcga 4980  
 cgttggcgtc ggtgccgctg gttgcgcttg gcttgaccga cttgatcagc ggccgctcga 5040  
 tttaaatctc gagagggcctg acgtcgggcc cgggtaccac cgtgagctgc caattattcc 5100  
 gggcttgtga cccgctaccc gataaatagg tgggctgaaa aatttcgctg caatatcaac 5160  
 aaaaaggcct atcattggga ggtgtcgcac caagtacttt tgcgaagcgc catctgacgg 5220  
 attttcaaaa gatgtatatg ctccggtcgg aaacctacga aaggattttt taccatgac 5280  
 taactcttct gcaaccagca atcccccaacc cagcgacgtc gaaatcgcac aggccacac 5340  
 cctggagccc atcaccacga tgcgggagcg cgcggcatc ccggaggccg ctttgattcc 5400  
 ctacggccgt acaaaggcca agatcgacgt tcccgtctcg cggcgaggc gtgagggcgt 5460  
 caataaaaag ggcaagctcg tgctcgtgac cgcaatgagc ccgacccccg cgggtgaagg 5520  
 caagtccacg gtgctgatcg gcttggcggga cgcgggtcgc acggcagggc gccagacgat 5580  
 ggtggcgate cgcgagccgt cccaggggcc agtcatgggc atcaagggcg gcgctgctgg 5640  
 cggcggttat gcgcagatcg tgccgatgga agacatcaac ctgcacttca caggcgacat 5700  
 gcacgccatc accgcccga cgaacctctt gggggcgatg gtggacaacc acgtgcagca 5760  
 cggcaatgct ctgggcatcg acccgcgcg ggtgacgtgg cgacgctgcc ttgacgtcaa 5820  
 cgaccgctcg ctgcgccatg tagtcacagg cctaggcgggt cctggtcagg gcacgccccg 5880  
 cgagggcgga ttcgatatca cggcggccag cgagatcatg gctatcctct gtctggccac 5940  
 cgacctggag gatctaaaga agcgcacatc gcgcatcgtg gtggggccaga cctacgaccg 6000  
 tcgaccagtc accgcggggc acctgaagtg cgcggggcgt atcaccgccc tgctgcgcga 6060  
 cgcgatcaac ccgaacctgg tgcagacctt gggcgccact cccgccctgg tgcacggcgg 6120  
 gcctttcgcc aacatcgcg acggctgtaa ctctctgac gcaaccacca cggcgctgga 6180  
 tctatcagaa gttgtgctga ccgaggtcgg tttcggcagc gacctgggtg cggagaagt 6240  
 cttcgacatc aagtcccgcg ctggcgacct cgacgtcgcc gcaacggttg tggtgccac 6300  
 catccgcttc ctgaagcaca acggcgatc cgtggtgaa gcccgtctgg ccaacctgga 6360  
 gcgcccagtc agtaacatcc gcaagttcgg cgtggaaccc gtggtggcgc tgaacctgtt 6420  
 tagctccgat accgcccggc agcgtcttat ggtcgcgat tggggcgagc agttcgggtg 6480  
 gcgctgggtg gagtgcagcg tgtgggtga gggcggtgcc ggcgcgcgcg atctggccac 6540  
 tgcggtgctg gaggtcgttg atggtgttcc tgatgaggac gcctccagct ccagccacca 6600  
 gatctatcag cccgtcgatg gcgtggaagc caccctgcac acaactgcca cggaaatcta 6660  
 cggcgcgggc gatgtgcagt tggccccgca ggtctgaa gacctggcgt ttctgaagga 6720  
 caacggctgg gacaagctgc cagtgtcgtt gtcgaagaca cagtactcct tcagcgatga 6780  
 ccccagcgcg ctgggcgcgc cgagcgccca caccctgcac gtccgcgagc tggtgccacg 6840  
 catcggcgcc ggattcgtgg tggctctcac cggcgacgtg atgactctgc cgggtctgcc 6900  
 gaagaaaccc gcagccgagc gtattgatgt gaacgcgcag ggggttatct cggggctgtt 6960  
 ctaat 6965

ES 2 517 394 T3

<210> 49

<211> 6132

<212> ADN

<213> artificial

5 <220>

<223> Plásmido pH657

<400> 49

```

cgcgtgagct gccaatatt cgggcttgt gaccgctac ccgataaata ggtcggctga      60
aaaatttcgt tgcaatatca acaaaaaggc ctatcattgg gaggtgtcgc accaagtact     120
tttgcgaagc gccatctgac ggattttcaa aagatgtata tgctcgggtgc ggaaacctac   180
gaaaggattt tttaacctg actaactott ctgcaaccag caatcccca cccagcgcgacg    240
tcgaaatcgc acaggcccac tccctggagc ccatcaccac gatcgcgggag cgcgcgggca    300
tcccggaggc cgctttgatt ccctacggcc gcacaaaggc caagatcgc gttcccgctc     360
tgcggggcga gcgtgagggc gtcaatagaa agggcaagct cgtgctcgtg accgcaatga    420
gcccgacccc cgcgggtgaa ggcaagtcca cggtgctgat cggcttggcg gacgcgggtgc    480
gcacggcagg gcgccagacg atggtggcga tccgcgagcc gtcccagggg ccggtcatgg    540
gcatcaaggg cggcgctgct ggcggcggtt atgcgcatg cgtgccgatg gaagacatta     600
acctgcaact cacaggcgac atgcacgcca tcaccgccc gacgaacct ctggcggcga      660
tggtggaaca ccacgtgcag cacggcaatg ctctgggcat cgaccgcgg cgggtgacgt     720
ggcggcgctg cctggagctc aacgaccgct cgetgcgcca tgttggtcaca ggcctaggcg    780
gccctggtca gggcacgccc cgcgagggcg gattcgatat cacggcggcc agcgagatca    840
tggctatcct ctgtctggcc accgacctgg aagatctaaa gaagcgcac cggcgcatcg     900
tggtgggcca aacttatgat cgcaagccag tcaccgcccg cgacctgaag tgcgcggggcg   960
ctatcaccgc cctgctgcgc gatgcatca acccgaacct agtgcagacc ctgggtggca   1020
cccccgcaact ggtgcaaggc gggcctttcg ccaacatcgc gcacggatgc aactcgetga   1080
tcgcaaccac cacggcgtg gacctgtcgg aggttgtgct gaccgaggcc ggcttcggca   1140
gcgacctggg tgcggagaag ttcttcgaca tcaagtcccg cgccgggtggc etcgacgtcg   1200
ccgcaacggc cgtggtggcc accatccgct cgctaaagca caacggcgat tccgtactaa   1260
aggccggttt ggccaacctg gagcgccacg tcagcaacat tcgcaagttc ggcgtggaac   1320

```

ES 2 517 394 T3

ccgtggtegc gctaaacctg tttaaactctg acaccgccac cgagcgcgct caggtcgccg 1380  
 actggggcga gcagttcggc gtccgcgtgg tggagtgcaa cgtgtgggcc gagggcggtg 1440  
 ccggcgcgac cgatctggcc tctgcggtgc tggaggctgt tgatggtgtt tctgatgagg 1500  
 acgccccag ctccagccac cagatctatc agccggtcga tgggtgtgaa gccaccttgc 1560  
 gcacacttgc cacggagatc tacggcgcgg cggacgtaca gttcggcccg caggctctga 1620  
 aggacctggc gtttctgaag gataacggct gggacaagct gccgggtgtc gtgtcgaaga 1680  
 cgcagtaact cttcagcgat gaccctagcg cgtcgggcgc gccaaagcggc cacaccctgc 1740  
 acgtccgcga gctggtacca cgtatcggtg ccggattcgt ggtggcactc accggcgatg 1800  
 tgatgactct gccgggctcg ccgaagaaac ccgcgccga gcgcattgat gtgaacgcgc 1860  
 agggggttat ctccgggctg ttctaactca gaccgggat ttaaactcgt agcgggctgc 1920  
 taaaggaagc ggaacacgta gaaagccagt ccgcagaaac ggtgctgacc ccggatgaat 1980  
 gtcagctact gggctatctg gacaaggaa aacgcaagcg caaagagaaa gcaggtagct 2040  
 tgcagtgggc ttacatggcg atagctagac tgggcggttt tatggacagc aagcgaaccg 2100  
 gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaa gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg 2160  
 gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc aggggatcaa gatctgatca agagacagga 2220  
 tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg 2280  
 gtggagagggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc 2340  
 gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccc gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt 2400  
 gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcggt 2460  
 ccttgccgag ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggt gctattgggc 2520  
 gaagtgccgg ggcagatct cctgtcatct caccttctc ctgccgagaa agtatccatc 2580  
 atggtgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac 2640  
 caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag 2700  
 gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggetcaag 2760  
 gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacctatg gcgatgcctg cttgccgaat 2820  
 atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga ttcatcgact gtggccggt ggggtgtggcg 2880  
 gaccgctatc aggacatagc gttggetacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa 2940  
 tgggtgacc gcttcctcgt gctttacggg atcgccgctc ccgattcgca gcgcatgcc 3000  
 ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc 3060  
 aagcgacgcc caacctgcc tcaagagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt 3120  
 tgggettcgg aatcgtttcc cgggacgcc gctggatgat cctccagcgc ggggatctca 3180  
 tgctggagtt cttcgcaccac gctagcggcg cgccggccgg cccgggtgtga aataccgcac 3240

ES 2 517 394 T3

agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg cttcctcgcct cactgactcg 3300  
 ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg 3360  
 ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag 3420  
 gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac 3480  
 gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga 3540  
 taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctggtccgac cctgccgctt 3600  
 accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc 3660  
 tgtaggtatc tcagttcggc gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct 3720  
 cccggtcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta 3780  
 agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcggaggtat 3840  
 gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca 3900  
 gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct 3960  
 tgatccggca acaaaaccac cgetggtagc ggtggttttt ttgtttcaa gcagcagatt 4020  
 acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct 4080  
 cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaa aaggatcttc 4140  
 acctagatcc ttttaaaggc cggccgcggc cgccatcggc attttctttt gcgtttttat 4200  
 ttgtaactg ttaattgtcc ttgttcaagg atgctgtctt tgacaacaga tgttttcttg 4260  
 cctttgatgt tcagcaggaa gctcggcgca aacggtgatt gtttgtctgc gtagaatcct 4320  
 ctgtttgta tatagcttgt aatcacgaca ttgtttcctt tcgcttgagg tacagcgaag 4380  
 tgtgagtaag taaaggttac atcgtttaga tcaagatcca tttttaacac aaggccagtt 4440  
 ttgttcagcg gcttgatgg gccagttaaa gaattagaaa cataaccaag catgtaaata 4500  
 tcgttagacg taatgccgtc aatcgtcatt tttgatccgc gggagtcagt gaacaggtac 4560  
 catttgccgt tcattttaaa gacgttcgcg cgttcaattt catctgttac tgtgtagat 4620  
 gcaatcagcg gtttcatcac ttttttcagt gtgtaatcat cgtttagctc aatcataaccg 4680  
 agagcggcgt ttgctaactc agccgtgcgt tttttatcgc tttgcagaag tttttgactt 4740  
 tcttgacgga agaatgatgt gcttttgcca tagtatgctt tgttaaataa agattcttcg 4800  
 ccttggtagc catcttcagt tccagtgttt gttcaaata ctaagtattt gtggccttta 4860  
 tcttctacgt agtgaggatc tctcagcgtg tggttgtcgc ctgagctgta gttgccttca 4920  
 tcgatgaact gctgtacatt ttgatacgtt tttccgtcac cgtcaaagat tgatttataa 4980  
 tcctctacac cgttgatggt caaagagctg tctgatgctg atacgttaac ttgtgcagtt 5040  
 gtcagtgttt gtttgccgta atgtttaccg gagaaatcag tgtagaataa acggattttt 5100  
 ccgtcagatg taaatgtggc tgaacctgac cattcttggt tttggctctt taggatagaa 5160  
 tcatttgcat cgaatttgtc gctgtcttta aagacgcggc cagcgttttt ccagctgtca 5220

ES 2 517 394 T3

atagaagttt cgccgacttt ttgatagaac atgtaaactg atgtgtcatc cgcattttta 5280  
 ggatctccgg ctaatgcaaa gacgatgtgg tagccgtgat agtttgcgac agtgccgtca 5340  
 gcgttttgta atggccagct gtcccaaacg tccaggcett ttgcagaaga gatattttta 5400  
 attgtggacg aatcaaatc agaaacttga tatttttcat ttttttctg ttcagggatt 5460  
 tgcagcatat catggcgtgt aatatgggaa atgccgtatg tttccttata tggcttttgg 5520  
 ttcgtttctt tcgcaaacgc ttgagttgcg cctcctgccg gcagtgcggt agtaaagggt 5580  
 aatactgttg cttgttttgc aaactttttg atgttcatcg ttcattgtctc cttttttatg 5640  
 tactgtgta gcggtctgct tcttccagcc ctctgtttg aagatggcaa gttagttacg 5700  
 cacaataaaa aaagacctaa aatatgtaag gggtgacgcc aaagtataca ctttgcctt 5760  
 tacacatttt aggtcttgcc tgctttatca gtaacaaacc cgcgcgattt acttttcgac 5820  
 ctcatctat tagactctcg tttggattgc aactggctca ttttctctt ttgtttgata 5880  
 gaaaatcata aaaggatttg cagactacgg gcctaaagaa ctaaaaaatc tatctgtttc 5940  
 ttttctctt ctgtattttt tatagtttct gttgcatggg cataaagttg cttttttaat 6000  
 cacaattcag aaaatatcat aatatctcat ttcactaaat aatagtgaac ggcaggtata 6060  
 tgtgatgggt taaaaaggat cggcggccgc tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg 6120  
 ggcccgggtac ca 6132

<210> 50

<211> 5288

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Plásmido pH670 int sacB delta desformilasa

<400> 50

atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta 60  
 acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta 120  
 actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgccc tctgctgaag ccagttacct 180  
 tcggaaaaag agttggtagc tottgatccg gcaacaaaac caccgctggt agcggtggtt 240  
 tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga 300  
 tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgtaagggt attttggtca 360  
 tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa ggccggccgc ggccgccatc 420  
 ggcattttct tttgcgttt tatttgtaa ctgttaattg tccttgttca aggatgctgt 480  
 cttgacaac agatgtttc ttgcctttga tggtcagcag gaagctcggc gcaaacgttg 540  
 attgtttgct tgcgtagaat cctctgtttg tcatatagct tgtaateacg acattgtttc 600  
 ctttcgcttg aggtacagcg aagtgtgagt aagtaaagggt tacatcgta ggatcaagat 660

ES 2 517 394 T3

ccathttttaa cacaaggcca gttttgttca gcggcttgta tgggccagtt aaagaattag 720  
 aaacataacc aagcatgtaa atatcgttag acgtaatgcc gtcaatcgtc atttttgatc 780  
 cgcgggagtc agtgaacagc taccatttgc cgttcatttt aaagacgttc gcgcggtcaa 840  
 tttcatctgt tactgtgta gatgcaatca gcggtttcat cacttttttc agtgtgtaat 900  
 catcgtttag ctcaatcata ccgagagcgc cgtttgctaa ctcagccgtg cgttttttat 960  
 cgctttgcag aagtttttga ctttcttgac ggaagaatga tgtgcttttg ccatagtatg 1020  
 ctttgtaaa taaagattct tcgccttggc agccatcttc agttccagtg tttgcttcaa 1080  
 atactaagta tttgtggcct ttatcttcta cgtagtggg atctctcagc gtatggttgt 1140  
 cgcctgagct gtagttgcct tcacgatga actgctgtac attttgatac gttttccgct 1200  
 caccgtcaaa gattgattta taatcctcta caccgttgat gttcaaagag ctgtctgatg 1260  
 ctgatacgtt aaactgtgca gttgtcagtg tttgtttgcc gtaatgttta ccggagaaat 1320  
 cagtgtagaa taaacggatt tttccgtcag atgtaaagt ggctgaacct gaccattctt 1380  
 gtgtttggtc ttttaggata gaatcatttg catcgaatth gtcgctgtct ttaaagacgc 1440  
 ggcacagcgt tttccagctg tcaatagaag tttcgccgac tttttgatag aacatgtaa 1500  
 tcgatgtgtc atccgcattt ttaggatctc cggetaatgc aaagacgatg tggtagccgt 1560  
 gatagtttgc gacagtgccg tcagcgtttt gtaatggcca gctgtcccaa acgtccaggc 1620  
 cttttgcaga agagatattt ttaattgtgg acgaatcaaa ttcagaaact tgatattttt 1680  
 ctttttttg ctgttcaggc atttgacga tatcatggcg tgtaatatgg gaaatgccgt 1740  
 atgtttcctt atatggcttt tggttcgttt ctttcgcaaa cgcttgagtt gcgcctcctg 1800  
 ccagcagtc ggtagtaaag gtaataactg ttgcttgttt tgcaaaactt ttgatgttca 1860  
 tcgttcatgt ctctttttt atgtactgtg ttagcgtct ctttcttcca gccctcctgt 1920  
 ttgaagatg caagttagtt acgcacaata aaaaaagacc taaaatatgt aaggggtgac 1980  
 gccaaagtat aacttttgc ctttacacat tttaggtctt gcctgcttta tcagtaacaa 2040  
 acccggcga tttacttttc gacctcattc tattagactc tcgtttggat tgcaactggt 2100  
 ctattttctt cttttgtttg atagaaaatc ataaaaggat ttgcagacta cgggcctaaa 2160  
 gaactaaaa atctatctgt ttcttttcat tctctgtatt ttttatagtt tctgttgcac 2220  
 gggcataaag ttgccttttt aatcacaatt cagaaaatat cataatatct catttcaacta 2280  
 aataatagt aacggcaggt atatgtgatg ggttaaaaag gatcggcggc cgctcgattt 2340  
 aaatctcag aggcctgacg tcgggcccgg taccacgcgt aacgcattca ctgcagtcac 2400  
 aattgcttca tcaactcaaa cagctgtttc gaggatgaat ttcagcacca caggagatgg 2460  
 aacagcctcc ctgattgcca caatttctg cagcaaccta ttggcatctc cctctttcac 2520  
 taccgcaata tccaaaacaa catctacttc ggaagctccg gactgtacgg caaggcgcgc 2580  
 ttcggcggct ttcaccaacg cgggggtttt gccgtgcggg aatcctgcga cgggtggccac 2640

ES 2 517 394 T3

tcgaattcca gcttcttggg ettttgcagt taggttgacc atgctggtgg ggacacagat 2700  
 cgtgccgact cccagctcaa ttgcggaatc tataaatgcg gccagttcgg agttggttac 2760  
 ttctgggtccg aggagggtgt agtcaaggat ttggggccatg gtggagcggg aaatcgctcat 2820  
 atccataccc tacttagacc tgacttagtg tgggaaaatt tccagggtag aatgcaacga 2880  
 ggctttttgc ttttcgacgc gaccctaaac aaatgagacc taccgaggg taggtctcat 2940  
 ttgttttggtg tttagtctgt ggtggtttcg cgtagttttt ctgcttaat aaacagcaag 3000  
 agaagcagcg cgatgccgat cagtggcacc atcacgtaga acaactgggat gagtgcgtcg 3060  
 ttgtaggaac cggcgaacgc atcgtggagc gcggttgca attgattgac gattgccggc 3120  
 gtcaattcgt tggagtccag tccgccttg gctgccatgg cggttgttc ttctggtgaa 3180  
 agttgtgcca tggctgctgg cattctttct tccatgaggg ttccaagt gccaacgaac 3240  
 atgccaccga ccagcgcgga tccgagtgag gaaccgattt gacggaagaa gttgttcaca 3300  
 gcggttgccg atccgaccac cgcggttggc aggggtttct gaacgatcag gaccagaacc 3360  
 tgcattggcta gaccgtcgac atcgtatgctc ttctgcgta attaacaatt gggatcctct 3420  
 agaccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag 3480  
 tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaagggg 3540  
 aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 3600  
 ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 3660  
 ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg 3720  
 caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga ttgaacaaga 3780  
 tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 3840  
 acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc 3900  
 ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 3960  
 gcggctatcg tggctggcca cgacgggctg tccttgcgca gctgtgctcg acgttgctac 4020  
 tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 4080  
 tcaccttctc cctgcccaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 4140  
 gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcagcacg 4200  
 tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 4260  
 cgcgccagcc gaactgttcg ccaggtcaa ggcgcgatg cccgacggcg aggatctcgt 4320  
 cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg 4380  
 attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 4440  
 ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgttctctcg tgctttacgg 4500  
 taticcgcct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 4560

ES 2 517 394 T3

agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 4620  
 ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 4680  
 ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc 4740  
 gcgcggcccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 4800  
 gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgctcggc tgcggcgagc 4860  
 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 4920  
 aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcggttgc 4980  
 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 5040  
 gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 5100  
 cgtgcgctct cctgttccga ccctgcgct taccggatac ctgtccgcct ttctccctc 5160  
 gggaaagcgtg gcgctttctc atagctcacc ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt 5220  
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc 5280  
 cggtaaact 5288

<210> 51

<211> 1689

<212> ADN

5 <213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 51

atgactaact cttctgcaac cagcaatccc caaccagcgc acgtcgaaat cgcacaggcc 60  
 cactccctgg agcccacac cacgatcggc gagcgcgccg gcacccgga gcccgcttg 120  
 attccctacg gccgcacaaa ggccaagatc gacgttcccg ctctgcgggc ggagcgtgag 180  
 ggcgtcaata gaaagggcaa gctcgtgctc gtgaccgcaa tgagcccgac ccccgcggt 240  
 gaaggcaagt ccacgggtgc gatcggcttg gcggacgcgg tgcgcacggc agggcgccag 300  
 acgatggtgg cgatccgca gccgtcccag gggccggtca tgggcatcaa gggcgcgct 360  
 gctggcggcg gttatgogca gatcgtgccg atggaagaca ttaacctgca cttcacaggc 420  
 gacatgcacg ccatcaccgc cgcgacgaac actctggcgg cgatggtgga caaccacgtg 480  
 cagcacggca atgctctggg catcgacccg cggcgggtga cgtggcggcg ctgcctggac 540  
 gtcaacgacc gctcgtcgcg ccatgtggtc acaggcctag gcggccctgg tcagggcacg 600  
 ccccgcgagg gcggattcga taccacggcg gccagcgaga tcatggetat cctctgtctg 660  
 gccaccgacc tggaagatct aaagaagcgc atcgggcgca tcgtggtggg ccaaacttat 720  
 gatcgcaagc cagtcaccgc gggcgacctg aagtgcgcgg gcgctatcac cggcctgctg 780  
 cgcgatgcga tcaaccgaa cctagtgcag accctgggtg gcacccccgc actggtgcac 840  
 ggtgggcctt tcgccaacat cgcgcaacga tgcaactcgc tgatcgcaac caccacggcg 900  
 ctggacctgt cggaggttgt gctgaccgag gccggcttcg gcagcgacct gggcgcgag 960

ES 2 517 394 T3

aagttcttcg acatcaagtc ccgcccgggt ggctctgacg tcgcccgaac ggtcgtggtg 1020  
 gccaccatcc gctcgtataa gcacaacggc gattccgtac taaaggccgg tttggccaac 1080  
 ctggagcgc acgtcagcaa cattcgcaag ttcggcgtgg aaccctggtg cgcgctaaac 1140  
 ctgtttaact ctgacaccgc caccgagcgc gctcaggtcg ccgactgggg cgagcagttc 1200  
 ggcgtcccgc tgggtggagt caacgtgtgg gccgagggcg gtgccggcgc gaccgatctg 1260  
 gcctctgcgg tgctggaggt cgttgatggt gtttctgatg aggacgcccc cagctccagc 1320  
 caccgatct atcagccggt cgtggtgtg gaagccacct tgcgcacact tgccacggag 1380  
 atctacggcg cggcggacgt acagttcggc ccgaggctc tgaaggacct ggcgtttctg 1440  
 aaggataacg gctgggacaa gctgccggtg tgcgtgtcga agacgcagta ctccttcagc 1500  
 gatgacccta gcgcgctggg cgcgccaagc ggccacaccc tgcacgtccg cgagctggta 1560  
 ccacgtatcg gtgccggatt cgtggtggca ctcaccggcg atgtgatgac tctgccgggc 1620  
 ctgccgaaga aaccgcgggc cgagcgcatg gatgtgaacg cgcagggggt tatctcgggg 1680  
 ctgttctaa 1689

<210> 52

<211> 562

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 52

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

ES 2 517 394 T3

Val Pro Met Glu Asp Ile Asn Leu His Phe Thr Gly Asp Met His Ala  
 130 135 140

Ile Thr Ala Ala Thr Asn Thr Leu Ala Ala Met Val Asp Asn His Val  
 145 150 155 160

Gln His Gly Asn Ala Leu Gly Ile Asp Pro Arg Arg Val Thr Trp Arg  
 165 170 175

Arg Cys Leu Asp Val Asn Asp Arg Ser Leu Arg His Val Val Thr Gly  
 180 185 190

Leu Gly Gly Pro Gly Gln Gly Thr Pro Arg Glu Gly Gly Phe Asp Ile  
 195 200 205

Thr Ala Ala Ser Glu Ile Met Ala Ile Leu Cys Leu Ala Thr Asp Leu  
 210 215 220

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

Asp Arg Lys Pro Val Thr Ala Gly Asp Leu Lys Cys Ala Gly Ala Ile  
 245 250 255

Thr Ala Leu Leu Arg Asp Ala Ile Asn Pro Asn Leu Val Gln Thr Leu  
 260 265 270

Gly Gly Thr Pro Ala Leu Val His Gly Gly Pro Phe Ala Asn Ile Ala  
 275 280 285

His Gly Cys Asn Ser Leu Ile Ala Thr Thr Thr Ala Leu Asp Leu Ser  
 290 295 300

Glu Val Val Leu Thr Glu Ala Gly Phe Gly Ser Asp Leu Gly Ala Glu  
 305 310 315 320

Lys Phe Phe Asp Ile Lys Ser Arg Ala Gly Gly Leu Asp Val Ala Ala  
 325 330 335

Thr Val Val Val Ala Thr Ile Arg Ser Leu Lys His Asn Gly Asp Ser  
 340 345 350

Val Leu Lys Ala Gly Leu Ala Asn Leu Glu Arg His Val Ser Asn Ile  
 355 360 365

Arg Lys Phe Gly Val Glu Pro Val Val Ala Leu Asn Leu Phe Asn Ser  
 370 375 380

ES 2 517 394 T3

Asp Thr Ala Thr Glu Arg Ala Gln Val Ala Asp Trp Gly Glu Gln Phe  
385 390 395 400

Gly Val Arg Val Val Glu Cys Asn Val Trp Ala Glu Gly Gly Ala Gly  
405 410 415

Ala Thr Asp Leu Ala Ser Ala Val Leu Glu Val Val Asp Gly Val Ser  
420 425 430

Asp Glu Asp Ala Pro Ser Ser Ser His Gln Ile Tyr Gln Pro Val Asp  
435 440 445

Gly Val Glu Ala Thr Leu Arg Thr Leu Ala Thr Glu Ile Tyr Gly Ala  
450 455 460

Ala Asp Val Gln Phe Gly Pro Gln Ala Leu Lys Asp Leu Ala Phe Leu  
465 470 475 480

Lys Asp Asn Gly Trp Asp Lys Leu Pro Val Cys Val Ser Lys Thr Gln  
485 490 495

Tyr Ser Phe Ser Asp Asp Pro Ser Ala Leu Gly Ala Pro Ser Gly His  
500 505 510

Thr Leu His Val Arg Glu Leu Val Pro Arg Ile Gly Ala Gly Phe Val  
515 520 525

Val Ala Leu Thr Gly Asp Val Met Thr Leu Pro Gly Leu Pro Lys Lys  
530 535 540

Pro Ala Ala Glu Arg Ile Asp Val Asn Ala Gln Gly Val Ile Ser Gly  
545 550 555 560

Leu Phe

## REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de L-metionina en una corinebacteria, seleccionada del grupo que consiste en la especie *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* y *Corynebacterium efficiens*, en el que la corinebacteria se obtiene mediante modificación genética a partir de un organismo de partida productor de metionina que es una corinebacteria de tipo salvaje o una corinebacteria que ya posee alteraciones genéticas en comparación con la corinebacteria de tipo salvaje, de manera que la actividad enzimática de un sistema de escisión de glicina (GCS) está incrementado en dicho microorganismo en comparación con el organismo de partida, y en el que la cantidad y/o actividad de ácido lipoico sintasa (*lipA*), lipoil tansferasa (*lipB*) o *lipA* y *lipB* están incrementadas en dicha corinebacteria en comparación con el organismo de partida.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la corinebacteria se obtiene mediante modificación genética de un organismo de partida de manera que la cantidad y/o actividad de glicina descarboxilasa dependiente de PLP (*gcvP*), enzima sintetizadora de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno-THF (*gcvT*) y aminometil transferasa que contiene lipoamida (*gcvH*) están incrementadas en dicho microorganismo en comparación con el organismo de partida.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que las secuencias codificantes para *gcvP*, *gcvT*, *gcvH*, *lipA* y *lipB* son de *C. jeikeium*.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las secuencias codificantes para *gcvP*, *gcvT*, *gcvH*, *lipA* y *lipB* son de *E. coli*.
5. Corinebacteria seleccionada del grupo que consiste en la especie *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* y *Corynebacterium efficiens*, en la que dicha corinebacteria se obtiene mediante modificación genética a partir de un organismo de partida productor de metionina que es una corinebacteria de tipo salvaje o una corinebacteria que ya posee alteraciones genéticas en comparación con la corinebacteria de tipo salvaje, de manera que la actividad enzimática de un sistema de escisión de glicina (GCS) está incrementada en dicha corinebacteria en comparación con el organismo de partida, y en la que la cantidad y/o actividad de *lipA*, *lipB* o *lipA* y *lipB* están incrementadas en dicha corinebacteria en comparación con el organismo de partida.
6. Corinebacteria según la reivindicación 5, en la que la corinebacteria es una cepa de *C. glutamicum*.
7. Corinebacteria según las reivindicaciones 5 ó 6, en el que la corinebacteria se obtiene mediante modificación genética a partir de un organismo de partida de manera que la cantidad y/o actividad de *gcvP*, *gcvT* y *gcvH* están incrementadas en dicha corinebacteria en comparación con el organismo de partida.
8. Corinebacteria según la reivindicación 7, en la que las secuencias codificantes para *gcvP*, *gcvT*, *gcvH*, *lipA* y *lipB* son de *C. jeikeium*.
9. Corinebacteria según la reivindicación 7, en la que las secuencias codificantes para *gcvP*, *gcvT*, *gcvH*, *lipA* y *lipB* son de *E. coli*.

