



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 942**

51 Int. Cl.:
C12P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06800107 .2**

96 Fecha de presentación : **18.07.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1907558**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Uso de disulfuro de dimetilo para la producción de metionina en microorganismos.**

30 Prioridad: **18.07.2005 US 700698 P**
01.09.2005 US 713907 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2011

73 Titular/es: **EVONIK DEGUSSA GmbH**
Rellinghauser Strasse 1- 11
45128 Essen, DE

72 Inventor/es: **Zelder, Oskar;**
Haefner, Stefan;
Herold, Andrea;
Klopprogge, Corinna;
Schroder, Hartwig;
Yocum, R., Rogers y
Williams, Mark, K.

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 355 942 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

Uso de disulfuro de dimetilo para la producción de metionina en microorganismos.

5 **Antecedentes de la invención**

Metionina se produce actualmente en forma de una mezcla racémica de DL-metionina por un proceso químico bien establecido que implica materiales o compuestos intermedios tóxicos, peligrosos, inflamables, inestables y nocivos. Los materiales de partida para la producción química de metionina son acroleína, metilmercaptano y cianuro de hidrógeno. La síntesis química de metionina implica la reacción de metilmercaptano y acroleína, para producir el compuesto intermedio 3-metilmercaptopropionaldehído (MMP). El tratamiento ulterior implica hacer reaccionar MMP con cianuro de hidrógeno para formar 5-(2-metiltoetil)hidantoina, que luego se hidroliza utilizando productos cáusticos tales como NaOH, junto con Na₂CO₃, NH₃ y CO₂. Subsiguientemente, DL-metionina sódica se neutraliza con ácido sulfúrico y Na₂CO₃ para proporcionar DL-metionina, Na₂SO₄ y CO₂. Este proceso proporciona un gran exceso de compuestos no utilizados en comparación con la cantidad de metionina producida, que plantea un reto económico y ecológico.

Procesos fermentativos para la producción de metionina se basan típicamente en el cultivo de microorganismos con nutrientes que incluyen fuentes de hidratos de carbono, p. ej. azúcares tales como glucosa, fructosa o sacarosa, fuentes de nitrógeno, p. ej. amoníaco y fuentes de azufre, p. ej. sulfato o tiosulfato junto con otros componentes del medio necesarios. Este proceso proporciona L-metionina y biomasa como un subproducto sin materiales de partida tóxicos, peligrosos, inflamables, inestables y/o nocivos.

Sin embargo, con el fin de que un organismo (p. ej. un microorganismo) produzca metionina a partir de sulfato en calidad de fuente de azufre, el átomo de azufre debe de ser reducido primeramente en sulfuro. Este proceso consume energía, de modo que la alimentación de una fuente de azufre al microorganismo, que es más reducida que el sulfato, mejoraría el proceso. Una fuente de azufre reducida de este tipo es tiosulfato, en el que uno de los dos átomos de azufre ya está reducido. Otra fuente de azufre reducido es metano-tiol, que contiene un átomo de azufre totalmente reducido.

J. Mampel *et al.* describen en Appl. Microbiol. Biotechnol. (2005) 68: 228-236, publicado en línea el 25 de enero del 2005, que la inactivación de NCgI2640 daba como resultado una producción significativamente incrementada de metionina. Utilizando fusiones *lacZ* promotoras de genes implicados en el metabolismo del azufre, demostraron el alivio de la represión de L-metionina en el mutante NCgI2640 para la cisteína sintasa, *o*-acetilhomoserina sulfhidrilasa (*metY*) y sulfito reductasa. La complementación de la cepa mutante con NCgI2640 portador de plásmidos restauraba el fenotipo de tipo salvaje para *metY* y sulfito reductasa.

El uso de metano-tiol para la producción de metionina ofrece dos ventajas. La primera, como se ha mencionado antes, el átomo de azufre ya está reducido. La segunda, se suministra un grupo metilo que podría eludir potencialmente la necesidad de dos de las enzimas que normalmente se requieren para la biosíntesis de metionina, metiltetrahidrofolato reductasa (MetF) y metionina sintasa (MetE y/o MetH). Existen informes en la bibliografía que describen que algunos microorganismos, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, pueden incorporar enzimáticamente metano-tiol directamente en metionina, haciéndola reaccionar con *O*-acetil homoserina (Yamagata, S. 1971, *J. Biochem.* (Tokyo) 70:1035). Métodos para el uso de metano-tiol en la producción de metionina se describen también en los documentos WO 93/17112 y WO 2004/076659.

Sin embargo, el uso de metano-tiol para la producción de metionina tiene también inconvenientes. Es un gas explosivo y tóxico que se oxida fácilmente en el aire, y es nocivo. El proceso químico para producir metionina también utiliza metano-tiol como uno de los sustratos, de manera que los ingenieros han aprendido a manipular el compuesto a escala industrial. No obstante, serían de gran beneficio procedimientos mejorados para la producción de metionina que no utilicen metano-tiol.

55 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para la producción de metionina. Los autores de la presente invención han descubierto una fuente de grupos azufre y/o metilo distinta de metano-tiol que puede utilizarse para la producción de metionina. En particular, los autores de la presente invención han descubierto que disulfuro de dimetilo (DMDS - siglas en inglés), al que también se alude como disulfuro de metilo o CH₃-S-S-CH₃, se puede añadir a medios de cultivo y utilizar por parte de un microorganismo como una fuente tanto de un grupo sulfuro como de un grupo metilo, eludiendo la necesidad de una actividad MetH/MetE y MetF y la necesidad de reducir el sulfato para la síntesis de metionina.

Además, la presente invención demuestra que un microorganismo que tiene una vía de biosíntesis de metionina desregulada, p. ej. una *O*-acetil-homoserina sulfhidrilasa desregulada y/o una homoserina acetiltransferasa desregulada y/o una homoserina deshidrogenasa desregulada, puede utilizar un compuesto de sulfuro rematado con metilo, p. ej. una fuente de un grupo azufre y/o metilo, p. ej. disulfuro de dimetilo (DMDS), para la síntesis de metionina. Además, los autores de la invención han descubierto que la producción de metionina mediante cepas prototró-

ES 2 355 942 T3

ficas tratadas mediante ingeniería genética que acumulan *O*-acetil-homoserina, es mejorada mediante la adición de DMDS.

5 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención ofrece un método para la producción de metionina, que comprende cultivar un microorganismo en presencia de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* disulfuro de dimetilo (DMDS), de manera que se produce metionina. En una realización, el compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, está presente en el cultivo a una concentración de 0,02% o superior. En otra realización, el compuesto de sulfuro rematado por metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, está presente en el cultivo a una concentración de 0,06% o mayor. En otras realizaciones, el compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* la fuente de azufre y/o metilo, se selecciona del grupo que consiste en trisulfuro de dimetilo (DMTS - siglas en inglés) o $\text{CH}_3\text{-S-S-S-CH}_3$, tetrasulfuro de dimetilo (DMTTS - siglas en inglés) o $\text{CH}_3\text{-S-S-S-S-CH}_3$.

15 Otro aspecto de la invención ofrece un método para producir metionina, que comprende cultivar un microorganismo productor de metionina en presencia de un sistema de suministro de sulfuro rematado con metilo de liberación lenta, *p. ej.* un sistema de suministro de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* un sistema de suministro de disulfuro de dimetilo (DMDS), de manera que se produce metionina. En una realización, el sistema de suministro de sulfuro rematado con metilo de liberación lenta, *p. ej.* un sistema de suministro de azufre y/o metilo de liberación lenta, *p. ej.* un sistema de suministro de DMDS de liberación lenta es Amberlite™ XAD4. En una realización, el sistema de suministro de liberación lenta libera DMDS a una concentración que totaliza 0,1% o mayor en el medio de cultivo. Todavía en otra realización, el sistema de suministro de liberación lenta libera DMDS a una concentración que totaliza 0,3% o mayor en el medio de cultivo. En una realización, el sistema de suministro de DMDS de liberación lenta comprende un líquido que es inmiscible con agua, pero que disuelve DMDS. En una realización, el sistema de suministro de sulfuro rematado con metilo de liberación lenta, *p. ej.* un sistema de suministro de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* un sistema de suministro de DMDS de liberación lenta, comprende un líquido seleccionado del grupo que consiste en aceites animales, aceites minerales, aceites químicos, aceites vegetales, aceites sintéticos, un disolvente orgánico, clorocarburos, fluorocarburos, cloro-fluoro-carburos, o combinaciones de los mismos. En otra realización, el sistema de suministro de sulfuro rematado con metilo de liberación lenta, *p. ej.* el sistema de suministro de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* un sistema de suministro de DMDS de liberación lenta, comprende un líquido que es inmiscible con agua, pero que disuelve el compuesto disulfuro rematado con metilo, *p. ej.* la fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS. Todavía en otra realización, el sistema de suministro de sulfuro rematado por metilo de liberación lenta, *p. ej.* el sistema de suministro de un grupo de azufre y/o metilo, *p. ej.* un sistema de suministro de liberación lenta de DMDS, es una alimentación lenta controlada de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* una alimentación de DMDS lenta controlada. En otra realización, el sistema de suministro de sulfuro rematado con metilo de liberación lenta, *p. ej.* el sistema de suministro de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* el sistema de suministro de DMDS de liberación lenta, es una membrana que es permeable a un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS. En otra realización, el sistema de liberación lenta de DMDS está suministrando DMDS en un estado gaseoso, por ejemplo al evaporar o calentar hasta ebullición DMDS líquido o, por ejemplo, burbujando aire u oxígeno a través de DMDS líquido en su recorrido al recipiente de fermentación. En una realización, el microorganismo productor de metionina pertenece al género *Corynebacterium*. En otra realización, el microorganismo productor de metionina es *Corynebacterium glutamicum*. Todavía en otra realización, el microorganismo productor de metionina se selecciona del grupo que consiste en bacterias Gram-negativas (*p. ej.* *Escherichia coli* o enterobacterias relacionadas), bacterias Gram-positivas (*p. ej.* *Bacillus subtilis* o bacilos relacionados), levaduras (*p. ej.* *Saccharomyces cerevisiae* o cepas de levaduras relacionadas), y Archaea.

La invención está dirigida a un método para producir metionina, que comprende cultivar un microorganismo productor de metionina en presencia de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, de manera que se produce metionina, en el que

- 50 a) el compuesto de sulfuro rematado con metilo se selecciona del grupo que consiste en disulfuro de dimetilo (DMDS), trisulfuro de dimetilo, tetrasulfuro de dimetilo,
- 55 b) el microorganismo productor de metionina se selecciona del grupo que consiste en bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas, levaduras y Archaea,
- c) el microorganismo productor de metionina tiene al menos una enzima biosintética de metionina desregulada, seleccionada del grupo que consiste en
- 60 c1) una *O*-acetil-homoserina sulfhidrilasa u *O*-succinil-homoserina sulfhidrilasa desregulada
- c2) una homoseriniana acetiltransferasa u homoseriniana succiniltransferasa desregulada y una homoseriniana deshidrogenasa desregulada
- 65 c3) una *O*-acetil-homoserina sulfhidrilasa desregulada y una homoseriniana acetiltransferasa desregulada o una *O*-succinil-homoserina sulfhidrilasa desregulada y una homoseriniana succiniltransferasa desregulada.

Otro aspecto de la invención ofrece un método para producir metionina, que comprende cultivar un microorganismo que tiene una vía biosintética de metionina desregulada, en presencia de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* disulfuro de dimetilo (DMDS), de modo que se produce metionina. En una realización, el microorganismo pertenece al género *Corynebacterium*. En otra realización, el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum*. Todavía en otra realización, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en bacterias Gran-negativas (*p. ej.* *Escherichia coli* o enterobacterias relacionadas), bacterias Gram-positivas (*p. ej.* *Bacillus subtilis* o bacilos relacionados), levaduras (*p. ej.* *Saccharomyces cerevisiae* o cepas de levaduras relacionadas), y Archaea.

Otro aspecto de la descripción ofrece un microorganismo recombinante para la producción de metionina en presencia de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* disulfuro de dimetilo (DMDS), teniendo dicho microorganismo una vía biosintética de metionina desregulada. En un aspecto, el microorganismo pertenece al género *Corynebacterium*. En otro aspecto, el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum*. Todavía en otro aspecto, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en bacterias Gran-negativas (*p. ej.* *Escherichia coli* o enterobacterias relacionadas), bacterias Gram-positivas (*p. ej.* *Bacillus subtilis* o bacilos relacionados), levaduras (*p. ej.* *Saccharomyces cerevisiae* o cepas de levaduras relacionadas), y Archaea.

Todavía otro aspecto de la descripción ofrece un método para identificar enzimas *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa y/u *O*-succinilhomoserina sulfhidrilasa resistentes a la retroalimentación por metionina, y/o genes (*p. ej.* genes o alelos mutantes) que codifican dichas enzimas resistentes a la retroalimentación de metionina. En un aspecto, la descripción ofrece un método para identificar un alelo mutante que codifica una *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa u *O*-succinilhomoserina sulfhidrilasa que es resistente a la inhibición de la retroalimentación por parte de metionina, que comprende: a) poner en contacto un microorganismo que depende de DMDS y *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa u *O*-succinilhomoserina sulfhidrilasa codificada por un plásmido, para el crecimiento en un medio exento de metionina con un análogo de metionina que inhibe el crecimiento de dicho microorganismo, b) seleccionar variantes mutantes de dicho microorganismo que son resistentes a dicho análogo, c) aislar dichas variantes mutantes, en donde el fenotipo resistente es codificado por dicho plásmido y d) determinar la secuencia de ADN de la porción relevante de dicho plásmido para identificar plásmidos mutantes que tienen una secuencia alterada en la región codificadora de dicha *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa u *O*-succinilhomoserina sulfhidrilasa. La descripción también ofrece nuevas enzimas *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa u *O*-succinilhomoserina sulfhidrilasa mutantes, aisladas por este método, genes que codifican a dichas enzimas mutantes, así como organismos que contienen a dichas enzimas mutantes.

35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de la vía biosintética de metionina. Las enzimas biosintéticas de metionina se representan en negrilla y sus genes correspondientes se indican en cursivas.

La Figura 2 es una vista esquemática del vector pH273.

La Figura 3 es una vista esquemática del vector pH373.

45 La Figura 4 es una vista esquemática del vector pH304.

La Figura 5 es una vista esquemática del vector pH399.

La Figura 6 es una vista esquemática del vector pH484.

50 La Figura 7 es una vista esquemática del vector pH491.

Las Figuras 8A-8B son representaciones esquemáticas de la estructura del cromosoma de *C. glutamicum* en la región de *metY* antes (8A) y después (8B) de la delección de una parte de *metY* utilizando el plásmido H215.

55 La Figura 9 es una vista esquemática del vector pOM86, un plásmido diseñado para interrumpir el gen *metF* de *C. glutamicum* con una casete de resistencia a espectinomicina.

La Figura 10 es una vista esquemática del vector pH469.

60 La Figura 11 es una vista esquemática del vector pH300.

65 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de métodos mejorados para la producción de metionina. Según se describe en esta memoria, la producción de metionina por métodos químicos utiliza actualmente productos químicos nocivos y peligrosos tales como metano-tiol, como una fuente de azufre. Se ha des-

ES 2 355 942 T3

5 cubierto que para la producción biosintética de metionina se puede utilizar una fuente de azufre menos peligrosa y nociva. En particular, los autores de la presente invención han descubierto que un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* disulfuro de dimetilo (DMDS), al que también se alude como disulfuro de metilo, se puede añadir a un medio de cultivo y utilizar por parte de un microorga-
nismo. Según se describe en los ejemplos adjuntos, una cepa $\Delta metF$ o una cepa $\Delta metE \Delta metH$ de *C. glutamicum* puede utilizar un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* disulfuro de dimetilo (DMDS), en calidad de una fuente tanto de un grupo sulfuro como de un grupo metilo, evi-
tando la necesidad de la actividad de MetH/Met E y MetF y la necesidad de reducir el sulfato para la síntesis de metionina.

10 El uso de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* disulfuro de metilo, para la producción de metionina, ofrece la mayoría de las ventajas del metano-tiol, pero no la mayoría de los inconvenientes. DMDS es el dímero disulfuro oxidado de metano-tiol, que es un subproducto relativamente económico de la industria de la destilación del petróleo. Es líquido a la temperatura ambiente, con
15 un punto de ebullición de aproximadamente 109°C. DMDS es apenas soluble en agua; si se añade a un medio de crecimiento, a una concentración de 0,1% o mayor, en particular a una concentración de 0,3% o mayor, gran cantidad del DMDS permanece en forma de un aceite en el fondo o en los lados del recipiente.

20 Además, la presente invención demuestra que MetY (a la que también se alude como MetZ; *O*-acetil-homoserina sulfhidrilasa) es una enzima que incorpora un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo sulfuro y/o metilo, *p. ej.* DMDS, directa o indirectamente en metionina, dado que una cepa $\Delta metF \Delta metB$ de *C. glutamicum* puede utilizar un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, en calidad de una fuente tanto de un grupo sulfuro como de un grupo metilo. Además, la
25 producción de metionina mediante cepas prototróficas tratadas mediante ingeniería genética que acumulan *O*-acetil-homoserina se mejoró mediante la adición de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para la producción de metionina.

30 Con el fin de entender más fácilmente la presente invención, se definen primeramente en esta memoria determinados términos y expresiones.

35 La expresión “vía biosintética de metionina” incluye la vía biosintética que implica enzimas biosintéticas de metionina (*p. ej.* polipéptidos codificados por genes que codifican enzimas biosintéticas), compuestos (*p. ej.* precursores, sustratos, compuestos intermedios o productos), co-factores y similares utilizados en la formación o la síntesis de metionina. La “vía biosintética de metionina” incluye la vía biosintética que conduce a la síntesis de metionina en un microorganismo (*p. ej. in vivo*), así como la vía biosintética que conduce a la síntesis de metionina *in vitro*.

40 La expresión “enzima biosintética de metionina” incluye cualquier enzima utilizada en la formación de un compuesto (*p. ej.* un compuesto intermedio o producto) de la vía biosintética de metionina. “Enzima biosintética de metionina” incluye enzimas implicadas, *p. ej.* en la “vía de transulfuración” y en la “vía de sulfhidrilación directa”, vías alternativas para síntesis de metionina. Por ejemplo, *E. coli* utiliza una vía de transulfuración, mientras que otros microorganismos tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *C. glutamicum* y *B. subtilis* y parientes de estos microorga-
45 nismos han desarrollado una vía de sulfhidrilación directa. A pesar de que muchos microorganismos utilizan la vía de transulfuración o la vía de sulfhidrilación directa, pero no ambas, algunos microorganismos tales como, por ejemplo, *C. glutamicum*, utilizan ambas vías para la síntesis de metionina.

50 “Enzimas biosintéticas de metionina” comprenden todas las enzimas que normalmente se encuentran en microorganismos que contribuyen a la producción de metionina. La Tabla 1 lista diversas enzimas en la vía biosintética de metionina y los correspondientes genes que las codifican, y la Figura 1 muestra una representación esquemática de la vía biosintética de metionina. Ha de entenderse que en algunos microorganismos los nombres de los genes que codifican las correspondientes enzimas pueden variar de los nombres listados en esta memoria.

55

60

65

ES 2 355 942 T3

TABLA 1

Enzimas en la vía biosintética de metionina y los genes que las codifican

Enzima	Gen
Aspartato quinasa	<i>ask</i>
Homoserina deshidrogenasa	<i>hom</i>
Homoserina acetiltransferasa	<i>metX</i>
Homoserina succiniltransferasa	<i>metA</i>
Cistationa γ -sintetasa	<i>metB</i>
Cistationa β -liasa	<i>metC</i>
O-acetilhomoserina sulfhidrilasa	<i>metY</i>
O-succinilhomoserina sulfhidrilasa	<i>metZ</i>
Metionina sintasa dependiente de vitamina B ₁₂	<i>metH</i>
Metionina sintasa independiente de vitamina B ₁₂	<i>metE</i>
N ^{5,10} -metileno-tetrahidrofolato reductasa	<i>metF</i>
S-adenosilmetionina sintasa	<i>metK</i>

De acuerdo con la Figura 1, la síntesis de metionina a partir de oxaloacetato (OAA) discurre a través de los compuestos intermedios aspartato, aspartato fosfato y aspartato semialdehído. El aspartato semialdehído se convierte en homoserina mediante homoserina deshidrogenasa (el producto del gen *hom*, también conocido como *thrA*, *metL*, *hdh*, entre otros nombres en otros organismos). Las subsiguientes etapas en la síntesis de metionina pueden transcurrir a través de la vía de transulfuración y/o la vía de sulfhidrilación directa.

En la vía de transulfuración, la homoserina se convierte en O-acetilhomoserina mediante homoserina acetiltransferasa (el producto del gen *metX*, a veces también denominado *metA*) y la adición de acetil CoA, o en O-succinilhomoserina mediante la adición de succinil CoA mediante el producto de un gen *metA* (homoserina succiniltransferasa). La donación de un grupo azufre procedente de cisteína a O-acetilhomoserina u O-succinilhomoserina por parte de cistationina γ -sintetasa, el producto de un gen *metB*, produce cistationina. Después, cistationina se convierte en homocisteína mediante cistationina β -liasa, el producto de un gen *metC* (al que también se alude como el gen *aecD* en algunos organismos).

En la vía de sulfhidrilación directa, O-acetilhomoserina sulfhidrilasa, el producto de un gen *metY* (al que a veces se alude como el gen *metZ*) cataliza la adición directa de sulfuro a O-acetilhomoserina para formar homocisteína. La homocisteína también se puede formar en la vía de sulfhidrilación directa mediante la adición directa de un grupo sulfuro a O-succinilhomoserina por parte de O-succinilhomoserina sulfhidrilasa, el producto de un gen *metZ*.

Independientemente de la vía que se utilice, la vía de transulfuración o la vía de sulfhidrilación directa, la metionina se produce subsiguientemente a partir de homocisteína mediante la adición de un grupo metilo mediante metionina sintasa dependiente de vitamina B₁₂ (el producto del gen *metH*) o metionina sintasa independiente de vitamina B₁₂ (el producto del gen *metE*). El grupo metilo de metionina es donado por tetrahidrofolato de metilo (metil-THF) que, a su vez, se produce mediante la reducción de metileno-THF en una reacción catalizada por el producto génico *metF*.

I. Métodos para cultivar microorganismos en presencia de disulfuro de dimetilo (DMDS) de modo que se produce metionina y microorganismos recombinantes para uso en los métodos de la invención

En un aspecto, la presente invención ofrece métodos para producir metionina, que comprenden cultivar un microorganismo productor de metionina en presencia de un compuesto sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, preferiblemente disulfuro de dimetilo (DMDS), de modo que se produce L-metionina o una sal de L-metionina. Un “microorganismo productor de metionina” es cualquier microorganismo capaz de producir metionina, *p. ej.* bacterias, levaduras, hongos, Archaea, *etc.* En una realización, el microorganismo productor de metionina pertenece al género *Corynebacterium*. En otra realización, el microorganismo productor de metionina es *Corynebacterium glutamicum*. Todavía en otra realización, el microorganismo productor de metionina se selecciona del grupo que consiste en: bacterias Gram-negativas (*p. ej.* *Escherichia coli* o enterobacterias relacionadas), bacterias Gram-positivas (*p. ej.* *Bacillus subtilis* o bacilos relacionados), levaduras (*p. ej.* *Saccharomyces cerevisiae* o cepas de levaduras relacionadas) y Archaea, *p. ej.* un microorganismo adecuado para uso en los métodos de la invención. En un aspecto, el microorganismo que pertenece al grupo enterobacterias es *Escherichia coli*. En otra realización, el microorganismo que pertenece al género *Bacillus* es *Bacillus subtilis*. Todavía en otra realización, el microorganismo de levadura es *Saccharomyces cerevisiae* o un pariente del mismo.

En más de una realización de la invención, un microorganismo se cultiva en un medio que comprende un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, preferiblemente disulfuro de dimetilo (DMDS). En una realización, un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, está presente en el medio de cultivo a una concentración de 0,02% o mayor. En otra realización, un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, está presente en el medio de cultivo a una concentración de 0,04% o mayor. Todavía en otra realización un compuesto de azufre rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS está presente en el medio de cultivo a una concentración de 0,06% o mayor.

En más de una realización de la invención, el compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* la fuente de un grupo azufre y/o metilo, es trisulfuro de dimetilo o tetrasulfuro de dimetilo, cuyos extremos están rematados con grupos metilo.

En una realización, el compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* la fuente de un grupo azufre y/o metilo, preferiblemente DMDS, se proporciona al cultivo utilizando un sistema de suministro de sulfuro rematado con metilo de liberación lenta, *p. ej.* un sistema de suministro de un grupo azufre y/o metilo de liberación lenta, *p. ej.* un sistema de suministro de disulfuro de dimetilo (DMDS) de liberación lenta. Tal como se utiliza en esta memoria, las frases “sistemas de suministro de sulfuro rematado con metilo de liberación lenta”, “sistema de suministro de un grupo azufre y/o metilo de liberación lenta” y “sistema de suministro de disulfuro de dimetilo (DMDS) de liberación lenta” incluyen cualquier sustancia inerte que se puede añadir a o interrelacionar de otro modo con medios de cultivo, de modo que compuestos orgánicos hidrófobos pequeños tales como un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, se pueden liberar en la fase acuosa, de manera que la concentración en estado estacionario de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, se mantiene a una concentración sub-lethal para el organismo que se esté utilizando. Un “sistema de suministro de sulfuro rematado con metilo de liberación lenta”, *p. ej.* “un sistema de suministro de un grupo de azufre y/o metilo de liberación lenta”, *p. ej.* “un sistema de suministro de disulfuro de dimetilo (DMDS) de liberación lenta”, permite también la liberación prolongada y sostenida de estos compuestos en disolución a lo largo del tiempo a una concentración que no es tóxica para el microorganismo y que no afecta adversamente al desarrollo del propio microorganismo. En una realización, el sistema de suministro de liberación lenta de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS es un líquido que es inmisible con agua, pero que disuelve un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS. En una realización preferida, el sistema de suministro de liberación lenta de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, es una resina de poliestireno macroporosa en forma de perlas, *p. ej.* Amberlite™ XAD4. Amberlite™ XAD4 consiste en perlas insolubles suministradas en forma de un producto humedecido con agua embebido con cloruro de sodio y carbonato de sodio. Antes de la absorción de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, la .Amberlite™ XAD4 se lava con etanol y agua según se recomienda por el fabricante, proporcionando una suspensión en agua. Después de la absorción de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, a .Amberlite™ XAD4, y de la adición de esta mezcla a medios de cultivo, un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, se libera de las perlas a una velocidad suficiente para sustentar el desarrollo de un auxótrofo *metF* o *metE*, *metH*. En una realización, el compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, está presente en una concentración de 0,1% o mayor en los medios de cultivo que contienen Amberlite™ XAD4. En otra realización, el compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, está presente en una concentración de 0,2% o mayor en los medios de cultivo que contienen .Amberlite™ XAD4. Todavía en otra realización, el compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, está presente en una concentración de 0,3% o mayor en los medios de cultivo que contienen Amberlite™ XAD4.

En otra realización preferida, el sistema de suministro de sulfuro rematado con metilo de liberación lenta, *p. ej.* el sistema de suministro de un grupo azufre y/o metilo de liberación lenta, *p. ej.* el sistema de suministro de liberación lenta de DMDS, es una alimentación de compuesto de sulfuro rematado con metilo de liberación lenta, *p. ej.* una ali-

mentación de una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* una alimentación de DMDS. Tal como se utilizan en esta memoria, las frases “alimentación de compuesto de sulfuro rematado con metilo controlada lenta”, “una alimentación de una fuente de un grupo de azufre y/o metilo controlada lenta” y “una alimentación de DMDS controlada lenta” es una alimentación controlada lenta que suministra, *p. ej.* de manera incrementada o continua, un compuesto de sulfuro rematado, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS al cultivo en cantidades suficientes de modo que se obtiene el producto deseado, *p. ej.* metionina, pero de manera que se eviten concentraciones tóxicas para el microorganismo de producción. Todavía en otra realización preferida, el sistema de suministro de liberación lenta es una membrana que es permeable a un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS, y el compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, *p. ej.* DMDS se deja que difunda y fluya a través de la membrana hacia el medio de crecimiento. Ejemplos no limitantes de membranas incluyen cualquier membrana que pueda conservar su integridad estructural y funcional en presencia de disolventes orgánicos (*es decir*, DMDS) y un medio de cultivo acuoso. Membranas de este tipo se describen en el Catálogo de Millipore Corporation y la guía de referencias técnicas titulada “1994-1995 Millipore Direct”, Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU. Membranas adecuadas incluyen las constituidas por PVDF (poli(fluoruro de vinilideno)), PTFE (politetrafluoroetileno), polipropileno, poli(cloruro de vinilo), poliéter-sulfona, nilón y policarbonato, ya sea con o sin revestimientos hidrófilos. Ejemplos adicionales, no limitantes, de sustancias que se pueden utilizar como un sistema de suministro de disulfuro de dimetilo (DMDS) de liberación lenta incluyen otras resinas hidrófobas en forma de perlas, aceites animales, aceites minerales, aceites químicos, aceites vegetales, aceites sintéticos, un disolvente orgánico, clorocarburos, fluorocarburos, cloro-fluoro-carburos o combinaciones de los mismos.

Según se describe en esta memoria, microorganismos en los que la vía biosintética de metionina ha sido genéticamente alterada, *p. ej.* para supra-producir *O*-acetilhomoserina, da como resultado la producción mejorada de metionina en medios que contienen un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo tal como, *p. ej.*, DMDS. Por consiguiente, la presente invención también proporciona métodos para producir metionina, que comprenden cultivar un microorganismo que tiene una vía biosintética de metionina desregulada en presencia de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, *p. ej.* una fuente de un grupo azufre y/o metilo, preferiblemente disulfuro de dimetilo (DMDS), de modo que se produce metionina.

Las metodologías de la presente invención ofrecen microorganismos, *p. ej.* microorganismos recombinantes, preferiblemente que incluyen vectores o genes (*p. ej.* genes del tipo salvaje y/o mutados) según se describen en esta memoria y/o se cultivan de una manera que resulten en la obtención de un producto deseado (*p. ej.* metionina). La expresión microorganismo “recombinante” incluye un microorganismo (*p. ej.* bacteria, célula de levaduras, célula de hongos, *etc.*) que ha sido genéticamente alterado, modificado o tratado mediante ingeniería (*p. ej.* tratado mediante ingeniería genética), de modo que exhibe un genotipo y/o fenotipo alterado, modificado o diferente (*p. ej.* cuando la modificación genética afecta a las secuencias de ácidos nucleicos codificadores del microorganismo) en comparación con el microorganismo que se produce en la naturaleza del cual se derivó.

Un microorganismo recombinante utilizado se diseña o trata mediante ingeniería de modo que se expresa o sobre-expresa al menos una enzima biosintética de metionina no nativa. La expresión “se sobre-expresa” o el término “sobre-expresión” incluyen la expresión de un producto génico (*p. ej.* una enzima biosintética) en un medio de crecimiento apropiado a una concentración mayor que la expresada antes de la manipulación del microorganismo o en un microorganismo equiparable que no ha sido manipulado. El microorganismo utilizado se puede diseñar o tratar mediante ingeniería genética para que sobre-exprese una concentración de un producto génico mayor que la expresada en un microorganismo equiparable que no ha sido tratado mediante ingeniería. Preferiblemente, el gen que codifica un enzima biosintética está incluido dentro de un vector recombinante y/o una enzima biosintética expresada a partir de un vector recombinante. El experto ordinario en la técnica apreciará que un microorganismo que expresa o sobre-expresa un producto génico produce o sobre-produce el producto génico como resultado de la expresión o sobre-expresión de secuencias de ácidos nucleicos y/o genes que codifican el producto génico.

La expresión “microorganismo manipulado” incluye un microorganismo que ha sido tratado mediante ingeniería (*p. ej.* tratado mediante ingeniería genética) o modificado de modo que el microorganismo tiene al menos una enzima de la vía biosintética de metionina modificada en una cantidad o estructura tal que aumenta la producción de metionina. La modificación o el tratamiento mediante ingeniería de microorganismos de este tipo puede realizarse de acuerdo con cualquier metodología descrita en esta memoria, que incluye, pero no se limita a la desregulación de una vía biosintética y/o la sobre-expresión de al menos una enzima biosintética. Una enzima “manipulada” (*p. ej.* una enzima biosintética “manipulada”) incluye una enzima, cuya expresión, producción o actividad ha sido alterada o modificada de manera que al menos un precursor, sustrato o producto de la enzima situado aguas arriba o situado aguas abajo es alterado o modificado (*p. ej.* una concentración, relación, *etc.* alterada o modificada de un precursor, sustrato y/o producto), por ejemplo en comparación con una correspondiente enzima de tipo salvaje o que se produce en la naturaleza. Una enzima “manipulada” incluye también una en la que se ha reforzado la resistencia a la inhibición, *p. ej.* la inhibición de retroalimentación por parte de uno o más productos o compuestos intermedios. Por ejemplo, una enzima que es capaz de funcionar enzimáticamente de manera eficaz en presencia, *p. ej.* de metionina.

La expresión “se sobre-expresa” o el término “sobre-expresión” incluyen la expresión de un producto génico (*p. ej.* una enzima biosintética de metionina) a una concentración mayor que la expresada antes de la manipulación del microorganismo o en un microorganismo equiparable que no ha sido manipulado. En una realización, el microorganismo puede ser manipulado genéticamente (*p. ej.* tratado mediante ingeniería genética) para que sobre-exprese una concentración de un producto génico mayor que la expresada antes de la manipulación del microorganismo o en un

microorganismo equiparable que no ha sido manipulado. La manipulación genética puede incluir, pero no se limita a alterar o modificar secuencias reguladoras o sitios asociados con la expresión de un gen particular (*p. ej.* añadiendo promotores fuertes, promotores inducibles o promotores múltiples, o separando secuencias reguladoras de manera que la expresión sea constitutiva), modificando la localización en el cromosoma de un gen particular, alterando la secuencia de ácidos nucleicos adyacente a un gen particular tal como un sitio de unión a ribosoma o un terminador de la transcripción, aumentando el número de copias de un gen particular, modificando proteínas (*p. ej.* proteínas reguladoras, supresores, reforzadores, activadores de la transcripción y similares) implicados en la transcripción de un gen particular y/o la traducción de un producto génico particular, o cualesquiera otros medios convencionales para desregular la expresión de un gen particular, rutinarios en la técnica (incluidos, pero no limitados al uso de moléculas de ácido nucleico antisentido, por ejemplo para bloquear la expresión de proteínas represoras y/o el uso de alelos mutadores, *p. ej.* alelos bacterianos que refuerzan la variabilidad genética y aceleran, por ejemplo, la evolución adaptativa).

En otra realización, el microorganismo utilizado puede manipularse de un modo físico o medioambiental para sobre-expresar una concentración de un producto génico mayor que la expresada antes de la manipulación del microorganismo o en un microorganismo equiparable que no ha sido manipulado. Por ejemplo, un microorganismo se puede tratar con o cultivar en presencia de un agente del que se sabe o sospecha que aumenta la transcripción de un gen particular y/o la traducción de un producto génico particular, de manera que se refuerzan o incrementan la transcripción y/o traducción. Alternativamente, un microorganismo se puede cultivar a una temperatura seleccionada para aumentar la transcripción de un gen particular y/o la traducción de un producto génico particular de modo que se refuerza o incrementa la transcripción y/o traducción.

Un microorganismo “recombinante” preferido utilizado es un microorganismo que tiene una vía o enzima biosintética de metionina desregulada. El término “desregulada” o “desregulación” incluye la alteración o modificación de al menos un gen en un microorganismo que codifica una enzima en una vía biosintética, de modo que se altera o modifica la concentración o actividad de la enzima biosintética en el microorganismo. Preferiblemente, se altera o modifica al menos un gen que codifica una enzima en una vía biosintética, de manera que el producto génico se refuerza o aumenta. La frase “vía desregulada” también puede incluir una vía biosintética en la que se altera o modifica más de un gen que codifica una enzima en una vía biosintética, de manera que se altera o modifica la concentración o actividad de más de una enzima biosintética. La capacidad de “desregular” una vía (*p. ej.* para desregular simultáneamente más de un gen, *p. ej.* 2, 3, 4, 5, 6, 7 en una vía biosintética dada) en un microorganismo surge del fenómeno particular de los microorganismos en los que más de una enzima (*p. ej.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, *etc.* enzimas biosintéticas) son codificadas por genes que se producen uno junto a otro en un trozo contiguo de un material genético denominado “operón”.

El término “operón” incluye al menos dos genes adyacentes u ORFs (marcos de lectura abierta) que se solapan opcionalmente en secuencias en el extremo 5' ó 3' de al menos un gen u ORF. El término “operón” incluye una unidad coordinada de expresión génica que contiene un promotor y, posiblemente, un elemento regulador asociado con uno o más, preferiblemente al menos dos genes estructurales (*p. ej.* genes que codifican enzimas, por ejemplo enzimas biosintéticas). La expresión de los genes estructurales se puede regular de forma coordinada, por ejemplo mediante proteínas reguladoras que se unen al elemento regulador o mediante anti-terminación de la transcripción. Los genes estructurales se pueden transcribir para dar un ARNm sencillo que codifica la totalidad de las proteínas estructurales. Debido a la regulación coordinada de genes incluidos en un operón, la alteración o modificación del promotor sencillo y/o del elemento regulador puede dar como resultado una alteración o modificación de cada uno de los productos génicos codificados por el operón. La alteración o modificación del elemento regulador puede incluir, pero no se limita a separar el promotor endógeno y/o el o los elementos reguladores, añadir promotores fuertes, promotores inducibles o promotores múltiples, o separar secuencias reguladoras, de manera que se modifique la expresión de los productos génicos, modificando la localización en el cromosoma del operón, alterando las secuencias de ácidos nucleicos adyacentes al operón o dentro del operón tal como un sitio de unión a ribosoma, aumentando el número de copias del operón, modificando proteínas (*p. ej.* proteínas reguladoras, supresores, reforzadores, activadores de la transcripción y similares) implicados en la transcripción del operón y/o la traducción de los productos génicos del operón, o cualesquiera otros medios convencionales de desregular la expresión de genes, rutinarios en la técnica (que incluyen, pero no se limitan al uso de moléculas de ácidos nucleicos antisentido, por ejemplo para bloquear la expresión de proteínas represoras). La desregulación también puede implicar la alteración de la región codificadora de uno o más genes para proporcionar, por ejemplo, una enzima que es resistente a la retroalimentación, o resistente a la inhibición por parte de un producto o compuesto intermedio, o que tiene una actividad específica mayor o menor.

Un microorganismo “recombinante” utilizado, particularmente preferido, ha sido tratado mediante ingeniería genética para sobre-expresar un gen o producto génico derivado de bacterias. La expresión “derivado de bacterias” o “derivado de”, por ejemplo, bacterias incluye un gen que se encuentra de forma natural en bacterias o un producto génico (*p. ej.* homoserina acetiltransferasa, homoserina deshidrogenasa y *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa) que es codificado por un gen bacteriano (*p. ej.* codificado por *metX*, *hom* (también conocido como *hsd*, *etc.*) y *metY*, respectivamente).

En una realización, el microorganismo productor de metionina tiene al menos una enzima biosintética de metionina desregulada. En una realización preferida, la enzima biosintética de metionina desregulada es *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa. En otra realización, el microorganismo productor de metionina tiene al menos dos enzimas biosintéticas de metionina desreguladas. En una realización preferida, las enzimas biosintéticas de metionina desreguladas son homoserina acetiltransferasa y homoserina deshidrogenasa. En otra realización preferida, las enzimas biosintéticas de metionina desreguladas son *O*-acetil-homoserina sulfhidrilasa y homoserina acetiltransferasa.

ES 2 355 942 T3

En un aspecto, la presente descripción ofrece modificaciones de diversas enzimas biosintéticas de la vía biosintética de metionina. En particular, la descripción ofrece modificar diversas actividades enzimáticas asociadas con dichas vías al modificar o alterar los genes que codifican dichas enzimas biosintéticas.

5 El término “gen”, tal como se utiliza en esta memoria, incluye una molécula de ácido nucleico (*p. ej.* una molécula de ADN o un segmento de la misma) que es un organismo que se puede separar de otro gen u otros genes, mediante ADN intergénico (*es decir*, ADN intermedio o espaciador que flanquea de forma natural al gen y/o a los genes se-
10 paradores en el ADN cromosómico del organismo). Alternativamente, un gen puede solapar ligeramente a otro gen (*p. ej.* el extremo 3’ de un primer gen que solapa al extremo 5’ de un segundo gen), estando los genes solapantes separados de los otros genes mediante ADN intergénico. Un gen puede dirigir la síntesis de una enzima o de otra mo-
15 lécula proteínica (*p. ej.* puede comprender secuencias codificadoras, por ejemplo un marco de lectura abierta (ORF) contiguo que codifica una proteína) o puede ser por sí mismo funcional en el organismo. Un gen en un organismo puede estar formando racimo en un operón, según se define en esta memoria, estando dicho operón separado de otros genes y/u operones por parte del ADN intergénico. Un “gen aislado”, tal como se utiliza en esta memoria, incluye un
20 gen que está esencialmente exento de secuencias que flanquean de forma natural al gen en el ADN cromosómico del organismo del que se deriva el gen (*es decir*, está exento de secuencias codificadoras adyacentes que codifican una segunda o distinta proteína, secuencias estructurales adyacentes o similares) y que incluye, opcionalmente, secuencias reguladoras 5’ y 3’, por ejemplo secuencias de promotores y/o secuencias de terminadores. En una realización, un gen aislado incluye predominantemente secuencias codificadoras de una proteína (*p. ej.* secuencias que codifican proteínas de *Corynebacterium*). En otra realización, un gen aislado incluye secuencias codificadoras de una proteína (*p. ej.* una
25 proteína de *Corynebacterium*), secuencias reguladoras 5’ y/o 3’ adyacentes procedentes del ADN cromosómico del organismo del que se deriva el gen (*p. ej.* secuencias reguladoras de *Corynebacterium* 5’ y/o 3’ adyacentes). Preferiblemente, un gen aislado contiene menos de aproximadamente 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, 0,2 kb, 0,1 kb, 50 pb, 25 pb ó 10 pb de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural al gen en el ADN cromosómico del organismo del que se deriva el gen.

Un “gen que tiene una mutación” o “gen mutante”, tal como se utiliza en esta memoria, incluye un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que incluye al menos una alteración (*p. ej.* sustitución, inserción, delección), de modo que el polipéptido o la proteína codificado por dicho mutante exhibe una actividad que difiere del polipéptido o proteína
30 codificado por la molécula de ácido nucleico o gen de tipo salvaje. En una realización, un gen que tiene una mutación o un gen mutante que codifica un polipéptido o proteína que tiene una actividad incrementada en comparación con el polipéptido o la proteína codificado por el gen de tipo salvaje, por ejemplo cuando se ensaya en condiciones simi-
35 lares (*p. ej.* ensayado en microorganismos cultivados a la misma temperatura). Tal como se utiliza en esta memoria, una “actividad incrementada” o “actividad enzimática incrementada” es una que es al menos 5% mayor que la del polipéptido o proteína codificado por la molécula de ácido nucleico o gen de tipo salvaje, preferiblemente al menos 5-10% mayor, más preferiblemente al menos 10-25% mayor e, incluso más preferiblemente, al menos 25-50%, 50-75% ó 75-100% mayor que el del polipéptido o proteína codificado por la molécula de ácido nucleico o gen de tipo salvaje. También se pretende que queden comprendidos por la presente invención intervalos intermedios a los valores antes reseñados, *p. ej.* 75-85%, 85-90%, 90-95%. Tal como se utiliza en esta memoria, una “actividad incrementada”
40 o “actividad enzimática incrementada” también puede incluir una actividad que es al menos 1,25 mayor que la actividad del polipéptido o proteína codificado por el gen de tipo salvaje, preferiblemente al menos 1,5 veces mayor, más preferiblemente al menos 2 veces mayor, incluso más preferiblemente, al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces mayor que la actividad del polipéptido o proteína codificado por el gen de tipo salvaje.

45 En otra realización, un gen que tiene una mutación o un gen mutante que codifica un polipéptido o proteína tiene una actividad reducida en comparación con el polipéptido o proteína codificado por el gen de tipo salvaje, por ejemplo cuando se ensaya en condiciones similares (por ejemplo ensayado en microorganismos cultivados a la misma temperatura). Un gen mutante también puede no codificar polipéptido alguno o tener un nivel reducido de producción del polipéptido de tipo salvaje. Tal como se utiliza en esta memoria, una “actividad reducida” o “actividad enzimática reducida” es una que es al menos 5% menor que la del polipéptido o proteína codificado por la molécula
50 de ácido nucleico o gen de tipo salvaje, preferiblemente al menos 5-10% menor, al menos más preferiblemente 10-25% menor, e incluso más preferiblemente, al menos 25-50%, 50-75% ó 75-100% menor que la del polipéptido o proteína codificado por la molécula de ácido nucleico o gen de tipo salvaje. También pretenden estar comprendidos por la presente invención intervalos intermedios a los valores antes reseñados, *p. ej.* 75-85%, 85-90%, 90-95%. Tal como se utiliza en esta memoria, una “actividad reducida” o “actividad enzimática reducida” también puede incluir una actividad que ha sido suprimida o “inactivada” (*p. ej.* aproximadamente una actividad 100% menor que la del polipéptido o proteína codificado por la molécula de ácido nucleico o gen de tipo salvaje).

En más de una realización, los microorganismos utilizados que tienen una combinación de genes desregulados
60 producen metionina, por ejemplo a una concentración que es al menos 1-2% mayor, o al menos 3-5% mayor, o al menos 5-10% mayor, o al menos 10-20% mayor, o al menos 20-30%, o al menos 30-40%, o al menos 40-50% mayor, o al menos 50-60% mayor, o al menos 60-70% mayor, o al menos 70-80% mayor, o al menos 80-90% mayor o al menos 90-95% mayor que la suma de concentraciones de metionina producidas en presencia de cada gen desregulado individual.

65 En algunas realizaciones, la concentración de metionina producida por microorganismos, que incluye una combinación de genes desregulados, es al menos 2 veces, o al menos 2,5 veces, o al menos 3 veces, o al menos 3,5 veces, o al menos 4 veces, o al menos 4,5 veces, o al menos 5 veces, o al menos 10 veces, o al menos 15 veces, o al menos 20

ES 2 355 942 T3

veces, o al menos 25 veces, o al menos 30 veces, o al menos 35 veces, o al menos 40 veces, o al menos 45 veces, o al menos 50 veces, o al menos 100 veces mayor que la suma de concentraciones de metionina producida en presencia de cada uno de los genes individuales desregulados.

5 Todavía en otras realizaciones, la cantidad de metionina producida por un microorganismo bajo condiciones de fermentación adecuadas, que incluyen una combinación de genes alterados, es al menos 5 g, o al menos 7 g, o al menos 8 g, o al menos 9 g, o al menos 10 g, o al menos 11 g, o al menos 12 g, o al menos 13 g, o al menos 14 g, o al menos 15 g, o al menos 16 g, o al menos 17 g, o al menos 18 g, o al menos 19 g, o al menos 20 g, o al menos 25 g, o al menos 30 g, o al menos 40 g, o al menos 50 g mayor por litro con relación a la suma de cantidades producidas por un microorganismo
10 en presencia de cada uno de los genes individuales alterados o en presencia de ninguna alteración de genes.

La concentración de metionina producida por microorganismos descritos en esta memoria se puede medir fácilmente utilizando uno o más ensayos descritos en esta memoria.

15 La actividad se puede determinar de acuerdo con cualquier ensayo bien aceptado para medir la actividad de una proteína particular de interés. La actividad se puede medir o ensayar directamente, por ejemplo midiendo una actividad de una proteína aislada o purificada a partir de una célula o microorganismo. Alternativamente, una actividad también se puede medir o ensayar dentro de una célula o microorganismo o en un medio extracelular. Por ejemplo, el ensayo de un gen mutante (*es decir*, dicho mutante que codifica una actividad enzimática reducida) se puede conseguir
20 expresando el gen mutado en un microorganismo, por ejemplo un microorganismo mutante en el que la enzima es una sensible a la temperatura, y ensayando el gen mutante en cuanto a la capacidad de complementar a un mutante sensible a la temperatura (Ts - siglas en inglés) en cuanto a la actividad enzimática. Un gen mutante que codifica una “actividad enzimática incrementada” puede ser uno que complementa al mutante Ts de manera más eficaz que, por ejemplo, un gen de tipo salvaje correspondiente. Un gen mutante que codifica una “actividad enzimática reducida” es
25 uno que complementa al mutante Ts de manera menos eficaz que, por ejemplo, un gen de tipo salvaje correspondiente.

Se apreciará por parte del experto que incluso una única sustitución en una secuencia de ácidos nucleicos o genes (*p. ej.* una sustitución de una base que codifica un cambio de aminoácido en la correspondiente secuencia de aminoácidos) puede afectar drásticamente a la actividad de un polipéptido o proteína codificado en comparación con el polipéptido o
30 proteína de tipo salvaje correspondiente. Un gen mutante (*p. ej.* que codifica un polipéptido o proteína mutante) según se define en esta memoria, es fácilmente discernible de un ácido nucleico o gen que codifica una proteína homóloga, debido a que un gen mutante codifica una proteína o polipéptido que tiene una actividad alterada, opcionalmente observable como un fenotipo diferente o distinto en un microorganismo que expresa dicho gen mutante o produce
35 dicha proteína o polipéptido mutante (*es decir*, un microorganismo mutante) en comparación con un correspondiente microorganismo que expresa el gen de tipo salvaje. En contraposición, un homólogo de proteína puede tener una actividad idéntica o esencialmente similar, opcionalmente indiscernible por el fenotipo, cuando se produce en un microorganismo en comparación con un correspondiente microorganismo que expresa el gen de tipo salvaje. Por consiguiente, no es, por ejemplo, el grado de la identidad de secuencias entre moléculas de ácidos nucleicos, genes, proteínas o polipéptidos el que sirve para distinguir entre homólogos y mutantes, más bien es la actividad de la proteína
40 o polipéptido codificado la que distingue entre homólogos y mutantes: homólogos que tienen, por ejemplo, una baja identidad de la secuencia (*p. ej.* una identidad de la secuencia de 30-50%), pero que tienen actividades funcionales esencialmente equivalentes, y mutantes, por ejemplo que comparten una identidad de la secuencia de un 99%, pero que tienen actividades funcionales drásticamente diferentes o alteradas.

45 En una realización, un microorganismo recombinante utilizado es un organismo Gram-positivo (*p. ej.* un microorganismo que retiene un colorante básico, por ejemplo cristal violeta, debido a la presencia de una pared Gram-positiva que rodea al microorganismo). En una realización preferida, el microorganismo recombinante utilizado es del género *Corynebacterium*. En una realización, el microorganismo recombinante utilizado es del género *Bacillus*. En otra realización preferida, el microorganismo recombinante se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus licheniformis*,
50 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*.

En otra realización, el microorganismo recombinante utilizado es un organismo Gram-negativo (excluye el colorante básico). En otra realización, el microorganismo recombinante utilizado de la presente invención es un microorganismo que pertenece al grupo enterobacterias. En una realización preferida, el microorganismo recombinante utilizado
55 es un microorganismo que pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Proteus*. En una realización más preferida, el microorganismo recombinante utilizado es del género *Escherichia*. En una realización incluso más preferida, el microorganismo recombinante utilizado es *Escherichia coli*. En otra realización, el microorganismo recombinante es una levadura del género *Saccharomyces* (*p. ej.* *S. cerevisiae*) y una Archaea.

60 Un aspecto importante de la presente invención implica cultivar los microorganismos de la presente invención de modo que se produzca metionina.

El término “cultivar” incluye mantener y/o hacer crecer un microorganismo vivo de la presente invención (*p. ej.* mantener y/o hacer crecer un cultivo o cepa). En una realización, un microorganismo de la invención se cultiva en medios líquidos. En otra realización, un microorganismo de la invención se cultiva en medios sólidos o medios semi-sólidos. En una realización preferida, un microorganismo de la invención se cultiva en medios (*p. ej.* un medio líquido estéril) que comprende nutrientes esenciales o beneficiosos para el mantenimiento y/o crecimiento del microorganismo

ES 2 355 942 T3

(p. ej. fuentes de carbono o sustrato de carbono, por ejemplo hidratos de carbono, hidrocarburos, aceites, grasas, ácidos grasos, ácidos orgánicos y alcoholes; fuentes nitrogenadas, por ejemplo peptona, extractos de levadura, extractos de carne, extractos de malta, urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y fosfato de amonio; fuentes de fósforo, por ejemplo ácido fosfórico, sales sódica y potásica de los mismos; elementos traza, por ejemplo magnesio, hierro, manganeso, calcio, cobre, zinc, boro, níquel, molibdeno y/o sales de cobalto, así como factores de crecimiento tales como aminoácidos, vitaminas, promotores del crecimiento y similares).

Los microorganismos de acuerdo con la invención se pueden cultivar de forma continua o discontinua o en un proceso por lotes alimentados o por lotes alimentados repetidos para producir metionina. Una perspectiva general de métodos de cultivo conocidos se puede encontrar en el libro de texto de Chmiel (*Bioprozess-technik I. Einführung in die Bioverfahrenstechnik* (Editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991) o en el libro de texto de Storhas (*Bioreaktoren und periphere Einrichtungen* (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

Preferiblemente, los microorganismos se cultivan bajo un pH controlado. La expresión “pH controlado” incluye cualquier pH que resulta en la obtención del producto deseado (p. ej. metionina). En una realización, los microorganismos se cultivan a un pH de aproximadamente 7. En otra realización, los microorganismos se cultivan a un pH entre 6,0 y 8,5. El pH deseado se puede mantener mediante cualquier número de métodos conocidos por los expertos en la técnica.

También de manera preferida, en la presente invención se cultivan microorganismos bajo aireación controlada. La expresión “aireación controlada” incluye una aireación suficiente (p. ej. oxígeno) que da como resultado la obtención del producto deseado (p. ej. metionina). En una realización, la aireación se controla regulando los niveles de oxígeno en el cultivo, por ejemplo regulando la cantidad de oxígeno disuelto en los medios de cultivo. Preferiblemente, la aireación del cultivo se controla agitando el cultivo. La agitación se puede proporcionar mediante un propulsor o equipo de agitación mecánico similar, haciendo girar o sacudiendo el recipiente de cultivo (p. ej. tubo o matraz) o por un equipo de bombeo diverso. La aireación se puede controlar, adicionalmente, mediante el paso de aire estéril u oxígeno a través del medio (p. ej. a través de la mezcla de fermentación). También de manera preferida, en la presente invención los microorganismos se cultivan sin una excesiva formación de espuma (p. ej. a través de la adición de agentes anti-espumantes).

Además, en la presente invención, los microorganismos se pueden cultivar bajo temperaturas controladas. La expresión “temperatura controlada” incluye cualquier temperatura que resulta en la obtención del producto deseado (p. ej. metionina). En una realización, temperaturas controladas incluyen temperaturas entre 15°C y 95°C. En otra realización, las temperaturas controladas incluyen temperaturas entre 15°C y 70°C. Temperaturas preferidas se encuentran entre 20°C y 55°C, más preferiblemente entre 30°C y 50°C.

Los microorganismos se pueden cultivar (p. ej. mantener y/o hacer crecer) en medios líquidos y, preferiblemente, se cultivan, de forma continua o intermitente, mediante métodos de cultivo convencionales tales como cultivo en reposo, cultivo en tubo de ensayo, cultivo con agitación (p. ej. cultivo con agitación rotatoria, cultivo en matraz con agitación, etc.), cultivo en rotación con aireación, o fermentación. En una realización preferida, los microorganismos se cultivan en matraces con agitación. En una realización más preferida, los microorganismos se cultivan en un fermentador (p. ej. un proceso de fermentación). Procesos de fermentación de la presente invención incluyen, pero no se limitan a procesos por lotes, por lotes alimentados y continuos o métodos de fermentación. La frase “proceso por lotes” o “fermentación por lotes” se refiere a un sistema en el que la composición de los medios, nutrientes, aditivos suplementarios y similares se establece al comienzo de la fermentación y no se somete a alteración durante la misma, sin embargo se han realizado intentos para controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno para prevenir una acidificación de los medios en exceso y/o la muerte de los microorganismos. La frase “proceso por lotes alimentados” o fermentación “por lotes alimentados” se refiere a una fermentación por lotes, con la excepción de que a medida que progresa la fermentación se añaden más sustratos o suplementos (p. ej. añadidos en incrementos o de forma continua). La frase “proceso continuo” o “fermentación continua” se refiere a un sistema en el que un medio de fermentación definido se añade de forma continua a un fermentador y se separa simultáneamente una cantidad igual de medio usado o “acondicionado”, preferiblemente para la recuperación del producto deseado (p. ej. metionina). Se han desarrollado y son bien conocidas en la técnica variedades de procesos de este tipo.

El medio de cultivo a utilizar debe cumplir los requisitos de las cepas particulares de una manera adecuada. Descripciones de medios de cultivo para diversos microorganismos están contenidas en el manual “Manual of Methods for General Bacteriology” de la Sociedad Americana de Bacteriología (Washington D.C., EE.UU., 1981).

Fuentes de carbono que son apropiadas para uso en el medio de cultivo son, por ejemplo, azúcares e hidratos de carbono tales como, p. ej., glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, almidón y celulosa, aceites y grasas tales como, p. ej., aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos tales como, p. ej., ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como, p. ej., glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tales como, p. ej., ácido acético. Estas sustancias se pueden utilizar individualmente o en forma de una mezcla.

Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar compuestos con contenido en nitrógeno, orgánicos tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, líquido de maceración de maíz, harina de haba de soja y urea, o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar individualmente o en forma de una mezcla.

ES 2 355 942 T3

Como fuente de fósforo se puede utilizar ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato de potasio o hidrógeno-fosfato de dipotasio o las correspondientes sales con contenido en sodio.

Además de DMDS, trisulfuro de dimetilo, tetrasulfuro de dimetilo, cuyos extremos están rematados con grupos metilo, como fuentes adicionales de azufre se pueden utilizar compuestos con contenido en azufre, orgánicos e inorgánicos tales como, por ejemplo, sulfuros, sulfitos, sulfatos y tiosulfatos.

El medio de cultivo puede comprender, además, sales de metales tales como, *p. ej.*, sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, además de las sustancias antes mencionadas se pueden emplear sustancias para el crecimiento esenciales y no esenciales tales como aminoácidos y vitaminas. Además de ello, al medio de cultivo se pueden añadir precursores adecuados. Las sustancias de partida mencionadas pueden añadirse al cultivo en forma de un único lote, o pueden ser alimentadas de una manera adecuada durante el cultivo.

Compuestos de carácter básico tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o amoníaco acuoso, o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, se pueden emplear de una manera adecuada para controlar el pH. Para controlar el desarrollo de espuma se pueden emplear agentes anti-espumantes tales como, *p. ej.*, ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Sustancias adecuadas que tengan una acción selectiva tales como, *p. ej.*, antibióticos, se pueden añadir al medio para mantener la estabilidad de los plásmidos. Con el fin de mantener las condiciones aerobias, se introducen en el cultivo mezclas de oxígeno o de gas con contenido en oxígeno tales como, *p. ej.*, aire. La temperatura del cultivo es habitualmente de 20°C a 45°C y, preferiblemente, de 25°C a 40°C. El cultivo se continúa hasta que se haya formado un máximo del producto deseado. Este objetivo se alcanza habitualmente en el espacio de 10 horas a 160 horas.

La frase “cultivo bajo condiciones tales que se produce un compuesto deseado” incluye mantener y/o hacer crecer microorganismos en condiciones (*p. ej.* temperatura, presión, pH, duración, *etc.*) apropiadas o suficientes para obtener la producción del compuesto deseado o para obtener rendimientos deseados del compuesto particular que se esté produciendo. Por ejemplo, el cultivo se continúa durante un tiempo suficiente para producir la cantidad deseada de un compuesto (*p. ej.* metionina). Preferiblemente, el cultivo se continúa durante un tiempo suficiente para alcanzar esencialmente una producción adecuada del compuesto (*p. ej.* un tiempo suficiente para alcanzar una concentración adecuada de metionina). En una realización, el cultivo se continúa durante aproximadamente 12 a 24 horas. En otra realización, el cultivo se continúa durante aproximadamente 24 a 36 horas, 36 a 48 horas, 48 a 72 horas, 72 a 96 horas, 96 a 120 horas, 120 a 144 horas, o más de 144 horas. En otra realización, el cultivo se continúa durante un tiempo suficiente para alcanzar rendimientos de producción deseables de metionina, por ejemplo los microorganismos se cultivan de manera que se produzca al menos aproximadamente de 7 a 10 g/L, o al menos 10 a 15 g/L, o al menos aproximadamente 15 a 20 g/L, o al menos aproximadamente 20 a 25 g/L, o al menos aproximadamente 25 a 30 g/L, o al menos aproximadamente 30 a 35 g/L, o al menos aproximadamente 35 a 40 g/L, o al menos aproximadamente 40 a 50 g/L de metionina. Todavía en otras realizaciones, los microorganismos se cultivan en condiciones tales que un rendimiento preferido de metionina, por ejemplo un rendimiento dentro de un intervalo recogido anteriormente, se produce en aproximadamente 24 horas, en aproximadamente 36 horas, en aproximadamente 48 horas, en aproximadamente 72 horas o en aproximadamente 96 horas.

La metodología de la presente invención puede incluir, además, una etapa de recuperar el compuesto deseado (metionina). El término “recuperar” un compuesto deseado, incluye concentrar, extraer, recolectar, aislar o purificar el compuesto a partir de medios de cultivo. La recuperación del compuesto se puede efectuar de acuerdo con cualquier metodología de aislamiento o purificación convencional conocida en la técnica que incluye, pero no se limita a tratamiento con una resina convencional (*p. ej.* resina de intercambio de aniones o cationes, resina de adsorción no iónica, *etc.*), tratamiento con un adsorbente convencional (*p. ej.* carbón vegetal activado, ácido silícico, sílice, celulosa, alúmina, *etc.*), alteración del pH, extracción con disolvente (*p. ej.* con un disolvente convencional tal como un alcohol, acetato de etilo, hexano y similares), diálisis, filtración, concentración, cristalización, recristalización, ajuste del pH, liofilización, secado, evaporación y similares. Por ejemplo, la metionina se puede recuperar del medio de cultivo separando primeramente los microorganismos del cultivo.

Preferiblemente, metionina de la presente invención se “extrae”, “aisla” o “purifica” de modo que la preparación resultante está esencialmente exenta de otros componentes del medio (*p. ej.* exenta de componentes del medio y/o subproductos de la fermentación). El lenguaje “esencialmente exenta de otros componentes del medio” incluye preparaciones del compuesto deseado en las que el compuesto se separa de componentes del medio o subproductos de la fermentación del cultivo del cual se produce. En una realización, la preparación tiene más de aproximadamente 80% (en peso seco) del compuesto deseado (*p. ej.* menos de aproximadamente 20% de otros componentes del medio o subproductos de la fermentación), más preferiblemente más de aproximadamente 90% del compuesto deseado (*p. ej.* menos de aproximadamente 10% de otros componentes del medio o subproductos de la fermentación), todavía más preferiblemente más de aproximadamente 95% del compuesto deseado (*p. ej.* menos de aproximadamente 5% de otros componentes del medio o subproductos de la fermentación) y, lo más preferiblemente, más de aproximadamente 98-99% del compuesto deseado (*p. ej.* menos de aproximadamente 1-2% de otros componentes del medio o subproductos de la fermentación).

La descripción comprende, además, procesos de biotransformación que ofrecen diversos microorganismos recombinantes descritos en esta memoria. La expresión “proceso de biotransformación”, al que también se alude en esta memoria como “procesos de bioconversión”, incluye procesos biológicos que resultan en la producción (*p. ej.*

transformación o conversión) de sustratos y/o compuestos intermedios apropiados para formar un producto deseado (metionina).

Microorganismo o microorganismos y/o enzimas utilizados en reacciones de biotransformación se encuentran en una forma que les permite realizar su función pretendida (*p. ej.* producir con compuesto deseado). Microorganismos de este tipo pueden ser células enteras, o pueden ser solamente aquellas partes de una célula (por ejemplo genes y/o enzimas) necesarias para obtener el resultado final deseado. Estos microorganismos se pueden suspender (*p. ej.* en una disolución apropiada tal como disoluciones o medios tamponados), aclarar (*p. ej.* liberar por aclarado de medios del cultivo del microorganismo), secar con acetona, inmovilizar (*p. ej.* con gel de poliacrilamida o k-carragenano u otros soportes sintéticos, por ejemplo perlas, matrices y similares), fijar, reticular o permeabilizar (*p. ej.* tener membranas y/o paredes permeabilizadas, de modo que los compuestos, por ejemplo sustratos, compuestos intermedios o productos, puedan pasar más fácilmente a través de dicha membrana o pared).

En una realización alternativa, el compuesto deseado no se purifica a partir del microorganismo, por ejemplo cuando el microorganismo no es biológicamente peligroso (*p. ej.* es seguro). Por ejemplo, el cultivo completo (o el sobrenadante del cultivo) se puede utilizar como una fuente del producto (*p. ej.* producto bruto). En una realización, el cultivo (o sobrenadante del cultivo) se utiliza sin modificación. En otra realización, el cultivo (o sobrenadante del cultivo) se concentra. Todavía en otra realización, el cultivo (o sobrenadante del cultivo) se seca o liofiliza. El producto obtenido por la presente invención puede incluir, además de metionina, otros componentes del caldo de fermentación, *p. ej.* fosfatos, carbonatos, hidratos de carbono remanentes, biomasa, componentes del medio complejo, *etc.*

II. Moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, vectores y polipéptidos

La presente descripción ofrece, además, moléculas de ácidos nucleicos recombinantes (*p. ej.* moléculas de ADN recombinante) que incluyen genes descritos en esta memoria (*p. ej.* genes aislados), preferiblemente genes de *Corynebacterium*, más preferiblemente genes de *Corynebacterium glutamicum*, incluso más preferiblemente genes biosintéticos de metionina de *Corynebacterium glutamicum*. La expresión “molécula de ácido nucleico recombinante” incluye una molécula de ácido nucleico (*p. ej.* una molécula de ADN) que ha sido alterada, modificada o tratada mediante ingeniería, de manera que difiere en la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico nativa o natural de la cual se derivó la molécula de ácido nucleico recombinante (*p. ej.* mediante adición, delección o sustitución de uno o más nucleótidos). Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico recombinante (*p. ej.* una molécula de ADN recombinante) incluye un gen aislado de la presente invención, enlazado operativamente a secuencias reguladoras. La frase “enlazada operativamente a secuencia o secuencias reguladoras” significa que la secuencia de nucleótidos del gen de interés está enlazada a la secuencia o secuencias reguladoras de una manera que permita la expresión (*p. ej.* expresión reforzada, incrementada, constitutiva, basal, atenuada, disminuida o reprimida) del gen, preferiblemente la expresión de un producto génico codificado por el gen (*p. ej.* cuando la molécula de ácido nucleico recombinante está incluida en un vector recombinante, según se define en esta memoria, y se introduce en un microorganismo).

La expresión “ácido nucleico heterólogo” se utiliza en esta memoria para aludir a secuencias de ácidos nucleicos que no están típicamente presentes en un organismo diana. También pueden comprender secuencias de ácidos nucleicos presentes en un organismo diana, pero no se encuentran normalmente en una región genética de un organismo diana de interés. De manera similar, la expresión “gen heterólogo” se refiere a un gen que no está presente en un material aislado de tipo salvaje del organismo hospedador. Ácidos nucleicos heterólogos y genes heterólogos comprenden generalmente moléculas de ácido nucleico recombinante. El ácido nucleico heterólogo o el gen heterólogo puede no comprender modificaciones (*p. ej.* por adición, delección o sustitución de uno o más nucleótidos).

También se describen homólogos de los diversos genes y proteínas descritos en esta memoria. Un “homólogo”, en referencia a un gen, se refiere a una secuencia de nucleótidos que es esencialmente idéntica a lo largo de al menos parte del gen o de su cadena complementaria o a una parte de la misma, con la condición de que la secuencia de nucleótidos codifique una proteína que tiene esencialmente la misma actividad/función que la proteína codificada por el gen del que es un homólogo. Homólogos de los genes descritos en esta memoria se pueden identificar mediante porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos o nucleótidos para los supuestos homólogos y las secuencias para los genes o proteínas codificados por ellos (*p. ej.* secuencias de nucleótidos para genes *ask*, *hom*, *metX*, *metY*, *metB*, *metH*, *metE*, *metF*, *metC* y *metK* de *Corynebacterium glutamicum* o sus cadenas complementarias). El porcentaje de identidad se puede determinar, por ejemplo, mediante inspección visual o utilizando diversos programas de ordenador conocidos en la técnica o según se describen en esta memoria. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de dos secuencias de nucleótidos se puede determinar comparando la información de las secuencias utilizando 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 nucleótidos utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST.RTM), según se describe por Tatusova *et al.* (1999) *FEMS Microbiol. Lett.*, 174:247. Por ejemplo, para los alineamientos de secuencias de nucleótidos utilizando el programa BLAST™, las configuraciones por defecto son como siguen: recompensa para el apareamiento es 2, penalización para el despareamiento es -2, penalizaciones para el hueco abierto y el hueco de extensión son 5 y 2, respectivamente, gap.times.dropoff es 50, esperado es 10, si el tamaño de la palabra es 11 y el filtro está DESCONECTADO.

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos “homología” y “homólogo” no están limitados a designar proteínas que tengan un teórico ancestro genético común, sino que incluyen proteínas que pueden no estar genéticamente

relacionadas las cuales, no obstante, han evolucionado para realizar funciones similares y/o tener estructuras similares. La homología funcional con las diversas proteínas descritas en esta memoria comprende también proteínas que tienen una actividad de la correspondiente proteína de la que es homóloga. Para que las proteínas tengan una homología funcional no se requiere que tengan una identidad significativa en sus secuencias de aminoácidos, sino más bien que las proteínas que tengan una homología funcional se definan de manera que tengan actividades similares o idénticas, *p. ej.* actividades enzimáticas. De manera similar, proteínas con una homología estructural se definen como que tienen una estructura terciaria (o cuaternaria) análoga y no requieren necesariamente una homología de aminoácidos o una homología de ácidos nucleicos para los genes que las codifican. En determinadas circunstancias, homólogos estructurales pueden incluir proteínas que conservan la homología estructural solamente en el sitio activo o sitio de unión de la proteína.

Adicionalmente a la homología estructural y funcional, la presente descripción comprende, además, proteínas que tienen al menos una identidad parcial de aminoácidos con las diversas proteínas y enzimas descritas en esta memoria. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (*p. ej.* se pueden introducir huecos en la secuencia de aminoácidos de una proteína para un alineamiento óptimo con la secuencia de aminoácidos de otra proteína). Luego se comparan los residuos de aminoácidos en las correspondientes posiciones de los aminoácidos. Cuando una posición en una secuencia está ocupada por el mismo residuo aminoácido que la posición correspondiente en la otra, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (*es decir*, % de identidad = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones, multiplicado por 100).

En algunos aspectos, las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de moléculas descritas en esta memoria comprenden una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos que se hibrida a o que tiene al menos una identidad de aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos descrita en esta memoria.

La presente descripción también comprende técnicas bien conocidas en la técnica, útiles para el tratamiento mediante ingeniería genética de las proteínas descritas en esta memoria para producir enzimas con características mejoradas o modificadas. Por ejemplo, se encuentra dentro de las enseñanzas disponibles en la técnica modificar una proteína de manera que la proteína tenga una afinidad de unión al sustrato incrementada o disminuida. También puede ser ventajoso, y se encuentra dentro de las enseñanzas de la técnica, diseñar una proteína que tenga tasas enzimáticas incrementadas o disminuidas. En particular, para enzimas multifuncionales, puede ser útil sintonizar con una precisión diferencial las diversas actividades de una proteína para que se comporte óptimamente bajo circunstancias especificadas. Además, la capacidad de modular la sensibilidad de una enzima a la inhibición de la retroalimentación (*p. ej.* por parte de metionina) se puede conseguir a través del cambio selectivo de aminoácidos implicados en la unión o coordinación de metionina o de otros cofactores que pueden estar implicados en la retroalimentación negativa o positiva. Además, la ingeniería genética comprende eventos asociados con la regulación de la expresión a los niveles tanto de transcripción como de traducción. Por ejemplo, cuando se utiliza un operón completo o parcial para la clonación y la expresión, se pueden modificar secuencias reguladoras, *p. ej.* secuencias del promotor o reforzador del gen, de manera que proporcione niveles deseados de transcripción.

Un “homólogo” de cualquiera de los genes descritos en esta memoria también se puede identificar mediante una actividad de la proteína codificada por el homólogo. Por ejemplo, un homólogo de este tipo puede complementar una mutación en el gen del que es homólogo.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “secuencia reguladora” incluye secuencias de ácidos nucleicos que afectan (*p. ej.* modulan o regulan) la expresión de otras secuencias de ácidos nucleicos (*es decir*, genes). En un aspecto, una secuencia reguladora está incluida en una molécula de ácido nucleico recombinante en una posición y/u orientación similar o idéntica con relación a un gen particular de interés según se observa para la secuencia reguladora y el gen de interés, según se manifiesta en la naturaleza, *p. ej.* en una posición y/u orientación nativa. Por ejemplo, un gen de interés puede incluirse en una molécula de ácido nucleico recombinante operativamente enlazada a una secuencia reguladora que acompaña o es adyacente al gen de interés en el organismo natural (*p. ej.* está enlazada operativamente a secuencias reguladoras “nativas”, *p. ej.* al promotor “nativo”). Alternativamente, un gen de interés puede incluirse en una molécula de ácido nucleico recombinante enlazada operativamente a una secuencia reguladora que acompaña o es adyacente a otro gen (*p. ej.* diferente) en el organismo natural. Alternativamente, un gen de interés puede incluirse en una molécula de ácido nucleico recombinante operativamente enlazada a una secuencia reguladora de otro organismo. Por ejemplo, secuencias reguladoras de otros microbios (*p. ej.* otras secuencias reguladoras bacterianas, secuencias reguladoras de bacteriófagos y similares) pueden estar operativamente enlazadas a un gen de interés particular.

En un aspecto, una secuencia reguladora es una secuencia no nativa o que no aparece de forma natural (*p. ej.* una secuencia que ha sido modificada, mutada, sustituida, derivatizada, suprimida, incluidas secuencias que se sintetizan químicamente). Secuencias reguladoras preferidas incluyen promotores, reforzadores, señales de terminación, señales anti-terminación y otros elementos de control de la expresión (*p. ej.* secuencias a las que se unen represores o inductores y/o sitios de unión para las proteínas reguladoras de la transcripción y/o traducción, por ejemplo en el ARNm transcrito). Secuencias reguladoras de este tipo se describen, por ejemplo, en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y en Patek, M. *et al*, (2003) *Journal of Biotechnology* 104: 311-

323. Secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en un microorganismo (*p. ej.* promotores constitutivos y promotores constitutivos fuertes), aquellas que dirigen una expresión inducible de una secuencia de nucleótidos en un microorganismo (*p. ej.* promotores inducibles, por ejemplo promotores inducibles de xilosa) y aquellas que atenúan o reprimen la expresión de una secuencia de nucleótidos en un microorganismo (*p. ej.* señales de atenuación o secuencias de represor). También se describe regular la expresión de un gen de interés separando o eliminando secuencias reguladoras. Por ejemplo, secuencias implicadas en la regulación negativa de la transcripción se pueden separar de modo que se refuerce la expresión de un gen de interés.

En un aspecto, una molécula de ácido nucleico recombinante de la descripción incluye una secuencia de ácidos nucleicos o gen que codifica al menos un producto génico bacteriano (*p. ej.* una enzima biosintética de metionina) enlazado operativamente a un promotor o secuencia de promotor. Promotores preferidos incluyen promotores de *Corynebacterium* y/o promotores de bacteriófagos (*p. ej.* bacteriófagos que infestan *Corynebacterium*). En una realización, un promotor es un promotor de *Corynebacterium*, preferiblemente un promotor fuerte de *Corynebacterium* (*p. ej.* un promotor asociado con un gen de control interno bioquímico en *Corynebacterium*). En otra realización, un promotor es un promotor de bacteriófago. Promotores preferidos adicionales, por ejemplo para uso en microorganismos Gram-positivos, incluyen, pero no se limitan a promotores de superóxido dismutasa, *groEL*, factor de elongación Tu, *amy* y SPO1. Promotores preferidos adicionales, por ejemplo para uso en microorganismos Gram-negativos, incluyen, pero no se limitan a *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacIQ*, T7, T5, T3, *gal*, *trc*, *ara*, SP6, λ -PR o λ -PL.

En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico recombinante de la descripción incluye una secuencia de terminador o secuencias de terminador (*p. ej.* secuencias de terminador de la transcripción). La expresión “secuencias de terminador” incluye secuencias reguladoras que sirven para terminar la transcripción de ARNm. Secuencias de terminador (o terminadores de la transcripción en tándem) pueden servir adicionalmente para estabilizar ARNm (*p. ej.* añadiendo estructura al ARNm) por ejemplo frente a nucleasas.

Todavía en otro aspecto, una molécula de ácido nucleico recombinante de la descripción incluye secuencias que permiten la detección del vector que contiene dichas secuencias (*es decir*, marcadores detectables y/o seleccionables), por ejemplo genes que codifican secuencias de resistencia a antibióticos o que superan mutaciones auxotróficas, por ejemplo *trpC*, marcadores de fármacos, marcadores fluorescentes y/o marcadores colorimétricos (*p. ej.* *lacZ*/ β -galactosidasa). Todavía en otro aspecto, una molécula de ácido nucleico recombinante de la descripción incluye un sitio de unión a ribosoma (RBS - siglas en inglés) artificial o una secuencia que es transcrita en un RBS artificial. La expresión “sitio de unión al ribosoma RBS artificial” incluye un sitio dentro de una molécula de ARNm (*p. ej.* codificada dentro de ADN) a la que se une un ribosoma (*p. ej.* para iniciar la traducción), que difiere de un RBS nativo (*p. ej.* un RBS encontrado en un gen que se produce en la naturaleza) en al menos un nucleótido. RBSs artificiales preferidos incluyen aproximadamente 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14, 15-16, 17-18, 19-20, 21-22, 23-24, 25-26, 27-28, 29-30 o más nucleótidos, de los cuales aproximadamente 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-15 o más difieren del RBS nativo (*p. ej.* RBS nativo de un gen de interés).

La presente descripción ofrece, además, vectores (*p. ej.* vectores recombinantes) que incluyen moléculas de ácidos nucleicos (*p. ej.* genes o moléculas de ácidos nucleicos recombinantes que comprenden dichos genes) según se describe en esta memoria. La expresión “vector recombinante” incluye un vector (*p. ej.* plásmido, fago, fagémido, virus, cósmido u otro vector de ácido nucleico purificado) que ha sido alterado, modificado o tratado mediante ingeniería de manera que contiene un número de secuencias de ácidos nucleicos mayor, menor o diferente que las incluidas en la molécula de ácido nucleico nativa o natural de la que se derivó el vector recombinante. Preferiblemente, el vector recombinante incluye un gen codificador de una enzima biosintética o una molécula de ácido nucleico recombinante que incluye dicho gen, operativamente enlazada a secuencias reguladoras, por ejemplo secuencias de promotor, secuencias de terminador y/o sitios de unión al ribosoma (RBS) artificial, según se define en esta memoria. En otro aspecto, un vector recombinante de la descripción incluye secuencias que refuerzan la replicación en bacterias (*p. ej.* secuencias reforzadoras de la replicación). En un aspecto, las secuencias reforzadoras de la replicación funcionan en *E. coli* o *C. glutamicum*. En otro aspecto, secuencias reforzadoras de la replicación se derivan de pBR322.

Todavía en otro aspecto, un vector recombinante de la descripción incluye secuencias de resistencia a antibióticos. La expresión “secuencias de resistencia a antibióticos” incluye secuencias que fomentan o confieren resistencia a antibióticos en el organismo hospedador (*p. ej.* *Corynebacterium*). En un aspecto, las secuencias de resistencia a antibióticos se seleccionan del grupo que consiste en secuencias *cat* (de resistencia a cloranfenicol), secuencias *tet* (de resistencia a tetraciclina), secuencias *erm* (de resistencia a eritromicina), secuencias *neo* (de resistencia a neomicina), secuencias *kan* (de resistencia a canamicina) y secuencias *spec* (de resistencia a espectinomomicina). Vectores recombinantes de la descripción pueden incluir, además, secuencias de recombinación homólogas (*p. ej.* secuencias diseñadas para permitir la recombinación del gen de interés en el cromosoma del organismo hospedador). Además, por parte un experto en la técnica se apreciará que el diseño de un vector se puede adaptar dependiendo de factores tales como la elección del microorganismo a ser tratado mediante ingeniería genética, el nivel de expresión del producto génico deseado y similar.

Se apreciará, además, por parte de un experto en la técnica que el diseño de un vector se puede adaptar en función de factores tales como la elección del microorganismo a ser tratado mediante ingeniería genética, el nivel de expresión del producto génico deseado y similares.

ES 2 355 942 T3

“Campbell in” (recombinación tipo Campbell por integración) tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un transformante de una célula hospedadora original en el que se ha integrado una molécula de ADN de doble hebra, circular, completa (por ejemplo un plásmido) en un cromosoma mediante un único evento de recombinación homóloga (un evento de cruzamiento integrado) y que resulta eficazmente en la inserción de una versión linearizada de dicha molécula de ADN circular en una primera secuencia de ADN del cromosoma que es homóloga a una primera secuencia de ADN de dicha molécula de ADN circular. “Campbellled in” (integrado según Campbell) se refiere a la secuencia de ADN linearizada que ha sido integrada en el cromosoma de un transformante “Campbell in”. Un “Campbell in” contiene una duplicación de la primera secuencia de ADN homóloga, cada una de cuyas copias incluye y rodea a una copia del punto de entrecruzamiento de la recombinación homóloga. El nombre procede del profesor Alan Campbell, quién propuso por primera vez este tipo de recombinación.

“Campbell out” (recombinación tipo Campbell por delección), tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una célula que desciende de un transformante “Campbell in”, en el que ha ocurrido un segundo evento de recombinación homóloga (un evento de cruzamiento por delección) entre una segunda secuencia de ADN que está contenida en el ADN insertado linearizado del ADN “Campbellled in” y una segunda secuencia de ADN de origen cromosómico que es homóloga a la segunda secuencia de ADN de dicho inserto linearizado, resultando el segundo evento de recombinación en la delección (desprendimiento) de una porción de la secuencia de ADN integrada pero, de manera importante, resultando también en una porción (ésta puede ser tan pequeña como una sola base) del ADN “Campbellled in” integrado que permanece en el cromosoma, de manera que, comparada con la célula hospedadora original, la célula “Campbell out” contiene uno o más cambios intencionados en el cromosoma (por ejemplo una sustitución de una sola base, sustituciones de múltiples bases, inserción de un gen heterólogo o secuencia de ADN, inserción de una copia o copias adicionales de un gen homólogo o un gen homólogo modificado, o inserción de una secuencia de ADN que comprende más de uno de estos ejemplos antes mencionados, arriba listados).

Una célula o cepa “Campbell out” se obtiene habitualmente, pero no necesariamente, mediante una contra-selección frente a un gen que está contenido en una porción (la porción de la que se desea desprenderse) de la secuencia de ADN “Campbell in”, por ejemplo el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que es letal cuando se expresa en una célula que crece en presencia de sacarosa a aproximadamente el 5% al 10%. Ya sea con o sin una contra-selección, una célula “Campbell out” deseada se puede obtener o identificar mediante el rastreo de la célula deseada, utilizando cualquier fenotipo rastreable tal como, pero no limitado a la morfología de la colonia, al color de la colonia, a la presencia o ausencia de resistencia a antibióticos, la presencia o ausencia de una secuencia de ADN dada mediante reacción en cadena de la polimerasa, la presencia o ausencia de una auxotrofia, la presencia o ausencia de una enzima, hibridación de ácido nucleico de la colonia, rastreo de anticuerpos, etc. Las expresiones “Campbell in” y “Campbell out” también se pueden utilizar como verbos en diversos tiempos para referirse al método o proceso descrito anteriormente.

Ha de entenderse que los eventos de recombinación homóloga que conducen a una “Campbell in” o “Campbell out” pueden producirse a lo largo de un intervalo de bases de ADN dentro de la secuencia de ADN homóloga y, dado que las secuencias homólogas serán idénticas entre sí, para al menos parte de este intervalo, no es habitualmente posible especificar con exactitud donde se produjo el evento de entrecruzamiento. En otras palabras, no es posible especificar con precisión qué secuencia procedía originalmente del ADN insertado y cual era originalmente del ADN cromosómico. Además de ello, la primera secuencia de ADN homóloga y la segunda secuencia de ADN homóloga están habitualmente separadas por una región de una no homología parcial, y es esta región de no homología la que queda depositada en un cromosoma de la célula “Campbell out”.

Por motivos prácticos, en *C. glutamicum*, primera y segunda secuencias de ADN homólogas típicas tienen una longitud de al menos aproximadamente 200 pares de bases y pueden ser de una longitud de hasta varios miles de pares de bases, pero puede hacerse que el proceso trabaje con secuencias más cortas o más largas. Por ejemplo, una longitud para la primera y segunda secuencias homólogas puede oscilar entre aproximadamente 500 y 2000 bases, y la obtención de una “Campbell out” a partir de una “Campbell in” viene facilitada al disponer la primera y segunda secuencias homólogas de modo que sean aproximadamente de la misma longitud, preferiblemente, con una diferencia menor que 200 pares de bases y, lo más preferiblemente, constituyendo la más corta de las dos al menos el 70% de la longitud de la más larga en pares de bases.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deberían considerarse como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación de la cepa M2014

La cepa ATCC 13032 de *C. glutamicum* fue transformada con ADN A (al que se alude también como pH273) (SEQ ID N°:1) y fue “Campbellled in” para proporcionar una cepa “Campbell in”. La Figura 2 muestra una vista esquemática del plásmido pH273. La cepa “Campbell in” fue entonces “Campbellled out” para proporcionar una cepa “Campbell out”, M440, que contiene un gen que codifica una enzima homoserina dehidrogenasa resistente a la retroalimentación (*hom^{tblr}*). La proteína homoserina deshidrogenasa resultante incluía un cambio en los aminoácidos, en que S393 fue cambiado a F393 (al que se alude como *Hsdh* S393F).

ES 2 355 942 T3

Subsiguientemente, la cepa M440 fue transformada con ADN B (al que también se alude como pH373) (SEQ ID N°:2) para proporcionar una cepa “Campbell in”. La Figura 3 representa una vista esquemática del plásmido pH373. La cepa “Campbell in” fue entonces “Campbelled out” para proporcionar una cepa “Campbell out”, M603, que contiene un gen que codifica una enzima aspartato quinasa resistente a la retroalimentación (*Ask^{Ibr}*) (codificada por *lysC*). En la proteína aspartato quinasa resultante, T311 fue cambiado a I311 (al que se alude como LysC T311I).

Se encontró que la cepa M603 producía lisina aproximadamente 17,4 mM, mientras que la cepa ATCC13032 no producía cantidad medible alguna de lisina. Adicionalmente, la cepa M603 producía homoserina aproximadamente 0,5 mM 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

La cepa M603 fue transformada con ADN C (al que también se alude como pH304, del que en la Figura 4 se representa una vista esquemática) (SEQ ID N°:3) para proporcionar una cepa “Campbell in”, que luego fue “Campbelled out” para proporcionar una cepa “Campbell out”, M690. La cepa M690 contenía un promotor PgroES aguas arriba del gen MetH (al que se alude como P₄₉₇ *metH*) (la secuencia de ácidos nucleicos de P₄₉₇ se recoge en SEQ ID N°:12). La cepa M690 producía lisina aproximadamente 77,2 mM y homoserina aproximadamente 41,6 mM, según se muestra a continuación en la Tabla 3.

TABLA 3

Cantidades de homoserina, O-acetil homoserina, 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

La cepa M690 se sometió subsiguientemente a mutagénesis como sigue: un cultivo de una noche de M603, hecho crecer en medio BHI (BECTON DICKINSON), se lavó en tampón citrato 50 mM pH 5,5, se trató durante 20 min a 30°C con N-metil-N-nitrosoguanidina (10 mg/ml en citrato 50 mM pH 5,5). Después del tratamiento, las células se lavaron de nuevo en tampón citrato 50 mM pH 5,5 y se extendieron en placas en un medio que contenía los siguientes ingredientes: (todas las cantidades mencionadas se calculan para 500 ml de medio) 10 g de (NH₄)₂SO₄; 0,5 g de KH₂PO₄; 0,5 g de K₂HPO₄; 0,125 g de MgSO₄·7H₂O; 21 g de MOPS; 50 mg de CaCl₂; 15 mg de ácido protocatecuico; 0,5 mg de biotina; 1 mg de tiamina; y 5 g/l de D,L-metionina (SIGMA CHEMICALS, N° DE CATÁLOGO E5139), ajustada a pH 7,0 con KOH. Además, el medio contenía 0,5 ml de una disolución de metales traza compuesta por: 10 g/l de FeSO₄·7H₂O; 1 g/l de MnSO₄·H₂O, 0,1 g/l de ZnSO₄·7H₂O, 0,02 g/l de CuSO₄; y 0,002 g/l de NiCl₂·6H₂O, todos ellos disueltos en HCl 0,1 M. El medio final se esterilizó mediante filtración y al medio se añadieron 40 ml de disolución estéril de glucosa al 50% (40 ml) y agar estéril hasta una concentración final de 1,5%. El medio que contenía el agar final se vertió en placas de agar y se marcó como medio de etionina mínimo. Las cepas sometidas a mutagénesis se esparcieron sobre las placas (etionina mínimo) y se incubaron durante 3-7 días a 30°C. Se aislaron los clones que crecieron en el medio y se volvieron a inocular por estrías en el mismo medio de etionina mínimo. Se seleccionaron varios clones para el análisis de la producción de metionina.

ES 2 355 942 T3

La producción de metionina se analizó como sigue: las cepas se hicieron crecer en medio de agar CM 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 Bacto Peptone (DIFCO); 5 g/l de extracto de levadura (DIFCO); 5 g/l de extracto de carne (DIFCO); 22 g/l de agar (DIFCO); y que se sometió a autoclave durante 20 min a aproximadamente 121°C.

Después de crecer las cepas, las células se separaron mediante raspado y se resuspendieron en NaCl 0,15 M. Para el cultivo principal, se añadió una suspensión de células raspadas a una DO de partida de 600 nm a aproximadamente 1,5 a 10 ml de medio II (véase más abajo), junto con 0,5 g de CaCO₃ sólido y sometido en autoclave (RIEDEL DE HAEN) y las células se incubaron en un matraz con agitación de 100 ml sin hendiduras internas durante 72 h en una plataforma de agitación horizontal a aproximadamente 200 rpm y a 30°C. El medio II contenía: 40 g/l de sacarosa; 60 g/l de azúcares totales procedentes de melazas (calculados para el contenido en azúcares); 10 g/l de (NH₄)₂SO₄; 0,4 g/l de MgSO₄·7H₂O; 0,6 g/de KH₂PO₄; 0,3 mg/l de tiamina. HCl; 1 mg/l de biotina; 2 mg/l de FeSO₄·; y 2 mg/l de MnSO₄. El medio se ajustó a pH 7,8 con NH₄OH y se sometió en autoclave a aproximadamente 121°C durante aproximadamente 20 min. Después de someter en autoclave y de enfriar, se añadió vitamina B₁₂ (cianocobalamina) (SIGMA CHEMICALS) procedente de una disolución de partida estéril del filtro (200 µg/ml) hasta una concentración final de 100 µg/l.

Las muestras se tomaron del medio y se ensayaron en cuanto al contenido en aminoácidos. Los aminoácidos producidos, incluida metionina, se determinaron utilizando el método de aminoácidos de Agilent en un sistema Agilent 1100 Series LC System HPLC. (AGILENT). Una derivatización de la muestra en la pre-columna con orto-ftalaldehído permitió la cuantificación de los aminoácidos producidos después de la separación en una columna Hypersil AA (AGILENT).

Se aislaron los clones que mostraban un título de metionina que era al menos el doble que en M690. Un clon de este tipo, utilizado en experimentos posteriores, se denominó M1179 y se depositó el 18 de mayo de 2005 en la colección de cepas de DSMZ como cepa número DSM 17322. La producción de aminoácidos por parte de esta cepa se comparó con la de la cepa M690, según se resume a continuación 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

La cepa M1179 se transformó con ADN F (al que también se alude como pH399, del que en la Figura 5 se representa una vista esquemática) (SEQ ID N°:4) para proporcionar una cepa "Campbell in", la cual fue subsiguientemente "Campbelled out" para proporcionar la cepa M1494. Esta cepa contiene una mutación en el gen para la homoserina quinasa, que resulta en un cambio de aminoácidos en la enzima homoserina quinasa resultante de T190 a A190 (a la que se alude como HskT190A). La producción de aminoácidos por parte de la cepa M1494 se comparó con la producción por parte de la cepa M1197, según se resume a continuación en la Tabla 5.

TABLA 5

Cantidades de homoserina, O-acetilhomoserina, metionina y lisina producidas por las cepas LU11197 y M1494

Cepa	Homoserina (mM)	O-acetil homoserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
M1179	26,4	1,9	0,7	79,2
M1494	18,3	0,2	2,5	50,1

ES 2 355 942 T3

La cepa M1494 se transformó con ADN D (al que también se alude como pH484, del que en la Figura 6 se representa una vista esquemática) (SEQ ID N°:5) para proporcionar una cepa “Campbell in”, la cual fue subsiguientemente “Campbelled out” para proporcionar la cepa M1990. La cepa M 1990 sobre-expresa un alelo *metY* utilizando tanto un promotor groES como un promotor EFTU (factor de elongación Tu) al que se alude como P₄₉₇ P₁₂₈₄ *metY* (la secuencia de P₄₉₇ P₁₂₈₄ se muestra en SEQ ID N°:6). La producción de aminoácidos por parte de la cepa M1494 se comparó con la producción por parte de la cepa M1990, según se resume a continuación en la Tabla 6.

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

La cepa M1990 se transformó con ADN E (al que también se alude como pH491, del que en la Figura 7 se representa una vista esquemática) (SEQ ID N°:7) para proporcionar una cepa “Campbell in”, la cual fue subsiguientemente “Campbelled out” para proporcionar una cepa M2014 “Campbell out”. La cepa M 2014 sobre-expresa un alelo *metA* utilizando tanto un promotor de superóxido dismutasa (al que se alude como P₃₁₁₉ *metA*). La producción de aminoácidos por parte de la cepa M2014 se comparó con la producción por parte de la cepa M2014, según se resume a continuación en la Tabla 7.

TABLA 7

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

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

Ejemplo 2

Auxótrofos de metionina de *C. glutamicum* incorporan disulfuro de dimetilo en metionina

Con el fin de determinar si *C. glutamicum* tiene la capacidad de incorporar DMDS en metionina, se construyó una delección de *metF* en la cepa M2014 (descrita en el Ejemplo 1). M2014 se transformó con el plásmido pOM86 (Figura 9) (SEQ ID N°:8) para proporcionar una cepa “Campbell in”. La cepa “Campbell in” fue luego “Campbelled out” para proporcionar una cepa “Campbell out” denominada OM63. Con el fin de determinar si este auxótrofo de metionina, OM63, podía utilizar DMDS para sintetizar metionina, cultivos en tubos de ensayo de OM63 y de M2014 parental se sometieron a ensayo en cuanto al crecimiento midiendo la DO a 600 nm. Los cultivos se hicieron crecer en medio exento de metionina (en cuanto a la receta, véase más abajo), medio exento de metionina suplementado con metionina o medio exento de metionina suplementado con diversas cantidades diferentes de DMDS (Aldrich, n° de Catálogo 32.041-2). Este experimento se diseñó para determinar si DMDS puede atravesar la membrana de la bacteria, reducirse en metano-tiol una vez que se encuentra dentro del citoplasma y utilizarse subsiguientemente por parte de MetY o Met B u otra enzima, por ejemplo MetC, como un sustrato en unión con *O*-acetil-homoserina para formar L-metionina directamente. Este experimento también se diseñó para determinar la toxicidad de DMDS, si es que existiera, sobre el crecimiento de las células.

Tal como se muestra en la Tabla 8, los auxótrofos *metF* de *C. glutamicum* pueden utilizar DMDS como sustrato para el crecimiento y, por lo tanto, para la producción de metionina. Además, las densidades ópticas eran similares para

ES 2 355 942 T3

5 todas las cepas en los tubos de ensayo que contenían 5 ml de medio exento de metionina suplementado con DMDS al 0,02%, 0,04% ó 0,06%. Los tubos de ensayo que contenían 5 ml de medio exento de metionina suplementado con DMDS al 0,08% o al 0,1% mostraban un pequeño crecimiento o ninguno, presumiblemente debido a la toxicidad de DMDS a estas concentraciones. Finalmente, según lo esperado, medio exento de metionina sin DMDS sustentaba el crecimiento de M2014, pero no de OM63.

TABLA 8

10 *Densidades ópticas a 600 nm de cultivos en tubos de ensayo¹ de C. glutamicum desarrollados en medio exento de metionina con o sin metionina suplementada o disulfuro de dimetilo (DMDS) durante 36 horas a 30°C*

Cepa	Genotipo	Exento de Met ² (EM)	EM + Met ³	EM + DMDS al 0,02%	EM + DMDS al 0,04%	EM + DMDS al 0,06%	EM + DMDS al 0,08%	EM + DMDS al 0,1%
M2014	Parental	5,6	5,8	5,5	5,3	6,6	0,0	0,0
OM63	<i>ΔmetF</i>	0,0	5,2	5,4	5,9	5,2	0,2	0,0

25 ¹Los cultivos en tubos de ensayo estaban bien envueltos con parafilm alrededor del tapón metálico

30 ²Medio exento de metionina suplementado ³suplementado exento de Met con 40 mg/ml de metionina.

35 Los resultados de este experimento demuestran que DMDS puede recogerse y escindirarse de forma reductiva en metano-tiol por parte de *C. glutamicum* y entrar en la vía de la metionina para sustentar el crecimiento de un auxótrofo de metionina. Alternativamente, DMDS es un sustrato directo para O-acetil-homoserina sulfhidrilasa u O-O-succinil-homoserina sulfhidrilasa u otra enzima. En otras palabras, es posible que una sola enzima pueda catalizar la escisión reductiva y la incorporación de DMDS en metionina.

Medio exento de metionina - 1 litro

40 100 ml de medio de ensayo de metionina Difco™ (105 g/l)

100 ml de sales 10x de Spizizen*

45 6 ml de glucosa (al 50%)

4 ml de disolución "4B"***

100 mg de treonina

50 40 mg de cisteína

785 ml de dH₂O

55 5 ml de CaCl₂ al 2%.

**** Disolución 4B**

60 tiamina (B₁) - 0,25 mg/ml

cianocolbalamina (B₁₂) - 50 μg/ml

biotina - 28 μg/ml en KPO₄ 50 mM pH = 7,0

65 piridoxina HCl - 1,25 mg/ml.

ES 2 355 942 T3

*Sales 10x de Spizizen**

20 g/l de sulfato de amonio

5 174 g/l de fosfato potásico dibásico (trihidrato)

60 g/l de fosfato potásico monobásico (anhidro)

10 g/l de citrato de sodio

10 2 g/l de sulfato de magnesio (heptahidrato).

Después de someter en autoclave, añadir 3,5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ al 0,4% y 1 ml de disolución de micronutrientes¹

15 ¹*Disolución de micronutrientes*

0,15 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

20 2,5 g de H_3BO_3

0,7 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

1,6 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

25 0,3 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

Una versión sólida de este medio se puede preparar incluyendo aproximadamente 15 a 20 g/L de agar. Esto se consigue mediante procesos convencionales tal como añadiendo 20 g de agar a aproximadamente 750 ml de agua, sometiéndolo en autoclave y, mientras sigue estando fundido, añadiendo los ingredientes arriba listados en forma de disoluciones de partida estériles.

Ejemplo 3

35 *Desarrollo de un sistema de suministro de DMDS a C. glutamicum para la incorporación en metionina*

Como se ha comentado anteriormente, DMDS es tóxico si se añade directamente a cultivos líquidos en cantidades mayores que aproximadamente 0,06%. Con el fin de superar este problema, se buscó un sistema de suministro que permitiera la liberación lenta de DMDS en disolución a lo largo del tiempo. Amberlite™ XAD4, una resina de poliestireno macroporosa en forma de perlas, a la que se alude en lo que sigue como “XAD4”, se eligió como sistema de suministro debido a que es inerte, capaz de absorber pequeños compuestos orgánicos hidrófobos, es capaz de ser humedecida por el agua y tiene una superficie específica elevada y un tamaño de poros pequeño.

Se llevó a cabo un experimento en tubos de ensayo con el fin de determinar la cantidad máxima de DMDS que puede ser adsorbida por XAD4 y que todavía permita el crecimiento. Para este fin, se llevaron a cabo experimentos en tubo de ensayo utilizando 5 ml de medio sobre OM63 y M2014. Cada uno de los tubos de ensayo contenía 100 μl de una suspensión al 50% (v/v) de XAD4 y medio exento de metionina, medio exento de metionina suplementado con metionina o medio exento de metionina suplementado con diversas cantidades de DMDS.

Se prepararon ensayos en tubo de ensayo añadiendo 5 ml de medio exento de metionina a tubos de ensayo estériles de 20 mm x 20 mm x 150 mm, cubiertos con tapones de metal no ajustados. A cada uno de los tubos de ensayo se añadieron 100 μl de una suspensión estéril de XAD4 en agua (al 50% v/v). Los tubos de ensayo se inocularon con células que se hicieron crecer durante una noche en tubos de ensayo que contenían medio BHÍ (Bacto™ Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) y luego se hicieron rotar y se aclararon dos veces con medio exento de metionina. Las células se resuspendieron en el 50% del volumen de partida en medio exento de metionina. La suspensión de células (5 μl) se utilizó como inóculo para cada uno de los tubos de ensayo. Después de la inoculación de las células, se añadió DMDS a cada uno de los tubos de ensayo a la concentración indicada (v/v). Los tubos de ensayo se incubaron a 30°C a 200 rpm en un agitador con plataforma durante 24-48 horas. El crecimiento de las células se midió mediante densidad óptica a 600 nm empleando un espectrofotómetro Genesys™ 2.

60 Tal como se muestra en la Tabla 9, las densidades ópticas eran bastante

similares para todas las cepas en los tubos de ensayo que contenían medio exento de metionina suplementado con DMDS al 0,1%, 0,2%, 0,3% ó 0,4%. Los tubos de ensayo suplementados con DMDS al 0,5% mostraron un efecto negativo sobre el crecimiento en OM63, pero esta concentración de DMDS parecía ser tolerada por M2014. En conclusión, la adsorción de DMDS sobre perlas de XAD4 permite añadir más DMDS a cultivos en tubos de ensayo líquidos de *C. glutamicum*. Se libera suficiente DMDS a partir de las perlas para permitir el crecimiento completo de un auxótrofo de metionina.

ES 2 355 942 T3

TABLA 9

Densidades ópticas a 600 nm de OM63 y M2014 desarrollados en medio exento de metionina¹ con o sin las cantidades indicadas de DMDS en presencia de XAD4² durante 42 horas a 30°C

Cepa	DMDS al 0%	DMDS al 0,1%	DMDS al 0,2%	DMDS al 0,3%	DMDS al 0,4%	DMDS al 0,5%	Met 40 mg/l
OM63	0,0	6,3	6,5	4,9	3,6	1,6	4,4
M2014	6,4	6,6	6,9	7,3	7,3	5,5	7,1

¹ Medio exento de metionina ² Cada uno de los tubos de ensayo contiene 5 ml de medio más 100 µl de una suspensión al 50% de Amberlite XAD4. Porosidad = 0,5 ml/ml.

Se añadió DMDS después de inocular a los tubos de ensayo.

Inóculo-las células se hicieron crecer durante una noche en tubos de ensayo que contenían BHI y luego se hicieron rotar y aclararon 2 veces con medio exento de Met. Las células se resuspendieron en el 50% del volumen de partida. La suspensión de células (5 µl) se utilizó como inóculo para cada tubo de ensayo.

Además, XAD4 solo no tiene efecto adverso aparente alguno sobre el crecimiento de las células. Según lo esperado, los tubos de ensayo que contenían medio exento de metionina sin DMDS sustentaron el crecimiento de M2014, pero no de OM63. Tubos de ensayo que contenían medio exento de metionina suplementado con 40 mg/l de metionina, pero sin DMDS, dieron como resultado una densidad óptica final similar para M2014, pero una densidad óptica algo menor que la esperada para OM63. Esto puede ser debido a que XAD4 adsorbe algo de la metionina suplementada, limitando así el crecimiento de células OM63.

Ejemplo 4

DMDS en estado gaseoso puede sustentar la síntesis de metionina y el crecimiento de OM101 ($\Delta metB$, $\Delta metF$)

Se ha demostrado previamente que un análogo de DMDS, diselenuro de dimetilo (DMDS_{Se}) es tóxico para los microorganismos en un estado gaseoso pero que podía utilizarse para seleccionar mutantes que carecen de *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa (Brzywczy, J., y Paszewski, A. (1994) *Yeast* 9: 1335-1342 y Treichler, H. J., *et al.* (1978) en el Simposium de FEMS nº 5, págs. 177-199, R. Hutter *et al.*, comp., Academic Press, Nueva York). El DMDS_{Se} se introdujo en forma de una gota en la cara inferior de la cubierta de una placa de Petri para dar una concentración final de aproximadamente 5 µM, si el suministro completo de DMDS_{Se} se difundía y disolvía en el agar. Sin embargo, no se mencionó el compuesto DMDS y no era obvio si la difusión a través de un estado gaseoso podía aportar concentraciones suficientes de DMDS para el crecimiento (en oposición a la inhibición de análogos). Para fines comparativos, en los experimentos de crecimiento en líquidos de los Ejemplos 1-3 anteriores, la concentración de DMDS era aproximadamente 10 mM (por ejemplo en el caso de 0,1%) o aproximadamente 2000 veces superior a la de DMDS_{Se} en las referencias arriba citadas. Sin embargo, el suministro de DMDS en el estado gaseoso podría evadir la toxicidad que se observó con DMDS líquido.

Para testar esta posibilidad, céspedes que contenían aproximadamente 10⁸ células de OM101 ($\Delta metB$, $\Delta metF$) se aclararon hasta quedar relativamente exentos de metionina y se extendieron en placas de agar exentas de metionina que contenían aproximadamente 25 ml de medio agar. DMDS se suministró salpicando 50 µl en el centro de la placa o cortando un pocillo en el agar en el centro de la placa y colocando 50 µl de DMDS en el pocillo. Si el DMDS se difundía a través de la placa, la concentración final sería de aproximadamente 25 mM. Placas control recibieron el césped de células, pero nada de DMDS. Las placas se colocaron juntas en una caja de plástico de polipropileno cerrada herméticamente que era ligeramente mayor que la pila de placas, y se incubaron a 30°C durante 48-60 horas. Las placas salpicadas con DMDS directamente sobre el césped tenían una zona de exterminio de aproximadamente 30 mm desde la cual se salpicó el DMDS líquido, pero el resto de la placa estaba cubierto uniformemente con un césped de crecimiento. Placas que contenían DMDS líquido colocadas en un pocillo no tenían zona de exterminio, sino un césped de crecimiento que cubría uniformemente a toda la placa, incluida la periferia de la placa y justo hasta el pocillo del centro. Normalmente, cuando un nutriente requerido se coloca en el centro de un césped que es auxotrófico para el nutriente, se observa un gradiente de crecimiento, produciéndose el crecimiento más rápido en

la zona más próxima al nutriente. Finalmente, placas control sin DMDS añadido, pero colocadas en la misma caja de plástico cerrada herméticamente con placas que recibieron DMDS, dieron céspedes completos de crecimiento de OM101. Estas observaciones sugirieron que el crecimiento de los auxótrofos de *C. glutamicum* podía ser sustentado por la difusión de DMDS en el estado gaseoso.

Con el fin de demostrar la transferencia gaseosa, se llevó a cabo un experimento en el que cavidades circulares (25 x 25 x 5 mm) se cortaron desde el centro del agar de placas exentas de metionina, previamente rociadas con un césped de OM101. En estas cavidades se colocaron tubos cónicos con tapones roscados de polipropileno rojo estériles ((20 x 20 x 5 mm) de Sarstedt® (N° 62.554.002)), que servían como copas para 50 µl de DMDS líquido. Este método aseguraba que el DMDS líquido no entrara en contacto directo con las células y que sólo pudiera alcanzar a las células por difusión a través de un estado gaseoso, ya que DMDS no se difunde rápidamente a través del polipropileno. Las placas se incubaron a 30°C encerradas en una caja de plástico estanca al aire. Las placas de control para este experimento eran placas exentas de metionina rociadas con un césped de OM101 y se incubaron a 30°C en ausencia de DMDS en una caja de plástico cerrada *separada*. Al cabo de dos días se observó que un césped bacteriano completo cubría las placas que tenían la tapa estéril que contenía DMDS líquido y que las placas control, que carecían de DMDS, en un recipiente separado, no mostraron crecimiento alguno. Estos experimentos, tomados juntos, indican que el contacto directo de DMDS líquido es necesario para la toxicidad de OM101 y que, en contraposición, DMDS en estado gaseoso no es tóxico, sino que puede seguir utilizándose por parte de OM101 para el crecimiento y, por lo tanto, la síntesis de metionina. Así, en un tanque de fermentación, DMDS podía ser suministrado a las células en un estado gaseoso con el fin de evitar la toxicidad de DMDS a las células en el estado líquido. Esto se pudo conseguir evaporando o calentando a ebullición DMDS y bombeando el vapor de DMDS en el recipiente de fermentación, o burbujeando aire u oxígeno a través de DMDS líquido en su recorrido al recipiente de fermentación.

Ejemplo 5

Construcción de una cepa ΔmetE, ΔmetH

Se construyó una cepa de *C. glutamicum* que está desprovista tanto de *metE* como de *metH*. M2014 se transformó con el plásmido pH469 (Figura 10) (SEQ ID N°:9) para proporcionar una cepa “Campbell in”. Después, la cepa “Campbell in” fue “Campbelled out” para proporcionar una cepa “Campbell out”, OM228C-2, que contiene la delección *metE*. Después, OM228C-2 se transformó con el plásmido pH300 (Figura 11) (SEQ ID N°:10) para proporcionar una cepa “Campbell in”. La cepa “Campbell in” fue luego “Campbelled out” para proporcionar una cepa “Campbell out”, OM246C, que contiene tanto *ΔmetE* como *ΔmetH*. Como era de esperar, dos aislados de la cepa de doble delección, OM246C-1 y OM246C-2, son auxótrofos de metionina y no producen metionina en los cultivos en tubos de ensayo en medio de melazas.

Ejemplo 6

MetY es el responsable de la mayor parte de la actividad enzimática que cataliza la reacción entre metano-tiol con O-acetil-homoserina para la producción de metionina

Dado que informes de la bibliografía sugieren que MetB (Flavin, M. y S. Slaughter 1967. *Biochim. Biophys. Acta*, 132:400-405; Kanzaki, H. *et al.* 1987. *Eur. J. Biochem.* 163: 105-112; Kiene, R. P. *et al.* 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4549-4558) o MetZ (Yamagata, S. 1971. *J. Biochem.* (Tokyo) 70: 1035) podría estar implicado en la incorporación de metano-tiol, se llevó a cabo un experimento con un derivado de OM63 que contenía un alelo *ΔmetB* para identificar la enzima implicada en la incorporación de metano-tiol en *C. glutamicum*. Como se demostró anteriormente, *C. glutamicum* puede incorporar disulfuro de dimetilo (DMDS), a través de metano-tiol, directamente en metionina. En el Ejemplo 3, se determinó que DMDS es tolerado por las células si se añade directamente a cultivos líquidos en cantidades menores que aproximadamente 0,06%, pero si se añade en presencia de un sistema de suministro tal como el adsorbente Amberlite™ XAD4, las cantidades de DMDS añadido a cultivos líquidos pueden incrementarse 5 veces antes de que se observe una toxicidad.

El auxótrofo de metionina OM63 (*ΔmetF*) se utilizó para experimentos de “prueba de concepto” que demuestran que *C. glutamicum* puede utilizar DMDS para sustentar el crecimiento de un auxótrofo de metionina *ΔmetF*. Con el fin de definir adicionalmente cual o cuales enzimas están implicadas en la incorporación de metano-tiol en metionina en *C. glutamicum*, cepas que contenían una delección en *metB* se sometieron a ensayo en cuanto a su capacidad para crecer en presencia de DMDS.

OM101C (*ΔmetF, ΔmetB*), derivado de OM63 transformado con H216, que contiene el mismo alelo de delección *metB* que pSH315 (Hwang BJ, *et al.* *J. Bacteriol.* 2002, Mar; 184 (5): 1277-86) para suprimir *metB*, OM246c (*ΔmetH, ΔmetE*) descrito en el Ejemplo 4, OM63 (*ΔmetF*) y M2014 se hicieron crecer en tubos de ensayo que contenían 100 µl de una suspensión al 50% de Amberlite XAD4 y medio exento de metionina o medio exento de metionina suplementado con diversas cantidades de DMDS. Tal como se muestra en la Tabla, 10, las densidades ópticas eran similares para todas las cepas en los tubos de ensayo que contenían medio exento de metionina suplementado con DMDS al 0,1 ó 0,2%. Todas las cepas eran capaces de crecer en medio exento de metionina suplementado con DMDS al 0,4%, con la excepción de OM101C, que mostró una inhibición del crecimiento en DMDS al 0,3%. Únicamente la cepa OM246C era capaz de crecer en presencia de DMDS al 0,5%. Tomados juntos, estos resultados demuestran que MetB, MetH/MetE y MetF no son necesarios para la incorporación de metano-tiol en metionina. Por lo tanto, MetY es suficiente para la actividad enzimática que permite la incorporación de DMDS en metionina.

Tabla 10: Densidades ópticas a 600 nm de OM63, OM101C, OM246C y M2014 desarrollados en tubos de ensayo en medio exento de metionina¹ durante 24 horas a 30°C con las cantidades indicadas de DMDS en presencia de Amberlite XAD4².

Cepa	Parental Genotipo	DMDS al 0%	DMDS al 0,1%	DMDS al 0,2%	DMDS al 0,3%	DMDS al 0,4%	DMDS al 0,5%	met 100 mg/ml
OM63	ΔmetF	0,0	3,0	1,7	3,9	1,5	0,1	2,4
		0,0	3,3	3,4	2,1	1,6	0,1	3,0
OM101C	ΔmetF	0,0	2,5	3,1	1,6	0,05	0,02	1,9
		0,0	2,7	3,9	0,8	0,03	0,01	2,1
OM246C	ΔmetE	0,0	4,3	4,2	3,3	3,6	3,1	3,9
		0,0	4,5	3,8	3,6	3,2	2,4	4,3
M2014	parental	4,3	4,4	4,0	3,8	1,3	0,07	4,4
		4,1	4,3	4,2	3,5	2,3	0,03	4,7

¹Medio exento de metionina

²Cada uno de los tubos de ensayo contiene 5 ml de medio más 100 μl de una suspensión al 50% de XAD4. Los tubos de ensayo se inocularon después de añadir XAD4 y DMDS. Inóculo - las células se hicieron crecer durante una noche en tubos de ensayo que contenían BHI y luego se hicieron rotar y se aclararon 2 veces con medio exento de Met. Las células se resuspendieron en 50% del volumen de partida. Para cada uno de los tubos de ensayo se utilizaron, como inóculo, 5 μl de la suspensión de célula

Ejemplo 7

Identificación de MetY como la enzima con actividad de O-acetilhomoserina metanol-tiol sulfhidrilasa

5 Aquí los autores de la invención demuestran directamente que MetY, pero no MetB, es la enzima necesaria y suficiente para la actividad de O-acetilhomoserina metanol-tiol sulfhidrilasa. Se llevó a cabo un experimento en tubos de ensayo con derivados de M2014 que contenían diferentes combinaciones de delecciones de *metY*, *metB* y *metF*. Las cepas se hicieron crecer en medio exento de metionina con perlas de Amberlite™ XAD4 y con o sin DMDS a 200 mg/l o metionina a 100 mg/l. El inóculo era aproximadamente de 5×10^3 células por tubo. Las células se hicieron crecer a 30°C en un agitador de plataforma durante 60 horas y las densidades de células se midieron a DO₆₀₀.

15 Tal como se muestra en la Tabla 11, DMDS puede sustentar el crecimiento de los auxótrofos de metionina OM63 ($\Delta metF$) y OM101 ($\Delta metF$, $\Delta metB$), pero DMDS no puede sustentar el crecimiento de cualquier auxótrofo de metionina que contenga una delección *metY* tal como OM158 u OM174. OM158 se construyó transformando OM63 con el plásmido pH215 (SEQ ID N°: 11) para proporcionar una cepa “Campbell in”. La secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID N°:11 es la región en pH215 del gen *metY* suprimido, que se extiende desde el codón de inicio de *metY*, residuos 1-3, al codón de detención de *metA*, residuos 912-914. Las dos bases que rodean a la delección se encuentran en los residuos 609-610. Después, la cepa “Campbell in” fue “Campbell out” para proporcionar una cepa “Campbell out”, OM158, que contiene $\Delta metF$, $\Delta metY$. OM174 se construyó transformando OM101 con el plásmido pH215 para proporcionar una cepa “Campbell in”. La cepa “Campbell in” fue luego “Campbell out” para proporcionar una cepa “Campbell out”, OM174, que contiene $\Delta metF$, $\Delta metB$, $\Delta metY$. La Figura 8 muestra la estructura del cromosoma de *C. glutamicum* en la región de *metY* antes (8A) y después (8B) de la delección de una porción de *metY* utilizando el plásmido pH215.

25 Estos datos demuestran que MetY es la única enzima responsable de la actividad de O-acetil homoserina metanol-tiol sulfhidrilasa y que ni MetB ni MetC contienen un nivel suficiente de esta actividad enzimática para el crecimiento bajo estas condiciones.

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 11: DO_{600} de cepas desarrolladas en tubos de ensayo en medio exento de metionina durante 60 horas a 30°C con o sin DMDS al 0,2% y Amberlite XAD4.

Cepa	Parental	Genotipo relevante	DMDS al 0%	DMDS al 0,2%	Met 100 mg/ml
M2014			2,3 2,3	3,6 4,5	2,3 2,2
OM63	M2014	$\Delta metF$	0,0 0,0	1,2 1,3	1,6 1,9
OM158	OM63	$\Delta metF, \Delta metY$	0,0 0,0	0,0 0,0	3,2 2,7
OM101	OM63	$\Delta metF, \Delta metB$	0,0 0,0	2,4 1,8	1,8 1,8
OM174	OM101	$\Delta metF, \Delta metB, \Delta metY$	0,0 0,0	0,0 0,0	1,5 1,2

Ejemplo 8

Eficacia de la producción de metionina en cepas auxotróficas de C. glutamicum

5 Una vez que se estableció que un auxótrofo de *C. glutamicum*, $\Delta metF$ o $\Delta metE$ o $\Delta metH$ podía utilizar DMDS para la síntesis de metionina, era interesante determinar la eficacia de la producción de metionina. Se llevó a cabo un experimento en matraz agitador en el que OM246C se comparó con M2014. Cada matraz agitador contenía 20 ml de medio de melazas y 800 μ l de una suspensión al 50% de Amberlite™ XAD4, con o sin DMDS al 0,4%. Tal como se muestra en la Tabla 12, OM246C sin DMDS acumulaba poca metionina. En contraposición OM246C suplementado con DMDS acumulaba aproximadamente 0,3 g/l de metionina. Así, la producción de metionina se produce de la conversión de *O*-acetil-homoserina directamente en metionina, eludiendo la homocisteína. Lo más importante, el incremento neto en el título de metionina en OM246C, hecha crecer en presencia de DMDS, establece firmemente que metionina puede ser producida por mutantes de *C. glutamicum* defectuosos en la última etapa de la síntesis de la metionina cuando está presente DMDS. La cepa control M2014 acumulaba perfiles similares de aminoácidos, ya creciera en presencia de DMDS o no. De manera interesante, DMDS estimulaba ligeramente la producción de metionina en M2014 desde aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 0,7 g/l. Esto se explica por un efecto aditivo de la incorporación de DMDS en combinación con la producción de metionina a partir de las vías biosintéticas de metionina convencionales.

20

(Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 12: Estudio en matraz agitado de M2014 y OM246C desarrollados en medio de melazas¹ a 30°C con o sin DMDS² al 0,4%.

Cepa	DMDS	Glu ³	Gly + Hse	O-Ac-hse	Met	Ile	Lys	DO ₆₀₀
2014	0 µl	0,0	1,2	5,4	0,5	0,0	2,6	33
		0,0	1,6	4,4	0,4	0,0	2,9	34
OM246C	80 µl	0,1	1,4	3,6	0,7	0,0	2,5	30
		0,0	1,0	4,3	0,6	0,0	2,5	38
OM246C	0 µl	5,3	0,7	0,3	0,0	0,1	1,8	32
		3,0	0,7	1,1	0,0	0,2	1,7	30
OM246C	80 µl	0,0	1,7	4,6	0,4	0,0	3,2	32
		0,2	1,3	4,3	0,2	0,0	3,4	35

¹Medio de melazas suplementado con extracto de levaduras al 1%, biotina, B₁, B₁₂, B₆ y 100 mg/l de treonina.

²Cada uno de los matraces agitados contiene 20 ml de medio más 800 µl de una suspensión al 50% de XAD4. Los matraces agitados se inocularon después de añadir XAD4 y 80 µl de DMDS (con o sin). La concentración final de DMDS añadido es 0,4% v/v

³Inóculo.- las células se hicieron crecer durante una noche en tubos de ensayo que contenían BHI y luego se hicieron rotar y se aclararon 2 veces con medio exento de Met. Las células se resuspendieron en 50% del volumen de partida. Para cada uno de los matraces agitados se utilizaron, como inóculo, 100 µl de la suspensión de células.

³Los aminoácidos se reseñan en g/l

Ejemplo 9

Desarrollo adicional de un sistema de suministro de DMDS a C. glutamicum para la incorporación en metionina

5 Con el fin de explorar adicionalmente potenciales sistemas de suministro de DMDS (además de Amberlite™
XAD4), se investigaron tanto aceite mineral blanco pesado (Sigma n° de cat. 400-5) como un aceite vegetal, aceite
de colza. Dado que los aceites son hidrófobos, deberían ser capaces de disolver el DMDS y permitir, en potencia, la
liberación lenta de DMDS en el medio acuoso. Aceite (0,5 ml) que contenía cantidades diversas de DMDS disuelto
10 se añadió a los tubos de ensayo que contenían 5 ml de medio exento de metionina con o sin 100 mg/l de metionina.
Densidades ópticas de los cultivos celulares que contenían concentraciones finales de 0, 0,2, 0,4, 0,8 y 1,2% de DMDS
se midieron después de la incubación a 30°C durante 24 horas en un agitador de plataforma. Tal como se muestra en
la Tabla 13, el crecimiento de OM246C se producía en tubos de ensayo que contenían DMDS hasta al 0,4% mien-
tras que el crecimiento de M2014 se producía en tubos de ensayos que contenían DMDS hasta al 0,8% disuelto en
15 aceite mineral. Sin embargo, las densidades ópticas eran menos de la mitad en comparación con las de cultivos en
tubos de ensayo que contenían medio exento de metionina sin aceite mineral. La cantidad máxima de DMDS en el
aceite mineral comparada con Amberlite™ XAD4 que permitía el crecimiento de las células era ligeramente superior
para M2014 (0,8% frente a 0,4%), pero similar para OM63 (0,4% frente a 0,4%). Se observaron resultados similares
cuando el aceite de colza se sometió a ensayo como un sistema de suministro; sin embargo, el aceite de colza solo no
20 tiene un efecto tan negativo sobre el crecimiento de células como el aceite mineral (Tabla 14). El crecimiento reducido
en presencia de estos aceites puede ser debido, en parte, a la carencia de una aireación suficiente en los cultivos en
tubos de ensayo, una ruptura de la membrana de la célula o una combinación de ambos. No obstante, resulta obvio
que los aceites se pueden utilizar como un sistema de suministro para DMDS en fermentaciones. Aceites derivados
de fuentes animales, minerales, químicas o vegetales, o una combinación de las mismas, podrían utilizarse para el
suministro de DMDS a las células. Otros sistemas de suministro posibles incluyen aceites sintéticos, disolventes orgá-
25 nicos, clorocarburos, fluorocarburos o cloro-fluoro-carburos. Un enfoque adicional sería una alimentación de DMDS
controlada lenta que proporcione una concentración en estado estacionario a las células que sea inferior al nivel tóxico.
La selección de cepas de *C. glutamicum* resistentes a DMDS también aliviaría los aspectos de toxicidad por DMDS.
Finalmente, utilizando una especie hospedadora que sea inherentemente más resistente a la toxicidad frente a DMDS
también aliviaría este problema.

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 13: Densidades ópticas a 600 nm de cultivos en tubos de ensayo de *C. glutamicum* en medio exento de metionina con o sin metionina o disulfuro de dimetilo (DMDS) y aceite mineral durante 24 horas a 30°C.

Cepa	Genotipo	EM ¹	EM + Met ²	EM + aceite mineral ³	EM + Met + aceite mineral	EM + aceite mineral + DMDS al 0,2%	EM + aceite mineral + DMDS al 0,4%	EM + aceite mineral + DMDS al 0,8%	EM + aceite mineral + DMDS al 1,2%
M2014	parental	4,7	4,6	1,2	2,4	1,4	1,5	1,4	0,0
		4,8	4,8	1,9	1,1	1,2	1,3	1,7	0,0
OM246C	$\Delta metH$	0,0	4,9	0,0	1,5	1,1	1,2	0,0	0,0
	$\Delta metE$	0,0	4,7	0,0	1,8	1,6	1,5	0,0	0,0

¹Medio exento de metionina

²100 mg/ml de metionina

³0,5 ml de aceite mineral añadido a cada 5 ml de medio.

Tabla 14: Densidades ópticas a 600 nm de cultivos en tubos de ensayo de *C. glutamicum* en medio exento de metionina con o sin metionina o disulfuro de dimetilo (DMDS) y aceite de colza durante 24 horas a 30°C.

Cepa	Genotipo	EM ¹	EM + Met ²	EM + aceite de colza ³	EM + Met + aceite de colza	EM + aceite de colza + DMDS al 0,2%	EM + aceite de colza + DMDS al 0,4%	EM + aceite de colza + DMDS al 0,8%
M2014	parental	4,7	4,6	3,2	3,8	1,5	0,3	0,0
		4,8	4,8	3,6	1,4	3,5	1,3	0,1
OM246C	$\Delta metH$	0,0	4,9	0,0	3,7	1,9	1,1	0,0
	$\Delta metE$	0,0	4,7	0,0	3,0	1,7	1,3	0,0

¹Medio exento de metionina ²100 mg/l de metionina.

³0,5 ml de aceite de colza añadido a cada 5 ml de medio.

Ejemplo 10

Mejora de las cepas

5 El gen *metB* de *E. coli* ha sido mutado o ha evolucionado para utilizar metano-tiol (documento WO 2004/076659 A2). Procesos de selección similares se pueden aplicar utilizando auxótrofos de metionina, por ejemplo que carecen de MetE y MetH o MetF, pero utilizando DMDS antes que metano-tiol en el medio selectivo. Así, se pueden seleccionar microorganismos en cuanto a los que tengan una mayor capacidad de incorporar DMDS en metionina, comenzando con un auxótrofo de metionina que, por ejemplo, pueda producir *O*-acetil homoserina u *O*-succinil homoserina, pero
 10 que no pueda utilizar homocisteína, y seleccionando para el crecimiento, o un crecimiento más rápido, en un medio mínimo que carece de metionina pero que contiene DMDS, y con o sin mutagénesis por parte de productos químicos, radiación o alelos mutadores. Este tipo de selección se puede dirigir a un gen particular, por ejemplo un gen *metB*, un gen *metY*, un gen *metC*, o un gen *metI* (Auger *et al.*, 2002 *Microbiology* 148: 507-518), instalando el gen en un plásmido e introduciendo el plásmido en una cepa que carece (por delección o mutación) de la capacidad endógena
 15 de incorporar DMDS y llevando a cabo la selección como se ha descrito antes. Descendientes de microorganismos seleccionados de este tipo o genes aislados de microorganismos seleccionados de este tipo también son útiles para construir o derivar cepas de producción de metionina.

Ejemplo 11

20

E. coli puede metabolizar DMDS en metionina si se suministra con O-acetil homoserina sulfhidrilasa u O-succinil homoserina sulfhidrilasa

Auxótrofos de metionina de *E. coli* CGSC 3592 (*metF64*) y RY714B, un derivado *met E:Tn10*, Δ *metH* de MM294, también conocido como ATCC 33625 y CGSC 6315 (*endAI*, *thi-1*, *supE44*, *hsdR17*) se transformaron con pH357 (SEQ ID N°:13; un plásmido que expresa *metY* y *metX* de *C. glutamicum*), pH309 (SEQ ID N°:14, un plásmido que expresa *metY* de *C. glutamicum*) o pCLIK, que es un vector vacío relacionado con pH357 y pH309 que se replica en *E. coli* y *C. glutamicum*. (SEQ ID N°:15). La selección fue en cuanto a la resistencia al sulfato de canamicina a 25 mg/l en medio rico (agar de caldo Luria). Los seis transformantes se extendieron en placas en medio de agar exento
 30 de metionina, se cortó un pocillo en el centro del agar, se añadieron al pocillo 50 microlitos de DMDS y las placas se incubaron según se describe en el Ejemplo 4 a 30°C. Las dos cepas transformadas pH309 o pH357 crecieron en las placas, pero no creció cepa alguna transformada con el vector pCLIK vacío, demostrando que *metY* era necesario y suficiente para que *E. coli* utilizara DMDS para sintetizar metionina. Estos resultados sustentan el argumento de que *metY* tiene actividad tanto *O*-acetil homoserina sulfhidrilasa como *O*-succinil homoserina sulfhidrilasa, ya que RY714B/pH309, por ejemplo, se basa en la enzima MetA de *E. coli* que se sabe produce principalmente *O*-succinil homoserina.

Así, *E. coli*, si se trata mediante ingeniería según se describe en esta memoria, tiene la capacidad de importar DMDS, reducirlo e incorporarlo en metionina. Dado que *E. coli* y *C. glutamicum*, que no son organismos estrechamente relacionados, tienen ambos esta capacidad, los autores de la invención anticipan que una amplia diversidad de organismos tienen esta capacidad y que una amplia diversidad de organismos puede ser tratada mediante ingeniería para producir metionina utilizando DMDS como uno de los compuestos alimentados.

Ejemplo 12

45

Selección la enzima O-acetil homoserina sulfhidrilasa u O-succinil homoserina sulfhidrilasa resistente a la retroalimentación

Para producir metionina por vía biosintética, es deseable utilizar enzimas *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa y/u *O*-succinilhomoserina sulfhidrilasa resistentes a la retroalimentación. En muchos organismos, estas enzimas son inhibidas en cuanto a la retroalimentación por parte de metionina. Por ejemplo, MetY (*O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa) en *Corynebacterium glutamicum* es inhibida en cuanto a la retroalimentación por parte de metionina, que es contraproductiva para la síntesis de metionina. Se han descrito versiones mutadas de MetY que son supuestamente resistentes a la inhibición por parte de metionina (documento WO 2004/108894 A2), pero estas versiones pudieran no ser las mejores versiones para mejorar la biosíntesis de metionina. Así, sigue existiendo la necesidad de versiones de MetY resistentes a la retroalimentación, adecuadas. Dado que MetY ha demostrado en esta memoria ser una enzima que puede conferir crecimiento en DMDS, se desarrolló un nuevo esquema para seleccionar alelos *metY* útiles como sigue: una cepa de *C. glutamicum* que carece de MetF o MetE y MetH y, que opcionalmente, también carece de MetY, MeB y/o MetC, pero que se trata mediante ingeniería para la síntesis de *O*-acetil homoserina relativamente elevada, se transforma con un plásmido que expresa MetY tal como pH357 o pH309. La cepa resultante puede crecer en medio exento de metionina que contiene DMDS en virtud del MetY producido por el plásmido pH357 o pH309. Análogos de metionina tales como α -metil metionina, selenometionina, norleucina, trifluorometionina y hidroxamato de metionina, etionina, S-metil-cisteína y similares son rastreados en cuanto los que inhiben el crecimiento de la cepa. Un análogo que inhibe el crecimiento de la cepa lo hará en algunos casos mediante una inhibición de retroalimentación falsa de MetY. En otras palabras, el análogo se unirá al sitio de unión de metionina en MetY e inhibirá la actividad de la enzima. La selección (con o sin mutagénesis) de mutantes resistentes a dicho análogo dará como resultado variantes de MetY que sean resistentes a la unión del análogo y a metionina. ADN del plásmido se aísla de candidatos mutantes de este tipo y se vuelve a transformar en la cepa hospedadora activa y no mutada, y se determina si el fenotipo

ES 2 355 942 T3

resistente análogo es codificado por el plásmido introducido. Plásmidos que superan esta criba contendrán una o más mutaciones, algunas de las cuales conferirán la resistencia deseada a la retroalimentación a metionina.

5 El esquema descrito anteriormente para crear e identificar variantes de *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa resistentes a la retroalimentación es también apropiado para aislar variantes de la enzima *O*-succinilhomoserina sulfhidrilasa resistentes a la retroalimentación. El método es similar, pero el organismo de partida produce *O*-succinilhomoserina como un producto intermedio en lugar de *O*-acetilhomoserina, y el plásmido codifica una enzima *O*-succinilhomoserina sulfhidrilasa en lugar de *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa. En otras palabras, el plásmido contiene un gen *metZ* en lugar de un gen *metY*.

10 La selección antes descrita para MetY o MetZ resistentes a la retroalimentación también se puede llevar a cabo en organismos distintos de *C. glutamicum*. Por ejemplo, tal como se muestra en el Ejemplo 11 anterior, RY714B/pH309 de *E. coli* o CGSC 3592/pH357 de *E. coli*, etc. también pueden crecer en medio exento de metionina con DMDS, de modo que tales cepas también se pueden utilizar para seleccionar variantes deseables de MetY al crecer en medio exento de metionina que contiene DMDS, y seleccionar en cuanto a la resistencia a análogos de metionina. Dado que MetA de *E. coli* es también sensible a la inhibición por parte de metionina y a algunos análogos tal como α -metilmetionina (Usuda Y, Kurahashi O., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005 Junio; 71 (6):3228-34), la selección de los alelos *metY* deseables se puede reforzar utilizando un mutante *metA* de *E. coli* y suministrando MetA o MetX resistentes a la retroalimentación, por ejemplo con pH357 o utilizando un alelo *metA* que ya ha sido seleccionado en cuanto a la resistencia al análogo. En general, este método debería funcionar en una amplia diversidad de bacterias, levaduras, hongos, Archaea y plantas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir metionina, que comprende cultivar un microorganismo productor de metionina en presencia de un compuesto de sulfuro rematado con metilo, de manera que se produce metionina, en el que
- a) el compuesto de sulfuro rematado con metilo se selecciona del grupo que consiste en disulfuro de dimetilo (DMDS), trisulfuro de dimetilo, tetrasulfuro de dimetilo,
 - 10 b) el microorganismo productor de metionina se selecciona del grupo que consiste en bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas, levaduras y Archaea,
 - c) el microorganismo productor de metionina tiene al menos una enzima biosintética de metionina desregulada, seleccionada del grupo que consiste en
 - 15 c1) una *O*-acetil-homoserina sulfhidrilasa u *O*-succinil-homoserina sulfhidrilasa desregulada
 - c2) una homoseriana acetiltransferasa u homoserina succiniltransferasa desregulada y una homoserina deshidrogenasa desregulada
 - 20 c3) una *O*-acetil-homoserina sulfhidrilasa desregulada y una homoserina acetiltransferasa desregulada o una *O*-succinil-homoserina sulfhidrilasa desregulada y una homoserina succiniltransferasa desregulada.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo pertenece a género *Corynebacterum*.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *Corynebacterum glutamicum*.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo pertenece al género *Escherichia*.
5. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, la etapa de aislar la metionina.
- 35 6. Uso de un microorganismo recombinante para la producción de metionina en presencia de disulfuro de dimetilo (DMDS), teniendo dicho microorganismo al menos una enzima biosintética de metionina desregulada elegida del grupo:
- a) una *O*-acetil-homoserina sulfhidrilasa u *O*-succinil-homoserina sulfhidrilasa desregulada
 - 40 b) una homoserina acetiltransferasa u homoserina succiniltransferasa desregulada y una homoserina deshidrogenasa desregulada
 - c) una *O*-acetil-homoserina sulfhidrilasa desregulada y una homoserina acetiltransferasa desregulada o una *O*-succinil-homoserina sulfhidrilasa desregulada y una homoserina succiniltransferasa desregulada.
- 45 7. El uso de la reivindicación 6, en el que el microorganismo pertenece al género *Corynebacterium*.
8. El uso de la reivindicación 7, en el que el microorganismo pertenece a *Corynebacterium glutamicum*.
- 50 9. El uso de la reivindicación 6, en el que el microorganismo pertenece al género *Escherichia*.
10. Un método para producir metionina de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, que comprende cultivar un microorganismo productor de metionina en presencia de un sistema de suministro de disulfuro de dimetilo (DMDS) de liberación lenta, de manera que se produce metionina.
- 55 11. El método de la reivindicación 10, en el que el sistema de suministro de DMDS de liberación lenta es Amberlite™ XAD4.
- 60 12. El método de las reivindicaciones 10 y 11, en el que el sistema de suministro de DMDS de liberación lenta libera DMDS en el cultivo a una concentración de 0,1% o mayor.
13. El método de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el sistema de suministro de DMDS de liberación lenta libera DMDS en el cultivo a una concentración de 0,3% o mayor.
- 65 14. El método de la reivindicación 10, en el que el sistema de suministro de DMDS de liberación lenta comprende un líquido que es inmiscible con agua, pero que disuelve DMDS.

ES 2 355 942 T3

15. El método de la reivindicación 14, en el que el sistema de suministro de DMDS de liberación lenta comprende un líquido seleccionado del grupo que consiste en: aceites animales, aceites minerales, aceites químicos, aceites vegetales, aceites sintéticos, un disolvente orgánico, clorocarburos, fluorocarburos, cloro-fluoro-carburos o una combinación de los mismos.

5

16. El método de la reivindicación 10, en el que el sistema de suministro de DMDS de liberación lenta es una alimentación de DMDS lenta controlada.

10

17. El método de la reivindicación 10, en el que el sistema de suministro de DMDS de liberación lenta es el flujo o la difusión de DMDS a través de una membrana que es permeable a DMDS.

18. El método de la reivindicación 10, en el que el sistema de suministro de DMDS de liberación lenta comprende alimentar DMDS en un estado gaseoso.

15

19. El método de la reivindicación 18, en el que el DMDS en un estado gaseoso se genera evaporando o calentando a ebullición DMDS líquido.

20

20. El método de la reivindicación 18, en el que el DMDS en un estado gaseoso se genera burbujeando aire u oxígeno a través de DMDS líquido.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

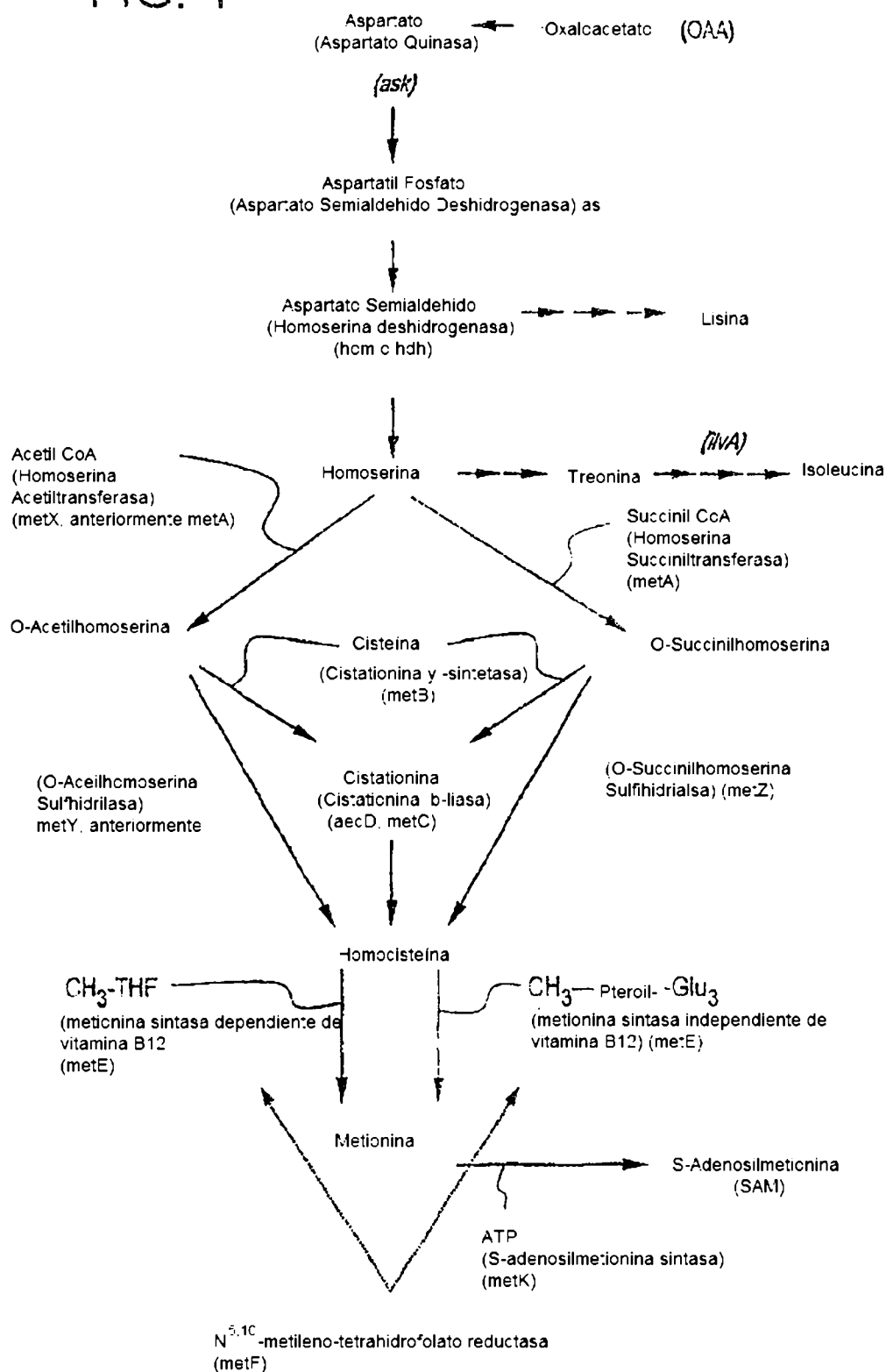


FIG. 2

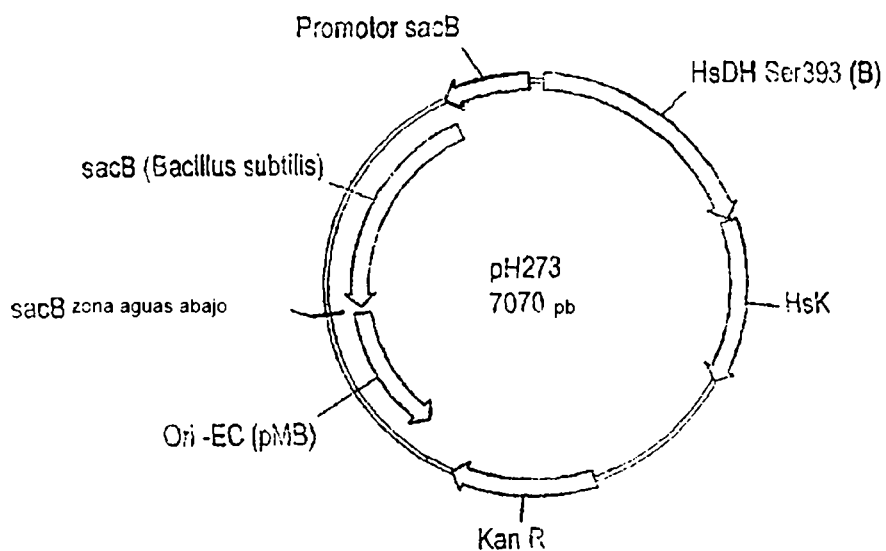


FIG. 3

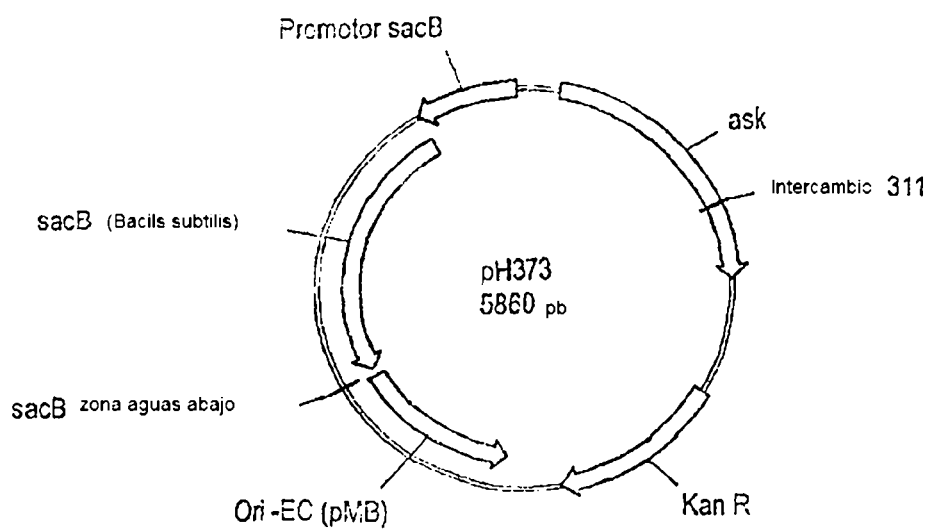


FIG. 4

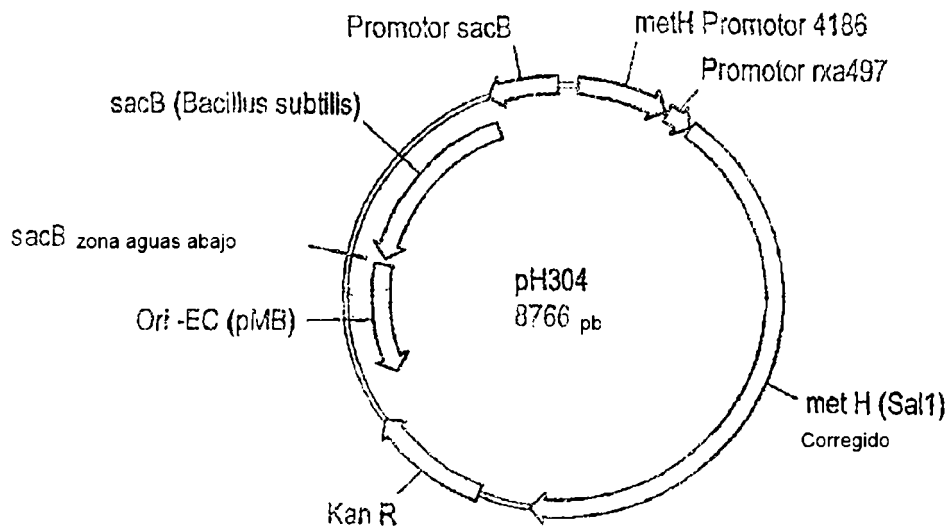


FIG. 5

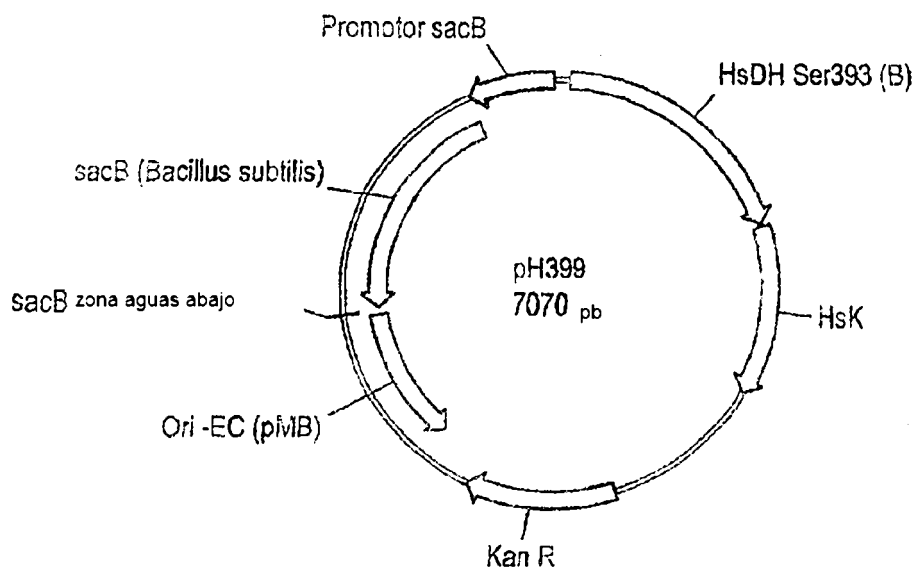


FIG. 6

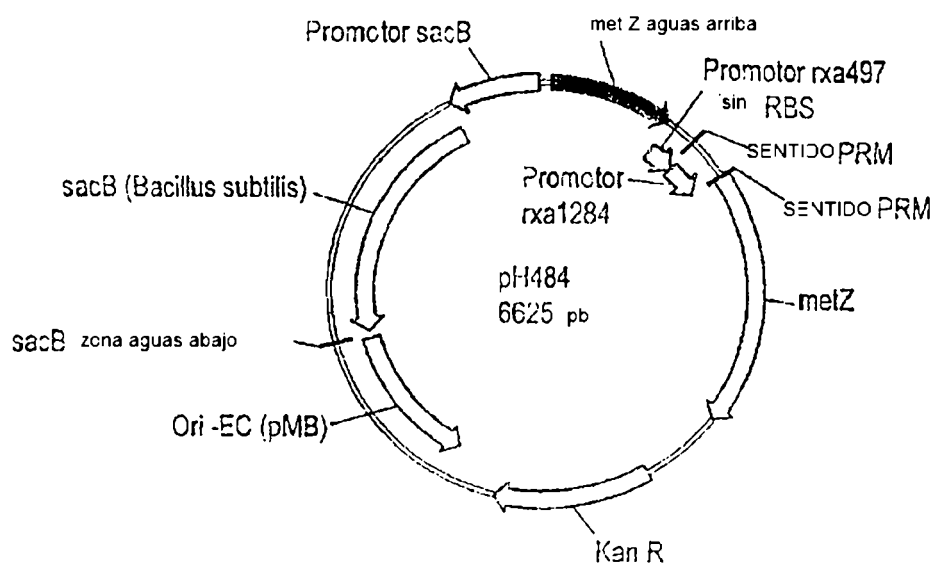


FIG. 7

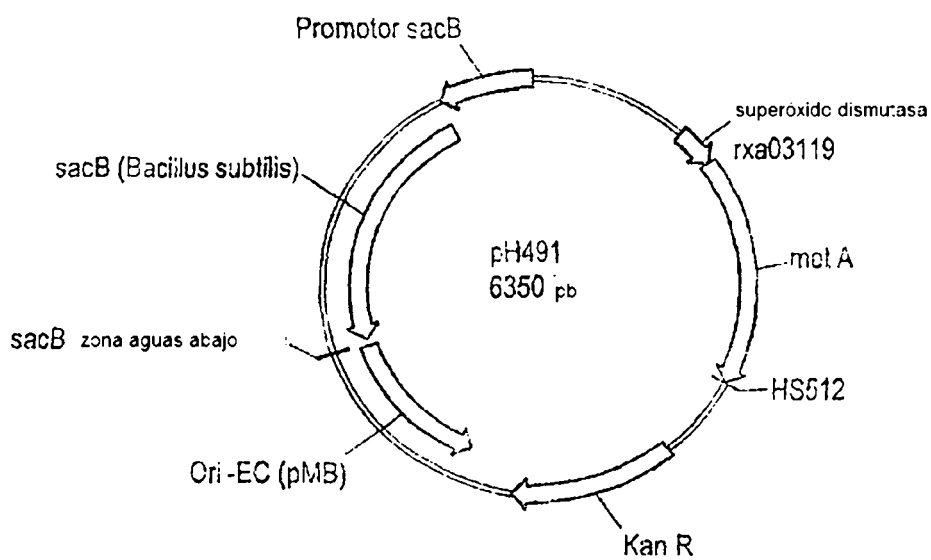


FIG. 8A

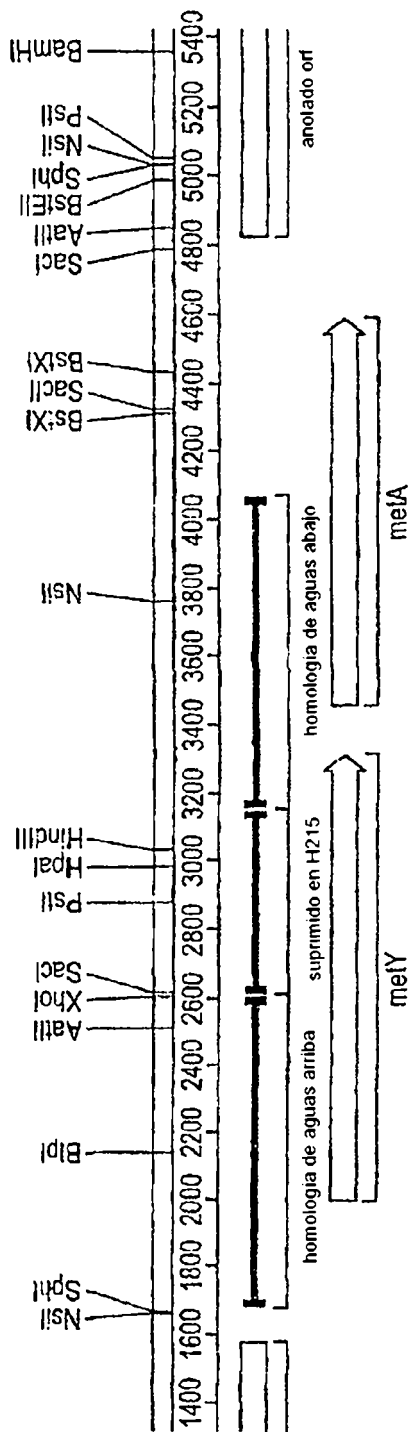


FIG. 8B

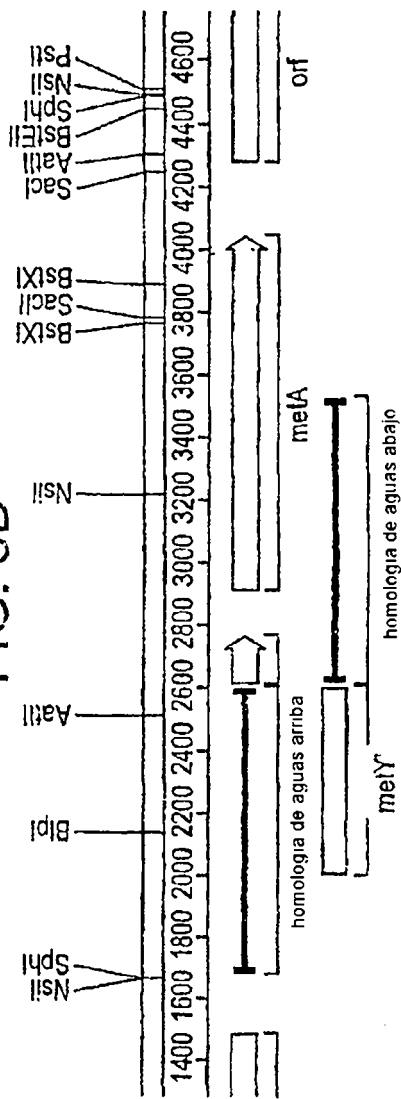


FIG. 9

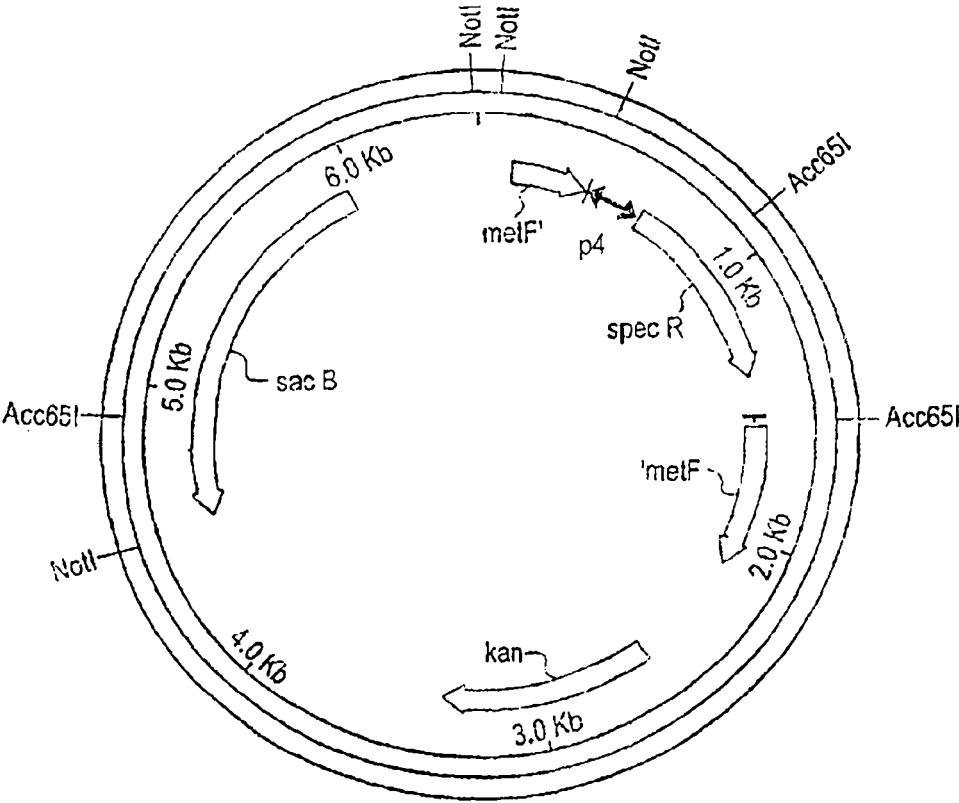


FIG. 10

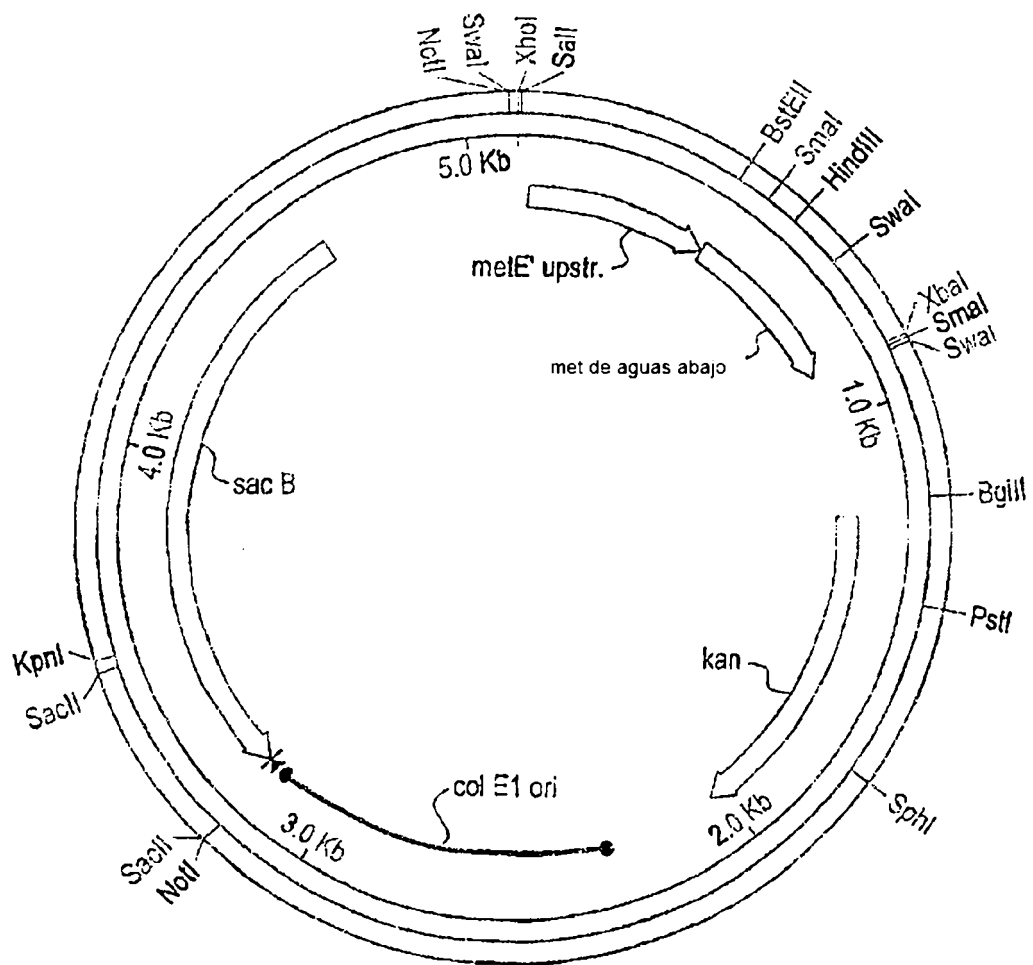
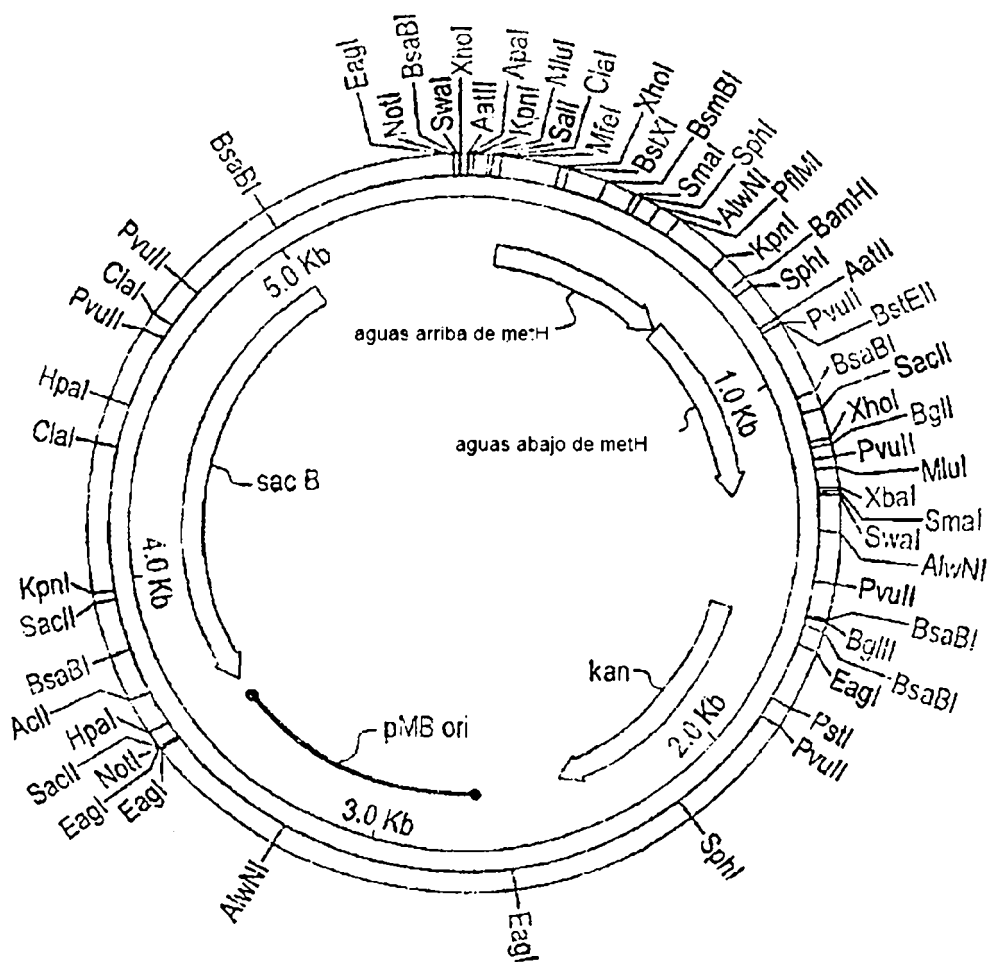


FIG. 11



ES 2 355 942 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BASF AG

5 <120> USO DE DISULFURO DE DIMETILO PARA LA PRODUCCIÓN DE METIONINA EN MICROORGANISMOS

10 <130> BGI-177PC

<140>

<141>

15 <150> 60/713.907

<151> 01-09-2005

20 <150> 60/700.698

<151> 18-07-2005

<160> 15

25 <170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 7070

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

40

45

50

55

60

65

ES 2 355 942 T3

<400> 1

5	tcgagaggcc	tgacgtcggg	cccggtagca	cgcgtcatat	gactagttgg	agaatcatga	60
	cctcagcatc	tgccccaagc	tttaaccccg	gcaaggggcc	cggctcagca	gtcgggaattg	120
	cccttttagg	attcgggaaca	gtcggcactg	aggtgatgcg	tctgatgacc	gagtacgggtg	180
	atgaacttgc	gcaccgcatt	ggtggcccac	tggaggttcg	tggcattgct	gtttctgata	240
	tctcaaagcc	acgtgaaggc	gttgcacctg	agctgctcac	tgaggacgct	tttgactca	300
10	tcgagcgcga	ggatggtgac	atcgtcgttg	aggttatcgg	cggcattgag	tacccacgtg	360
	aggtagttct	cgcagctctg	aaggccggca	agtctgttgt	taccgccaat	aaggctcttg	420
	ttgcagctca	ctctgctgag	cttgctgatg	cagcgggaagc	cgcaaacggt	gacctgtact	480
	tcgaggctgc	tggtgcaggc	gcaattccag	tggttgcccc	actgcgtcgc	tccttggtg	540
	gcgatcagat	ccagtctgtg	atgggcatcg	ttaacggcac	caccaacttc	atcttggtg	600
15	ccatggattc	caccggcgct	gactatgcag	attctttggc	tgaggcaact	cgtttggtt	660
	acgccgaagc	tgatccaact	gcagacgtcg	aaggccatga	cgccgcatcc	aaggctgca	720
	ttttggcatc	catcgttttc	cacaccctg	ttaccgcgga	tgatgtgtac	tgcaaggta	780
	tcagcaacat	cagcgtgccc	gacattgagg	cagcacagca	ggcaggccac	accatcaagt	840
	tggttgccat	ctgtgagaag	ttaccaaca	aggaaggaaa	gtcggctatt	tctgctcgcg	900
20	tgaccccgac	tctattacct	gtgtcccacc	caactggcgtc	ggtaaacaag	tcctttaatg	960
	caatctttgt	tgaagcagaa	gcagctggtc	gcctgatggt	ctacggaaac	ggtgcaggtg	1020
	gcgcgccaac	cgcgtctgct	gtgcttggcg	acgtcgttgg	tgccgcacga	aacaaggtgc	1080
	acggtggccg	tgctccaggt	gagtcacact	acgtaacct	gccgatcgtc	gatttcggtg	1140
	agaccaccac	tcgttaccac	ctcgacatgg	atgtggaaga	tcgctggtgg	gttttggtg	1200
25	aattggctag	cctgttctct	gagcaaggaa	tcttcctgcg	tacaatccga	caggaagagc	1260
	gcgatgatga	tgacgtctg	atcgtggtca	cccactctgc	gctggaatct	gatctttccc	1320
	gcaccggtga	actgctgaag	gctaagcctg	ttgttaaggc	aatcaacagt	gtgatccgcc	1380
	tcgaaaggga	ctaattttac	tgacatggca	attgaactga	acgtcggctc	taaggttacc	1440
	gtcacggtac	ctggatcttc	tgcaaacctc	ggacctggct	ttgacacttt	aggtttggca	1500
30	ctgtcggtat	acgacactgt	cgaagtggaa	attattccat	ctggcttggg	agtggaagt	1560
	tttggcgaag	gccaaaggca	agtccctctt	gatggctccc	acctggtggt	taaagctatt	1620
	cgtgctggcc	tgaaggcagc	tgacgtgaa	gttcctggat	tgcgagtggg	gtgccacaac	1680
	aacattccgc	agtctcgtgg	tcttggtctc	tctgctgcag	cgccggttgc	tggtgttct	1740
	gcagctaattg	gtttggcgga	tttcccgtg	actcaagagc	agattgttca	gttgcctct	1800
35	gcctttgaag	gccaccaga	taatgctgcg	gcttctgtgc	tgggtggagc	agtgggtgctg	1860
	tgacaaaatc	tgtctatcga	cggcaagagc	cagccacagt	atgctgctgt	accacttgag	1920
	gtgcaggaca	atattcgtgc	gactgcctg	gttcctaatt	tccacgcatc	caccgaagct	1980
	gtgcgccgag	tccttcccac	tgaagtcaat	cacatcgatg	cgcgatttaa	cgtgtcccgc	2040

40

45

50

55

60

65

ES 2 355 942 T3

5 gttgcagtga tgatcgttgc gttgcagcag cgtcctgatt tgctgtggga gggactcgt 2100
 gaccgtctgc accagcctta tcgtgcagaa gtgttgecta tfacctctga gtgggtaaac 2160
 cgctcgcgca accgtggcta cgcggcatac ctttccggtg ccggcccaac cgccatggtg 2220
 ctgtccactg agccaattcc agacaaggtt ttggaagatg ctcgtgagtc tggcattaag 2280
 gtgcttgagc ttgaggttgc gggaccagtc aaggttgaag ttaaccaacc ttaggccccaa 2340
 caaggaaggc ccccttcgaa tcaagaaggg ggccattatta gtgcagcaat tattcgctga 2400
 acacgtgaac cttacagggtg cccggcgctg tgagtggttt gaqgtccagc tggatgcggt 2460
 tgttttcacc gaggtcttct tggatgaatc cggcgtggat ggcgcagacg aaggctgatg 2520
 10 ggcggtttgc gttgaccaca aatgggcagc tgtgtagagc gagggagttt gcttcttcgg 2580
 tttcgggtggg gtcaaaagccc atttcgcgga ggcggttaat gagcggggag agggcttcgt 2640
 cgagttcttc ggttcggcg tggttaatgc ccatgacgtg tgcccactgg gttccgatgg 2700
 aaagtgcttt ggcgcggagg tccgggttgt gcattgcgtc atcgtcgaca tcgccgagca 2760
 tgttggccat gagttcgatc agggatgatg atctcttggc gacagcgcgg ttgtcgggga 2820
 15 cgcggttttg gaagatgagg gaggggcggg atcctctaga cccgggattt aaatcgctag 2880
 cggggtgcta aaggaaagcgg aacacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc 2940
 ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc 3000
 aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa 3060
 gcgaaccgga attgccagct ggggcgacct ctggttaagg tgggaagccc tgcaaagtaa 3120
 actggatggc tttcttgccg ccaaggatct gatggcgcaq gggatcaaga tctgatcaag 3180
 20 agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg aacaagatgg attgcaagca ggttctccgg 3240
 ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3300
 atgccgcctg gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggg tctttttgtc aagaccgacc 3360
 tgtccgggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3420
 cggggtcttc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3480
 25 tattggcgga agtgcggggg caggatctcc tgtcatctca ccttgcctct gccgagaaag 3540
 tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtc tgatccggct acctgcccat 3600
 tcgaccacca agcgaaacat cgcactcgac gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 3660
 tcgatcagga tga:ctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgca 3720
 ggctcaaggc gcgatgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgtccct 3780
 30 tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt calcgaclgt gcccggttg 3840
 gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg tgatattgct gaagagcttg 3900
 gcggcgaaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttaccggtat cgccgctccc gattcgcagc 3960
 gcatcgctt ctatcgctt cttgaccagt tctctgagc gggactctgg gyttcgaaa 4020
 gaccgaccaa ccgacgccc accctgctc tccctctcga gatccaccg ccgcttcta 4080
 35 tgaaaggttg ggcttcggaa tgcgtttccg ggaagccggc tggatgatcc tccagcggg 4140
 ggalctcatg ctggagtct tcgcccacgc taqcgccgcg ccggccggcc cgggtgtaaa 4200
 taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctctccgct tccctgcctca 4260
 ctgactcgct cgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaagcggc 4320
 taatacgtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaagccc 4380
 agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgcctggc gtttttccat aggetcccgc 4440
 40 cccctgacga gcatcaca aaatcgacgct caagtcaag gtggcgaaac ccgacaggac 4500
 tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctct gttccgacc 4560
 tgcccgcttac cggatacctg tccgcttcc aagcgtggcg ctttctata 4620
 gctcacgtg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtg 4680
 acgaaccccc cgttcagccc gaccgctcgc ccttatccgg taactatcgt cttagtcca 4740
 45 acccggtaaq acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 4800
 cgaggtatgt aggcggtgct acagagtct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta 4860
 gaaggacaqt atttggatc tcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagtg 4920
 gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcagg 4980
 agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatctt tctacgggt 5040
 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 5100
 50 ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg gccgcggccg ccatcgcat tttcttttg 5160
 gtttttattt gtttaactgtt aattgtcctt gttcaaggat gctgtcttg acaacagatg 5220
 ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctcgt 5280
 agaatcctct gtttgtcata tagctgttaa tcacgacatt gtttctttc gcttaggta 5340
 cagcgaagtg tqagtaagta aaggttacat cgttaggatc aagatccatt ttaacacaa 5400
 55 ggccagtttt gttcagcggc ttgtatggg cagttaaaga attagaaaca taaccaagca 5460
 tgtaaatatc gtttagacgta atgccgcaa tctctattt tgatccgcg gactcagtga 5520
 acaggtacca tttgcggttc attttaaaga cgttcgcgct ttcaatttca tctgttactg 5580
 tgttagatgc aatcagcggg ttcatacctt ttttcagtg gtaatcatg tttagctcaa 5640
 tcataccgag agcgcgggtt gctaaactcag ccgtgcgtt tttatcgct tgcaagaagt 5700
 tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtagctttg ttaaataaag 5760
 60 attcttcgcc ttggtagcca tcttcagtc cagtgttgc ttcaataact aagtattgt 5820
 ggcttttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt 5880
 tgccttcac gatgaactgc tqtacattt gatacgttt tccgtcaccg tcaaagattg 5940
 atttataat ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt 6000

65

ES 2 355 942 T3

```

gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac 6060
ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttcttgtgtt tgggtcttta 6120
ggatagaatc atttgcatcg aatttgcgc tgtctttaa gacgcggcca gcgttttcc 6180
agctgtcaat agaagtttcg ccgactttt gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg 6240
5  catttttagg atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag 6300
tgcogtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga 6360
tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata ttttccattt ttttgcgtgt 6420
cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatggt tccttatatg 6480
gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc tctgccagc agtgcggtag 6540
10  taaaggttaa tactgttgct tgtttgcaa acbttttgat gtccatcggt catgtctcct 6600
tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt 6660
tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact 6720
ttgcocctta cacattttag gtcttgccgt ctttatcagt aacaaaccg cgcatgttac 6780
15  ttttcgacct cattctatta gactctcggt tggattgcaa ctggtctatt ttctctttt 6840
gtttgataga aaatcataaa .aggatttgca gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta 6900
tctgtttctt ttcattctct gtatttttta tagttctctg tgcattggca taaagttgcc 6960
tttttaatca caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg 7020
caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg gcggccgctc gatttaaatc 7070

```

20 <210> 2

<211> 7070

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

30 <400> 2

```

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcata gactagttgg agaatcatga 60
cctcagcacc tgccccaagc tttaaecccc gcaagggtcc cggctcagca gtcggaattg 120
35  cccttttagg attcggaaaca gtccggactg aggtgatgcg tctgatgacc gagtacgggt 180
atgaacttgc gcaccgcatt ggtggccacc tggaggttcg tggcattgct gtttctgata 240
tctcaaagcc acgtgaaggc gttgcacctg agctgctcac tgaggacgct tttgcactca 300
tcgagcgcca ggatgttgac atcgtcgttg aggttatcgg cggcattgag taccacagtg 360
aggtagttct cgcagctctg aaggccggca agtctgttgt taccgccaat aaggctcttg 420
40  ttgcagctca ctctgctgag ctgctgatg cagcggaaagc cgcaaacggt gacctgtact 480
tcgaggctgc tgttgagggc gcaattccag tggttggccc actgctcgc tcctggctg 540
gcgatcagat ccagttctgt atgggcacatg ttaacggcac caccaacttc atcttggagc 600
ccatggattc caccggcgtc gactatgacg attctttggc tgaggcaact cgtttgggtt 660
acgccgaagc tgatccaact gcagacgtcg aaggccatga cggcgatcc aaggctgcaa 720
45  ttttggcatc catcgttttc cacaccgctg ttaccgcgga tgatgtgtac tgcgaaggta 780
tcagcaacat cagcgtgccc gacattgagg cagcacagca ggcaggccac accatcaagt 840
tgttggccat ctgtgagaag ttcaccaaca aggaaggaaa gtcggtatt tctgctcgcg 900
tgaccccgac tctattacct gtgtcccacc cactggcgtc ggtaaacaag tcctttaatg 960
caatctttgt tgaagcagaa gcagctggtc gectgatggt ctacggaaac ggttagggtg 1020
50  gcgcgccaac cgcgtctgct gtgcttggcg acgtcgttgg tgcgcgacga aacaagggtc 1080
acggtggccg tgctccaggt gactccacct acgctaacct gccgatcgtt gatttcgggtg 1140
agaccaccac tcgttaccac ctgcacatgg atgtggaaga tcgctggggg gttttggctg 1200
aattggctag cctgttctct gagcaaggaa tcttctcgcg tacaatccga caggaagagc 1260
gcgatgatga tgacagctct atcgtggtca cccactctgc gctggaatct gatctttccc 1320
gcaccgttga actgctgaag gctaagcctg ttgttaagge aatcaacagt gtgatccgcc 1380
55  tcgaaaggga ctaattttac tgacatggca attgaaactga acgtcggctc taaggttacc 1440
gtcacggtag ctggatcttc tgcaaacctc ggacctggtt ttgacacttt aggtttggca 1500
ctgtcggtat acgacactgt cgaagtggaa attattccat ctggcttggg agtggaggtt 1560
tttggcgaag gccaaaggcga agtccctctt gatggctccc acctgggtgt taaagctatt 1620
60  cgtgctggcc tgaaggcagc tgacgctgaa gttcctggat tgcgagtggt gtgccacaac 1680
aacattccgc agtctcgtgg tcttggctcc tctgctgcag cggcgggtgc tgggtgttct 1740
gcagctaatg gtttggcggg tttcccgtg actcaagagc agattgttca gttgtcctct 1800
gcctttgaag gccaccocaga taatgctcgc gttctgtgac tgggtggagc agtgggtgctg 1860
70  tggacaaatc tgtctatcga cggcaagagc cagccacagt atgctgctgt accacttgag 1920
gtgcaggaca atattcgtgc gactgcgctg gttcctaatt tccacgcatc caccgaagct 1980
gtgcgcccag tccttcccac tgaagtcact cacatcgatg cgcgatttaa cgtgtcccgc 2040
65  gttgcagtg tgatcgttgc gttgcagcag cgtcctgatt tgctgtggga gggactcgt 2100
gaccgtctgc accagcctta tctgtcagaa gtgttgccca ttacctctga gtgggtaaac 2160

```


ES 2 355 942 T3

5 cgctgcgca accgtggcta cgcggcatac ctttccgggtg ccggcccaac cgccatggtg 2220
 ctgtccactg agccaattcc agacaagggt ttggaagatg ctcgtgagtc tggcattaag 2280
 gtgcttgagc ttgaggttgc gggaccagtc aaggttgaag ttaaccaacc tttaggccaa 2340
 caaggaagc ccccttcgaa tcaagaaggg ggccttatta gtgcagcaat tattcgctga 2400
 acacgtgaac cttacaggtg cccggcgcgt tgagtggttt gagttccagc tggatgcggt 2460
 tgttttcacc gaggctttct tggatgaatc cggcgtggat ggcgcagacg aaggctgatg 2520
 ggcgtttgtc gttgaccaca aatgggcagc tgtgtagagc gagggagttt gcttcttcgg 2580
 tttcgggtggg gtcaaagccc atttcgcgga ggcgggttaat gagcggggag agggcttcgt 2640
 cgagttcttc ggcttcggcg tggtaatgc ccatgacgtg tgcccactgg gttccgatgg 2700
 10 aaagtgcttt ggcgcgagg tccgggttgt gcattgcgtc atcgtcgaca tcgccgagca 2760
 tgttggccat gaggttcgatc agggtgatgt attccttggc gacagcgcgg ttgtcgggga 2820
 cgcgtgtttg gaagatgagg gaggggcggg atcctctaga cccgggattt aaatcgctag 2880
 cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtc gcagaaacgg tgctgacccc 2940
 ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca aagaaagcgc 3000
 15 aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa 3060
 gcgaaccgga attgccagct ggggcgcct ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa 3120
 actggatggc tttcttgccg ccaaggatct gatggcgag gggatcaaga tctgatcaag 3180
 agacaggatg aggatcgttt cgcgatggg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3240
 cgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc acgctgctctg 3300
 20 atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggg tctttttgtc aagaccgacc 3360
 tgtccgggtc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3420
 cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3480
 tattggcgca agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag 3540
 tatccatcat ggtctgatgca atgcggcggc tgcatacgtc tgatccggct acctgcccat 3600
 25 tcgaccacca agcgaacat cgcacgcagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 3660
 togatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgccca 3720
 ggtcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct 3780
 tgccgaatat catggtgaa aatggccgct tttctggatt categactgt ggcggctgg 3840
 gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg tgatattgct gaagagcttg 3900
 gcggcgaatg ggctgaccgc ttctcgtgc tttacgggat cgccgctccc gatcgcagc 3960
 30 gcactgcctt ctatgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 4020
 gaccgaccaa ggcgagccca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgcttcta 4080
 tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg tggatgatcc tccagccggg tccagccggg 4140
 ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc tagcggcgcg ccggcgggcc cggtgtgaaa 4200
 taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tctcgtca 4260
 ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaagggcg 4320
 35 taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcagaaa gaacatgtga gcaaaagggc 4380
 agcaaaagcg caggaaccgt aaaaagcccg gtttgcctggc gtttttccat aggtccggcc 4440
 cccctgacga gcatcaaaa aatcgacgct caagtcaag gtggcgaaac ccgacaggac 4500
 tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gtccgaccc 4560
 tgccgcttac cggatacctg tccgctttc tccctcggg aagcgtggcg ctttctcata 4620
 40 gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggtcgtgctg 4680
 acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagttca 4740
 acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 4800
 cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta 4860
 gaaggacagt atttggatc tcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 4920
 45 gtagctcttg atccggcaaa aaccaccgc ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 4980
 agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacgggg 5040
 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 5100
 ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg gccgcggccg ccatcggcat tttcttttgc 5160
 gtttttattt gtttaactgtt aattgtcctt gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg 5220
 50 tttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctcgt 5280
 agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa tcacgacatt gtttctttc gcttgaggta 5340
 cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat cgttaggatc aagatccatt ttaacacaa 5400
 ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca 5460
 tgtaaatac gtttagacgta atgcccgtca attttaaaga tcgtcatttt tgatccgagg gagtcagtga 5520
 55 acaggtacca tttgccgttc attttaaaga cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg 5580
 tgtagatgc aatcagcggg ttcatacctt tttcagtggt gtaatcatcg tttagctcaa 5640
 tcataccgag agcgcgcttt gctaactcag ccgtgcgttt tttatcgtt tgcagaagtt 5700
 tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag 5760
 attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc cagtgtttgc ttcaataact aagatattgt 5820
 ggctttatc tctacgtag tgaggatctc cagcgtatg gttgtcgct gttgtcgct 5880
 60 tgccttcate gatgaactgc tgtacatttt gatacgtttt tccgtcaccg tcaagattg 5940
 atttataatc ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt 6000
 gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gttaccggga gaaatcagtg tagaataaac 6060
 ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttcttgtgtt tggcttttta 6120

65

ES 2 355 942 T3

```
5  ggatagaatc atttgcatcg aatttgtcgc tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc 6180
   agctgtcaat agaagtttcg cggacttttt gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg 6240
   ctttttagg atctccgget aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag 6300
   tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga 6360
   ttttttaat tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt 6420
   cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatggt tccttatatg 6480
   gcttttgggt cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc tcttgccagc agtgcggtag 6540
   taaaggtaa tactgttgct tgttttgcaa actttttgat gttcatcggt catgtctcct 6600
   tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt 6660
10 tagttacgca caataaaaa agacctaaaa tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact 6720
   ttgcccttta cacattttag gtcttgccctg ctttatcagt aacaaaccg cgcgatttac 6780
   ttttcgacct cattctatta gactctcgtt tggattgcaa ctgggtctatt ttctctttt 6840
   gtttgataga aaatcataaa aggatttgca gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta 6900
   tctgtttctt ttcattctct gtatttttta tagtttctgt tgcattgggca taaagttgcc 6960
15 tttttaatca caattcagaa aatataataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg 7020
   caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg gcggccgctc gatttaaadc 7070
```

20 <210> 3

<211> 8766

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 355 942 T3

<400> 3

```

5   tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtagca cgcgtcatat gactagttag gacctagga 60
   tatcgtcgac atcgtatgctc ttctgcgta attacaatt gggatctctc aactaatgca 120
   gcgatgcggt ctttccagaa tgctttcatg acagggatgc tgtcttgatc aggcaggcgt 180
   ctgtgctgga tgccgaagct ggatttattg tcgcctttgg aggtgaagtt gacgctcact 240
   cgagaatcat cggccaacca tttggcattg aatgttctag gttcggaggc ggaggttttc 300
10  tcaattagtg cgggatcgag ccaactgcgcc cgcaggatcat cgtctccgaa gagcttccac 360
   actttttcga ccggcagggtt aagggttttg gaggcattgg ccgcgaacct atcgttggtc 420
   atccccgggtt tgcgcatgcc acgttcgtat tcataaccaa tcgcatgccc ttgagccac 480
   cagccactga catcaaagtt gtccacgatg tgctttgcga tgtgggtgtg agtccaagag 540
   gtgtctttta cgtcgtcaag caattttagc cactcttccc acggctttcc ggtgcggtg 600
15  aggatagctt caggggacat gcctggtgtt gaggcttgcg gagtggagtc agtcatgcga 660
   ccgagactag tggcgctttg ggtaccgggc cccccctcga ggtcagcggg cttaaagttt 720
   ggctgccatg tgaattttta gcacctcaa cagttgagtg ctggcactct cgggggtaga 780
   gtgccaataa ggttgtttga cacacagttg ttcaccgcgc acgacggctg tgctgaaac 840
   ccacaaccgg cacacacaaa atttttctca tggagggatt catcatgtcg acttcagtta 900
20  cttcaccagc ccacaacaac gcacattctc ccgaattttt ggatgcggtg gcaaaccatg 960
   tgttgatcgg cgacggcgcc atgggcaccc agctccaagg ctttgacctg gacgtggaag 1020
   aggatttctt tgatctggag ggggtgaatg agattctcaa cgacaccgcg cctgatgtgt 1080
   tgaggcagat tcaccgcgcc tactttgagg cgggagctga ctgggttgag accaatactt 1140
   ttggttgcaa cctgccgaac ttggcggatt atgacatcgc tgatcgttgc cgtgagcttg 1200
25  cctacaaggg cactgcagtg gctagggaa gttgctgatga gatggggccg ggccgaaacg 1260
   gcatgcggcg tttcgtggtt ggttccctgg gacctggaac gaagcttcca tcgctgggcc 1320
   atgcaccgta tgcagatttg cgtgggcact acaaggaagc agcgttggc atcatcgacg 1380
   gtgggtggcga tgcctttttg attgagactg ctcaggactt gcttcaggtc aaggctcggg 1440
   ttcacggcgt tcaagatgcc atggctgaac ttgatacatt cttgcccatt atttgccacg 1500
30  tcaccgtaga gaccaccggc accatgctca tgggttctga gatcggtgcc gcgttgacag 1560
   cgctgcagcc actgggtatc gacatgattg gtctgaactg cgccaccggc ccagatgaga 1620
   tgagcgaqca cctgcgttac ctgtccaagc acgccgatat tcctgtgtcg gtgatgccta 1680
   acgcaggctt tcctgtcctg ggtaaaaaac gtgcagaata cccacttgag gctgaggatt 1740
   tggcgcaggc gctggctgga ttcgtctccg aatatggcct gtccatggtg ggtggttgtt 1800
35  gtggcaccac acctgagcac atccgtgagg tccgcgatgc ggtggttggg gttccagagc 1860
   aggaaacctc cacactgacc aagatccctg caggccctgt tgagcaggcc tcccgcgagg 1920
   tggagaaaga ggactccgtc gcgtcgctgt acacctcggg gccattgtcc caggaaaccg 1980
   gcatttccat gatcggtgag cgcaccaact ccaacggttc caaggcattc cgtgaggcaa 2040
40  tgctgtctgg cgattgggaa aagtgtgtgg atattgcaa gcagcaaacc cgcatggtg 2100
   cacacatgct ggatctttgt gtggattacg tgggacgaga cggcaccgcc gatatggcga 2160
   ccttggcagc acttcttgct accagctcca ctttgccaat catgattgac tccaccgagc 2220
   cagaggttat tcgcacaggc cttgagcact tgggtggacg aagcatcgtt aactccgtca 2280

```

45

50

55

60

65

ES 2 355 942 T3

actttgaaga cggcgatggc cctgagtccc gctaccagcg catcatgaaa ctggtaaagc 2340
 agcacgggtgc ggccggtggt gcgctgacca ttgatgagga aggccaggca cgtaccgctg 2400
 agcacaaggt gcgcattgct aacgactga ttgacgat caccggcagc tacggcctgg 2460
 5 atatcaaaga catcgttgtg gactgcctga ccttccgat ctctactggc caggaagaaa 2520
 ccaggcgaga tggcattgaa accatcgaag ccatccgaga gctgaagaag ctctaccag 2580
 aatccacac caccctgggt ctgtccaata ttctctcgg cctgaaccct gctgcacgcc 2640
 aggttcttaa ctctgtgttc ctcaatgagt gcattgaggc tggctcggac tctgcgattg 2700
 cgcacagctc caagatthttg ccgatgaacc gcattgatga tcgccagcgc gaagtggcgt 2760
 10 tggatatggt ctatgatcgc cgcaccgagg attacgatcc gctgcaggaa ttcatgcagc 2820
 tgtttgaggg cgtttctgct gccgatgcca aggatgctcg cgctgaacag ctggccgcta 2880
 tgcctttggt tgagcgtttg gcacagcgca tcatcgacgg cgataagaat ggccttgagg 2940
 atgatctgga agcaggcatg aaggagaagt ctctattgc gatcatcaac gaggacctc 3000
 tcaacggcat gaagaccgtg ggtgagctgt ttggtccgg acagatgcag ctgccattcg 3060
 tgcctgcaatc caagggcaacc atgaaaactg cggggccta ttggaaccg ttcagtgaa 3120
 15 aggaagcaga agctaccgga tctgcgcagg cagaggcaa gggcaaaatc gtcgtggcca 3180
 ccgtcaaggg tgacgtgcac gatatcggca agaacttgg ggacatcatt ttgtccaaca 3240
 acggttacga cgtggtgaac ttgggcatca agcagccact gtccgcatg ttggaagcag 3300
 cgaagaaca gtcatcggca gtctcggact tctgtgaa 3360
 20 tgatgaagga aaaccttgag gagatgaaca acgcccggc atccaattac ccagtcattt 3420
 tgggtggcgc tgcgctgacg cgtacctacg tggaaaacga tctcaacgag gtgtacaccg 3480
 gtgaggtgta ctacgccctg gatgctttcg agggcctcgc cctgatggat gagggtatg 3540
 cagaaaagcg lgggaagga ctgatccca actcaccaga agctattgag caggcgaaga 3600
 agaagggcga cgtaaaggct cgtaatgagc gttcccgcaa gattgcccg gagcgtaaag 3660
 ctaatgcggc tcccgtgatt gttccggagc gttctgatgt ctccaaccg actccaaccg 3720
 25 cggcaccacc gttctgggga acccgcttg tcaagggtct gcccttggcg gaggttcttg 3780
 gcaacctga tgagcgcgcc ttgttcatgg ggcagtgggg tctgaaatcc acccgcgca 3840
 acgagggctc aagctatgag gatttgggtg aaactgaagg ccgaccacgc ctgcgctact 3900
 ggctggatcg cctgaagtct gagggcattt tggaccacgt ggcttgggtg tatggctact 3960
 tcccagcggc cgcggaagge gatgacgtgg tgatcttgg atccccggat ccacacgcag 4020
 ccgaacqcat ggcctttagc tcccacgcc agcagcgcgg caggttcttg tgcatcgcgg 4080
 30 atttcatcgc cccacgcgag caagctgtca aggaccggca aqtgqacgtc atgccattcc 4140
 agctggtcac ctatgtctg atttgcgcaa ctagttgttc cgagttgttc gcagccaatg 4200
 aataccgca gtacttggaa gttcacggca tctggcgtgca gctcaccgaa gcatgttggc 4260
 agtactgca ctcccagtg cgcagcgaac tcaagctgaa cgacggtgga tctgtcgtg 4320
 atttgatcc agaagacaag accaagttct tgcacctgga ttaccgcgcc gcccgcttct 4380
 35 cctttggta cggttcttgc cctgatctgg aagaccgcgc aaagctggtg gaattgctcg 4440
 agccaggccg tatcggcgtg gatgttgcgg ggyaactcca gctgcacca gagcagcca 4500
 cagacgcggt tgtgctctac caccagagg caaagtactt taacgtctaa tctagaccg 4560
 ggatttaaat cgctagcggg ctgclaaagg aagcggaaaca cgtagaagc cagtcgcag 4620
 aaacggtgct gaccctggat gaatgtcagc tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca 4680
 40 agcgaaga gaacagcaggt accctgcagc ggccttacct ggcgatagct agactggcg 4740
 gttttatgga cagcaagcga accggaattg ccagctgggg cgccctctgg taagttggg 4800
 aagccctgca aagtaactg gatggctttc ttgcccga ggatctgatg gcgcagggga 4860
 tcaagatctg atcaagagac aggatgagga tgcgttcgca tgattgaaca agatggattg 4920
 cacgcaggt ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcaacaacg 4980
 45 acaatcggct cctctgatgc cgcctgttc cggctgtcag cgcagggcg cccggttctt 5040
 tttgtcaaga ccgacctgtc cgggtgcctg aatgaactgc aggacgaggc agcggccta 5100
 tctgtgctgg ccacgacgg cgttccttgc gcagctgtgc tgcagcttgt cactgaagcg 5160
 ggaagggact ggctgctatt gggcgaagt cccgggcaag atctcctgtc atctcacctt 5220
 gctcctgcag agaaagtac catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttga 5280
 50 ccgctacct gcccttoga ccaccaagc caacatgca tgcagcagc acgtactcg 5340
 atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat ctggacgaag agcatcagg gctcgcgcca 5400
 gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc atgccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc 5460
 catggcgatg cctgcttgc gaatatcatg gtggaaaatg gccgctttc tggattcatc 5520
 gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc taccctgat 5580
 55 attgctgaag agcttggcg cgaatgggct gaccgcttcc tctgtctta cgtatcgcc 5640
 gctcccgatt cgcagcgcac cgccttctat cgccttctt acgagttctt ctgagcggga 5700
 ctctggggtt cgaatgacc gaccaagcga cgcaccaact gccatcacga gatttcgatt 5760
 ccaccgccc cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt ttccgggac gccggctgga 5820
 tgatctccca cgcggggat ctcatgctg agttcttgc ccacgtagc ggcgcgcgg 5880
 ccggcccgg gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcctct 5940
 60 tccgcttct cgtcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggtgcccgc agcggtatca 6000
 gctcactcaa agcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac 6060
 atgtgagcaa aagccagca aagccaccg acccgtaaa aggcccgctt gctggcgtt 6120
 tccataggc tccgcccccc tcagagcat cacaanaatc gacgctcaag tcaaggtgg 6180
 cgaaaccgga caggactata aagataccag gcgtttccc ctggaagctc cctcgtgccc 6240

ES 2 355 942 T3

```

tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttccgggaagc 6300
gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgcctc 6360
aagctgggct gtgtgcacga acccccctgt cagcccagacc gctgvcctt atccggtaac 6420
tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt 6480
5 aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct 6540
aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc 6600
ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtggt 6660
ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg 6720
atcttttcta cggggctctga cgtcagtggt aacgaaaact cacgttaagg gatttttggtc 6780
10 atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa aggcggccg cggccgccat 6840
cggcattttc ttttgctgtt ttatttgtaa actgttaatt gtccttgttc aaggatgctg 6900
tctttgacaa cacatgtttt ctgtcctttg atgttcagca ggaagctcgg cgcaaactgt 6960
gattgtttgt cgtgtagaa tcctctgttt taagataagc ttgtaatcac gacattgttt 7020
cctttcgttt gaggtagcgc gaagtgtgag taagtaaagg ttacatcgtt aggatcaaga 7080
15 tccattttta acacaaggcc agttttgttc agcggcttgt atgggccagt taaagaatta 7140
gaaacataac caagcatgta aatategtta gacgtaatgc cgtcaatcgt catttttgat 7200
ccgcgggagt cagtgaacag gtaccatttg ccgttcattt taaagacgtt ccgcggttca 7260
atctcatctg ttactgtggt agatgcaatc agcggtttca tcaacttttt cagtgtgtaa 7320
tcacgtttta gctcaatcat accgagagcg ccgtttgcta actcagccgt gcgtttttta 7380
20 tcgctttgca gaagtttttg actttcttga cggagaatg atgtgctttt gccatagtat 7440
gctttgttaa ataaagattc ttgccttggt tagccatctt cagttccagt gtttgcctca 7500
aatactaagt atttgtggcc tttatcttct acgtagttag gatctctcag cgtatggttg 7560
tcgcctgagc tgaagtggc ttcatcgtag aactgctgta cattttgata cgtttttccg 7620
tcaccgtcaa agattgattt ataatectct acaccgttga tgttcaaaga gctgtctgat 7680
25 gctgatacgt taactgtgtc agttgtcagt gttgttttgc cgtaatgttt accggagaaa 7740
tcagtgtaga ataaacggat ttttccgtca gcatacgaatt tggtgaaacc tgaccattct 7800
tgtgtttggt cttttaggat agaatcattt gcatcgaatt tgtcgtctgc tttaaaagacg 7860
cggccagcgt ttttccagct gtcaatagaa gtttcgccga ctttttgata gaacatgtaa 7920
atcgatgtgt catccgcatt tttaggatct ccggctaag caaagacgat gtgtagccg 7980
30 tgatagtttg cgacagtgcc gtcagcgttt tgtaatggcc agctgtccca aacgtccagg 8040
ccttttgtag aagagatatt ttaattgtg gacgaatcaa attcagaaac ttgatatttt 8100
tcattttttt gctgttcagg gatttgcagc atatcatggc gtgtaatatg ggaaatgccg 8160
tatgtttcct tatatggctt ttggttcggt tctttcgcaa acgcttgagt tgcgcctcct 8220
gccagcagtg cggtagtaaa ggtaataact gttgcttgtt ttgcaaaact tttgatgttc 8280
35 atcgttcagc tctccttttt tatgtactgt gttagcggtc tgcttcttcc agccctcctg 8340
tttgaagatg gcaagttagt tacgcacaat aaaaaaagac ctaaaatatg taaggggtga 8400
cgccaaagta tacactttgc cctttacaca ttttaggtct tgccgtgcttt atcagtaaca 8460
aaccgcgcgt atttactttt cgacctcatt ctatagact ctcgtttggg tttgcaactag 8520
tctattttcc tcttttgttt gatagaaaat cataaaagga ttgacagact accggcctaa 8580
40 agaactaaaa aatctatctg tttcttttca ttctctgtat tttttatagt tctgtttgca 8640
tgggcataaa gttgcctttt taatcacaat tcagaaaata tcataatate tcatttccact 8700
aaataatagt gaacggcagg tatatgtgat gggttaaaaa ggatcggcgg ccgctcgatt 8760
taaate 8766

```

- 45 <210> 4
- <211> 7070
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético
- 55 <400> 4

```

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttgg agaatcatga 60
cctcagcatc tgccccaaagc ttttaacccc gcaagggtcc cggctcagca gtcggaattg 120
cctttttagg attcgggaaca gtcggcactg aggtgatgcg tctgatgacc gagtacggtg 180
60 atgaacttgc gcaccgcatt ggtgcccact tggaggttcg tggcattgct gtttctgata 240
tctcaaagcc acgtgaaggc gttgcacctg agctgctcac tgaggacgct tttgcaacta 300
tcgagcgcga ggatgttgac atcgtcgttg aggttategg cggcattgag taccacagtg 360
aggtagttct cgcagctctg aaggccggca agtctgttgt taccgccaat aaggctcttg 420
70 ttgcagctca ctctgctgag ctctgctgat cagcggagc cgcaaactgt gacctgtact 480
tcgaggctgc tgttgacggc gcaattccag tggttggccc actgctcgc tccttggtg 540
gcgatcagat ccagtctgtg atgggcacgc ttaacggcac caccaacttc atcttgagc 600
ccatggattc caccggcgcct gactatgtag attctttggc tgaggcaact cgtttggtt 660

```

ES 2 355 942 T3

5 acgccgaagc tgatccaact gcagacgtcg aaggccatga cgccgcatcc aaggctgcaa 720
 ttttggcatc catcgctttc cacacccgtg ttaccgcgga tgatgtgtac tgcgaaggta 780
 tcagcaacat cagcgtgccc gacattgagg cagcacagca ggcaggccac accatcaagt 840
 10 tgttggccat ctgtgagaag ttaccaaca aggaaggaaa gtcggctatt tctgctcgcg 900
 tgcacccgac tctattacct gtgtcccacc cactggcgtc ggtaaacaag tcttttaatg 960
 caatctttgt tgaagcagaa gcagctggtc gcctgatgtt ctacggaaac ggtgcagggtg 1020
 gcgcgccaac cgcgtctget gtgcttggcg acgtcgttgg tgccgcacga aacaagggtgc 1080
 acggtggcog tgctccaggt tgacatggca attgaaactga gccgatcgct gatttcgggtg 1140
 15 agaccaccac tcggtaccac ctcgacatgg atgtggaaga tcgctgggg gttttggctg 1200
 aattggctag cctgtttctct gagcaaggaa tcttctcgcg tacaatccga caggaagagc 1260
 gcgatgatga tgcacgtctg atcgtgggtca cccactctgc gctggaatct gatctttccc 1320
 gcaccgttga actgctgaag gctaagcctg ttgttaaggc aatcaacagt gtgatccgcc 1380
 tcgaaaggga ctaattttac tgcaaacctc ggacctggct ttgacacttt aggtttggca 1440
 20 gtcacggtag ctggatcttc tgcaaacctc ggacctggct ttgacacttt aggtttggca 1500
 ctgtcggtag acgacactgt cgaagtggaa attattccat ctggcttggg agtgggaagt 1560
 tttggcgaag gccaaaggcg agtccctctt gatggctccc acctggtggt taaagctatt 1620
 cgtgctggcc tgaaggcagc tgacgctgaa gttcctggat tgcgagtggt gtgccacaac 1680
 aacattccgc tcttggctcc tcttggctcc gctgctgcag cggcgggtgc tgggtttgct 1740
 25 gcagctaata gtttggcgga tttcccgtcg actcaagagc agattgttca gttgtcctct 1800
 gcctttgaag gccacccaga taatgctgcg gcttctgtgc tgggtggagc agtgggtgctg 1860
 tggacaaatc tgtctatcga cggcaagagc cagccacagt atgctgctgt accacttgag 1920
 gtgcaggaca atatctgctg gactgcctgt gttcctaatt tccacgcac caccgaagt 1980
 gtgcccagag tcttcccac tgaagtcact cacatcgatg cgcgatttaa cgtgtcccgc 2040
 30 gttgcagtga tgatcgttgc gttgcagcag cgtcctgatt tgctgtggga gggactcgt 2100
 gaccgtctgc accagcctta tcgtgcagaa gtgttgccca ttacctctga gtgggtaaac 2160
 cgctgcgca accgtggcta cgcggcatac ctttccggtg ccggcccaac cgccatggtg 2220
 ctgtccactg agccaattcc agacaagggt ttggaagatg ctcgtgagtc tggcattaag 2280
 35 gtgcttgagc ttgaggttgc gggaccagtc aaggttgaag ttaaccaacc ttaggcccaa 2340
 caaggaaggc ccccttcgaa tcaagaaggg ggcctatta gtgcagcaat tattcgtgta 2400
 acacgtgaac cttacaggtg cccggcgcgt tgagtggttt gagtccagc tggatgcggt 2460
 tgttttcacc gaggctttct tggatgaatc cggcgtggat ggcgcagacg aaggctgatg 2520
 40 ggcgtttgtc gttgaccaca aatgggcagc atcctctaga tctgtagagc gagggagttt gttcttccg 2580
 tttcgggtgg gtc aaagccc atttgcgga ggcggttaat gagcggggag agggcttctg 2640
 cgagtctctc ggcttcggcg tggttaatgc ccatgacgtg tgcccactgg gttccgatgg 2700
 aaagtgettt ggcgcggagg tccgggttgt gcattgcctc atcgtcgaca tcgccgagca 2760
 45 tgttggccat gagttcgatc aggggtgatgt attctttggc gacagcgcgg ttgtcgggga 2820
 cgcgtgtttg gaagatgagg gaggggcggg atcctctaga cccgggattt aaatcgctag 2880
 cgggetgcta aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtc gcagaaacgg tctgacccc 2940
 ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa ccgaagcgca aagagaaagc 3000
 50 aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat aqctagactg ggcggtttta tggacagcaa 3060
 gcgaaccgga attggcagc ggggcgcctt gatgtaaggt tgggaagccc tgcaaaagta 3120
 actggatggc tttcttgcg ccaaggatct ctggtcagc gggatcaaga tctgctcaag 3180
 agacaggatg aggatcgttt cgcattgatg aacaagatgg attgacgca ggttctccgg 3240
 ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3300
 55 atgccgccgt tctccggctg tcagcgcagg ggcgcccggg tctttttgtc aagaccgacc 3360
 tctccggtgc cctcaatgaa ctgcaggacg atggcagcgc gctatcgtgg ctggccacga 3420
 60 cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3480
 tattggcgga agtgcggggg caggatctcc tgtcatctca ccttgcctct gccgagaaag 3540
 tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacget tgatccggct acctgcccac 3600
 tcgaccacca agcgaacat cgcactcgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 3660
 65 tcgatcagga tgatctggac gaagagcatic aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3720
 ggctcaaggc gcgcagtccc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgctgct 3780
 tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggtggt 3840
 gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg tgatattgct gaagagcttg 3900
 gcggcgaatg ggtgaccgc ttcctcgtgc tttacgggat cgcgctccc gattcgcagc 3960
 70 gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg gtttcgaaat 4020
 75 gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgcttcta 4080
 tgaagggttg ggcttcggaa tegttttccg ggacgcccgc tggatgatcc tccagcgcgg 4140
 ggatctcatg ctggaagttc tcgcccacgc tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtaaa 4200
 taccgcacag atcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tctcgtca 4260
 80 ctgactcgtg gcgtcggtc gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaggcggc 4320
 taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 4380
 agcaaaaggc caggaaaccgt aaaaaggccg cgttctgctgc gtttttccat aggctccgcc 4440
 cccctgacga gcatacaaaa aatcgacgct caagtcaagag gtggcgaaac ccgacaggac 4500
 tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctcctcgt gcgctctcct gttccgaccc 4560
 85 tgcgccttac cggatacctg tccgcttccg tcccttccgg aagcgtggcg ctttctcata 4620

ES 2 355 942 T3

```

gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgcttcg ctccaagctg ggctgtgtgc 4680
acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 4740
acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 4800
cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta 4860
5 gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 4920
gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcagc 4980
agcagattac ggcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 5040
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 5100
ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg gccgcggccg ccatcggcat tttcttttgc 5160
10 gtttttattt gtttaactgtt aatgtcctt gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg 5220
tttctttgcc tttgatgttc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt 5280
agaatcctct gtttgtcata tagcttghta tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta 5340
cagcgaagtg ttgtaagta aaggttacat cgttaggatc aagatccatt ttaacacaa 5400
ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca 5460
15 tgtaaaatac gtttagacgta atgccgtcaa tcgtcatttt tgatccgagg gagtcagtga 5520
acaggtacca tttgccgttc attttaaaga cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg 5580
tgtttagatgc aatcagcggg ttcatacactt ttttcagttg gtaatcatcg tttagctcaa 5640
tcataccgag agcgcgcttt gctaactcag ccgtgcggtt tttatcgcctt tgcagaagt 5700
tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg ttaataaag 5760
20 attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc cagtggtttg tccaaatact aagtatttgt 5820
ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt 5880
tgccttcate gatgaactgc tgtacatttt gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg 5940
atataaate ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt 6000
gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac 6060
25 ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgaoca ttcttgtgtt tggcttttta 6120
ggatagaatc atttgcacg aatttgtcgc tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc 6180
agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt gatagaacat gtaaategat gtgtcatccg 6240
catttttagg atctccggt aatgcaaaaga cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag 6300
tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga 6360
30 ttttttlaat tgggacgaa tcaaaticag aaacttgata tttttcattt ttttgcattt 6420
cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatggt tccttatatg 6480
gcttttgggt cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag 6540
taaaggttaa tactgttgc tgttttgcaa actttttgat gttcatcggt catgctcct 6600
tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt 6660
35 tagttacgca caataaaaaa agacctaaa tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacat 6720
ttgcccttta cacattttag gttctgcctg cttlatcagt aacaaacccg cgcgatttac 6780
ttttcgacct cttctatta gactctcgtt tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt 6840
gtttgataga aaatcataaa aggatttgca gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta 6900
tctgtttctt ttcattctct gtaattttta tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc 6960
40 ttttaaatca caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg 7020
caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg gcggccgctc gatttaaatc 7070

```

<210> 5

<211> 6625

45 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

<400> 5

```

55 tgcgagggcc tgacgtcggg cccggtaccg ttgctcgcgt atctttcggc ttaacaactt 60
tgtattcaat cagtcgggca tagaaagaaa acgcaatgat ataggaacca actgccgcca 120
aaaccagcca cacagagttg attgtttcgc cacgggagaa agcgattgct ccccaacca 180
ccgccgcat aaccccaaag acaaggagac caacgcgggc ggtcgggtac attttagggg 240
acttctcac gcctactgga agtcagtag cgttgcgtga caccaaatca tcgtcattga 300
60 tgttgcagc gctgtttatg gtcacgatct ttactgtttt ctcttcgggt cgtttcaaag 360
ccactatgcg tagaaacagc gggcagaaac agcgggcaga aactgtgtgc agaaatgcat 420
gcagaaaaag gaaagttcgg ccagatgggt gtttctgtat gccgatgatc ggatctttga 480
cagctgggta tgcgacaaat caccgagagt tgtaattct taacaatgga aaagtaacat 540
tgagagatga tttataccat cctgcacat ttagagtggg gctagtcata cccccataac 600
65 cctagctgta cgcaatcgat ttcaaatcag ttggaaaaag tcaagaaat taccgagac 660
atatcgggct taaagtttgg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgct 720
ggcactctcg agggtagagt gccaaatag tttgtttgaca cacagttggt caccgcgac 780

```

ES 2 355 942 T3

5 gacggctgtg ctggaaaccc acaaccggca cacacaaaat ttttctcatg gccggttacc 840
 tgcaaatgtc cacagggtag ctggtagttt gaaaatcaac gccgttgccc ttaggattca 900
 gtaactggca cattttgtaa tgcgctagat ctgtgtgctc agtcttccag gctgcttacc 960
 acagtgaag caaaaccaat tctgtggctgc gaaagtctga gccaccacga agtccaggag 1020
 gacatacaat gccaaagtac gacaattcca atgetgacca gtggggcttt gaaaccogct 1080
 ccattcacgc aggccagtca gt agacgcac agaccagcgc acgaaacctt ccgatctacc 1140
 aatccaccgc tttcgtgttc gactccgctg agcacgccaa gcagcgtttc gcaactgagg 1200
 atctaggccc tgtttactcc gcctcacca acccaaccgt tgaggctttg gaaaccogca 1260
 10 togttccct cgaagggtgc gtccacgctg tagegttctc ctccggacag gccgcaacca 1320
 ccaacgccat ttgaaacctg gcaggagcgg ggcaccacat cgtcacctcc ccacgcctct 1380
 acggtggcac cgagactcta ttccttatca ctcttaaccg cctgggtatc gatgtttcct 1440
 tcgtggaaaa ccccgacgac cctgagtcct ggcaggcagc cgttcagcca aacaccaaaag 1500
 cattcttcgg cgagactttc gccaacccac aggcagacgt cctggatatt cctgocggtg 1560
 ctgaagttgc gcaccgcaac agcgttccac tgatcatcga caacaccatc gctaccgcag 1620
 15 cgctcgtgcg cccgctcgag ctccggcgcag acgttgtcgt cgcttccctc accaagttct 1680
 acaccggcaa cggctccgga ctgggcggcg tgcttatcga cggcggaaag ttcgattgga 1740
 ctgtcgaaaa ggatggaaa ccaagtattcc cctacttcgt cactccagat gctgcttacc 1800
 acggattgaa gtacgcagac cttggtgcac cagcctcgg cctcaaggtt cgcgttgccc 1860
 tctacgcga caccgctcc accctctccg cattcaacgc atgggctgca gtcagggca 1920
 20 tcgacacctt tccctgccc ctggagcggc acaacgaaa cgccatcaag gttgcagaat 1980
 tcctcaacaa ccacgagaag gtgaaaagg ttaacttcgc aggcctgaag gattcccctt 2040
 ggtacgcaac caaggaagag cttggcctga agtacaccgg ctccgttctc accttcgaa 2100
 tcaagggcgg caaggtgag gcttgggcat tttatcgacg cctgaagcta cactccaacc 2160
 ttgcaaacat cggcgatggt cgctccctcg ttgttacc ccgcaaccacc acccattcac 2220
 25 agtccgacga agctggcctg gcaacgcggg gcgttacc caactccagat gctccaccgtc cgcctgtccg 2280
 ttggcatcga gaccattgat gatatcatcg ctgacctcga aggcggcttt gctgcaatct 2340
 agcactagtt cggacctagg gatatcgtcg acatcgatgc tcttctgctg taattaacaa 2400
 ttggatcct ctagaccgg gatttaaatc gctagcgggc gctagcggatg aatgtcagct actgggctat 2460
 gtgaaaagcc agtccgcaga aacggtgctg accccggatg aaagcaggtg gcttgcagtg ggcttaccatg 2520
 ctggacaag gaaaacgcaa gcgcaagag aaagcaggtg gcttgcagtg ggcttaccatg 2580
 30 gcgatagct a gactgggccc ttttatggac agcaagcga cnggaattgc cagctggggc 2640
 gccctctggt aaggttggga agccctgcaa agtaaatgg atggctttct tgccgccag 2700
 gatctgatgg cgcagggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttccgat 2760
 gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg 2820
 ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc 2880
 gcaggggccc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca 2940
 35 ggacggagca gcgcccgtat cgtggctggc cagcagggc gttccttgeg cagctgtgct 3000
 ccaagttgtc actgaagcgg gaagggactg ctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga 3060
 tctcctgtca tctcaccttg ctccctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg 3120
 gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattccgac caccaagcga aacatcgcat 3180
 40 cgagcagca cgtactcgg a tggaaagccc tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga 3240
 gcgatcaggg ctccgcgcc cogaactggt ccgaggtc agggcgcgca tggccagcg 3300
 cgaaggtctc atggcgatgc ctgcttccg aatcatgag aatcatgag tggaaaaagg 3360
 ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat 3420
 agcgtttggt acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttcc 3480
 45 cgtgctttac ggtatcgcc ctcccgatc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga 3540
 cgagttcttc tgagcgggac tctggggttc gaaatgacc accaagcgcac gccaacctg 3600
 ccatcacgag atttcgattc caccgcgcc tctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt 3660
 ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttccg 3720
 cacgctagcg gcgcgcccgc cggcccgggtg tgaataccg cacagatgcg taaggagaaa 3780
 ataccgcac aggcgctctt ccgcttccct gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg 3840
 50 gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtlaata cggttatcca cagaatcagg 3900
 ggataacgca gaaaagaaca tqtgagcaaa aggcagcaa aaggccagga accgtaaaaa 3960
 ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggtc ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg 4020
 acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgcac aggactataa agataaccagg cgtttccccc 4080
 tggaaagctc ctgctgcgct ctccgtttcc gacctgccg cttaccggat acctgtccgc 4140
 55 ctttccctc tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc 4200
 ggtgtaggtc gttcgcctca agctgggctg tgtcacgaa cccccgctt agcccgaccg 4260
 ctgcgctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacag acttatcgcc 4320
 actggcagca gccactggta acaggattag cagagcaggg tatgtaggcg gtgctacaga 4380
 gttcttgaag tgggtgacct actacggcta cactagaagg acagtattg gtaatcgcgc 4440
 tctgctgaag ccagttacct tcgaaaaag agttgtagc tcttgatccg gcaaaaaaac 4500
 60 caccgtagg agcgggtggt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg 4560
 atctcaagaa gatcctttga tctttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 4620
 acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa 4680
 ggccggcccgc ggccgccatc ggcattttct tttgcgtttt tatttgtaa ctgtaattg 4740

ES 2 355 942 T3

```

5   tccttgttca aggatgctgt ctttgacaac agatgttttc ttgcctttga tgttcagcag 4800
    gaagctcggc gcaaacggtg attgtttgtc tgcgtagaat cctctgtttg tcatatagct 4860
    tgtaatcacg acattgtttc ctttcgcttg aggtacagcg aagtgtgagt aagtaaagg 4920
    tacatcgtta ggatcaagat ccatttttaa cacaaggcca gttttgttca gcggttcta 4980
    tgggccagtt aaagaattag aacataaacc aagcatgtaa atatcgttag acgtaatgcc 5040
    gtcaatcgtc atttttgatc cgcgggagtc agtgaacagg taccatttgc cgttcatttt 5100
    aaagacgttc gcgcgttcaa tttcatctgt tactgtgtta gatgcaatca gcggtttcat 5160
    cacttttttc agtgtgtaat catcgtttag ctcaatcata ccgagagcgc cgtttgctaa 5220
10  ctcagccgtg cgttttttat cgctttgcag aagtttttga ctttcttgac ggaagaatga 5280
    tgtgcttttg ccatagtatg ctttgttaaa taaagattct tcgccttggg agccatcttc 5340
    agttccagtg tttgcttcaa atactaagta tttgtggcct ttatcttcta cgtagtgagg 5400
    atctctcagc gtatggttgt cgcctgagct gtagttgcct tcatcgatga actgctgtac 5460
    attttgatac gttttccggt caccgtcaaa gattgattta taatcctcta caccgttgat 5520
15  gttcaaagag ctgctgatg ctgatacgtt aacttgtgca gttgtcagtg tttgtttgc 5580
    gtaatgttta ccggagaaat cagtgtagaa taaacggatt tttccgtcag atgtaaagt 5640
    ggctgaacct gaccattctt gtgtttggtc ttttaggata gaatcattg catcgaattt 5700
    gtcgctgtct ttaaagacgc ggccagcgtt tttccagctg tcaatagaag tttcgccgac 5760
    tttttgatag aacatgtaaa tggatgtgtc atccgcattt ttaggatctc cggctaatac 5820
20  aaagacgatg tggtagccgt gatagtttgc gacagtgccg tcagcgtttt gtaatggcca 5880
    gctgtcccaa acgtccaggc cttttgcaga agagatattt ttaattgtgg acgaatcaaa 5940
    ttcagaaaact tgatattttt cttttttttg ctgttcagggg atttgcagca tatcatggcg 6000
    tgtaatatgg gaaatgccgt atgtttcctt atatggcttt tggttcgttt ctttcgcaaa 6060
    cgcttgagtt gcgcctcctg ccagcagtg c ggtagtaaag gttaatactg ttgcttgtt 6120
25  tgcaaacttt ttgatgttca tgcctcatgt ctctttttt atgtactgtg ttagcggctc 6180
    gcttcttcca gccctcctgt ttgaagatgg caagttagtt acgcacaata aaaaaagacc 6240
    taaaatatgt aaggggtgac gccaaagtat acactttgcc ctttacacat ttaggtctt 6300
    gcctgcttta tcagtaacaa acccgcgcga tttacttttc gacctattc tattagactc 6360
    tcgtttggat tgcaactggg ctattttcct cttttgtttg atagaaaatc ataaaaggat 6420
    ttgcagacta cgggcctaaa gaactaaaaa atctatctgt ttcttttcat tctctgtatt 6480
30  ttttatagtt tctgttgcac gggcataaag ttgccttttt aatcacaatt cagaaaatat 6540
    cataatatct catttacta aataatagtg aacggcaggt atatgtgatg ggttaaaaag 6600
    gatcggcggc cgctcgattt aaatc 6625

```

35 <210> 6

<211> 363

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Promotor sintético

45

<400> 6

```

50  cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga gtgctggcac 60
    tctcaggggt agagtgcaa ataggttgtt tgaacacag ttgttcaccc gcgacgacgg 120
    ctgtgctgga aaccacaac cggcacacac agacattttc tcatggccgt taccctgca 180
    atgtccacag ggtagctggg agtttgaaaa tcaacgccgt tgcccttagg attcagtaac 240
    tggcacattt tgtaatgcgc tagatctgtg tgctcagctc tccaggctgc ttatcacagt 300
    gaaagcaaaa ccaattcgtg gctgcgaaag tcgtagccac cacgaagtcc aggaggacat 360
55  aca 363

```

<210> 7

60 <211> 6350

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

ES 2 355 942 T3

<400> 7

	tcgagctcgg	cgcagacggt	gtcgtcgtt	ccctcaccaa	gttctacacc	ggcaacggct	60
	ccggactggg	cggcgtgctt	atcgacggcg	gaaagtcca	ttggactgtc	gaaaaggatg	120
5	gaaagccagt	attcccctac	ttcgtcactc	cagatgctgc	ttaccacgga	ttgaagtacg	180
	cagacccttg	tgcaccagcc	ttcggcctca	aggttcgctg	tggccttcta	cgcgacaccg	240
	gctccaccct	ctccgcattc	aacgcattgg	ctgcagtcca	gggcatcgac	accctttccc	300
	tgcgcctgga	gqccacaac	gaaaacgcca	tcaaggttgc	agaattcctc	aaaaccacg	360
	agaaggtgga	aaaggttaac	ttcgcaggcc	tgaaggattc	cccttggtac	gcaaccaagg	420
10	aaaagcttgg	cctgaagtac	accggctccg	ttctcaactt	cgagatcaag	ggcggcaagg	480
	atgagcttg	ggcatttate	gacgcctga	agctacactc	caacctgca	aacatcggcg	540
	atgttcgctc	cctcgttgtt	caccagcaa	ccaccacca	ttcacagtcc	gacgaagtg	600
	gcctggcacg	cgcgggctgt	accagtcca	ccgtccgctt	gtccgttggc	atcgagacca	660
	ttgatgatat	catcgctgac	ctcgaaggcg	gctttgctgc	aatctagcac	tagttcggac	720
	ctagggatat	cgtcgaagac	tgccaattat	tccgggcttg	tgaccgcgta	cccgataaat	780
15	aggtcggctg	aaaaatttcg	ttgcaatc	aacaaaagg	cctatcattg	ggaggtgtcg	840
	caccaagtac	ttttgcaag	cgccatctga	cggttttca	aaagatgtat	atgctcggtg	900
	cggaaaccta	cgaaaggatt	ttttaccat	gcccaccctc	gcgcttcag	gtcaacttga	960
	aatccaagcg	atcgggtgat	tctccaccga	agccggagca	atcattaca	acgctgaaat	1020
	cgcctatcac	cgctggggtg	aataccgcgt	agataaagaa	ggacgcagca	atgtcgttct	1080
20	catcgaacac	gcccctcactg	gagattccaa	cgcagccgat	tggtagggctg	acttgcctcg	1140
	tcccggcaaa	gccatcaaca	ctgatattta	ctgctgtatc	tgtaccaacg	tcatcggtag	1200
	ttgcaacggt	tccaccggac	ctggctccat	gcatccagat	ggaaatttct	ggggtaatcg	1260
	cttccccgcc	acgtccattc	gtgatcaggt	aaacgcgcaa	aaacaattcc	tcgacgcact	1320
	cggcatcacc	acggtcgcgg	cagtacttgg	tggttccatg	ggtggtgccc	gcaccctaga	1380
25	gtgggcgca	atgtaaccag	aaactgttgg	cgcagctgct	gttcttgca	tttctgcag	1440
	cgcagcggcc	tggcaaatcg	gcattcaatc	cgccaaat	aaggcgattg	aaaacgacca	1500
	ccactggcac	gaaggcaact	actacgaatc	cggctgcaac	ccagccaccg	gactcggcgc	1560
	cgcgccagcg	atcgcccacc	tcacctaccg	tggcgaacta	gaaatcgacg	aacgcttcgg	1620
	caccaaaagc	caaaaagaag	aaaaccact	cggtccctac	cgcaagcccg	accagcgtt	1680
	cgcctggaa	tccacttgg	actaccaagc	agacaagcta	gtacagcgtt	tcgacgcggg	1740
30	ctcctacgtc	ttgctcaccg	acgcccctca	ccgccacgac	attggtcgcg	accgcgagg	1800
	cctcaacaag	gcactcgaat	ccatcaaatg	tccagtcctt	gtcgcaggcg	tagataccga	1860
	tattttgtac	ccctaccacc	agcaagaaca	cctctccaga	aacctgggaa	atctactggc	1920
	aatggcaaaa	atcgtatccc	ctgtcggcca	cgatgcttcc	ctcaccgaaa	gcccacaaat	1980
	ggatcgcac	gtgaggaact	tcttcagcct	catctcccca	gacgaagaca	acccttcgac	2040
35	ctacatcgag	ttctacatct	aacatcagac	tagttcggac	ctagggatat	cgctcagatc	2100
	gatgctcttc	tgcgttaatt	aacaattggg	atcctctaga	cccgggattt	aaatcgcctg	2160
	cgggctgcta	aaggaagcgg	aacacgtaga	aagccagtc	gcagaaacgg	tgctgacccc	2220
	ggatgaatgt	cagctactgg	gctatctgga	caagggaaaa	cgcaagcgca	aagagaagc	2280
	aggtagcttg	cagctggcctt	acatggcgat	agctagactg	ggcggtttta	tggacagcaa	2340
40	gcgaaccgga	attgccagct	ggggcgccct	ctggttaagg	tgggaagccc	tgcaaagtaa	2400
	actggatggc	tttcttgccg	ccaaggatct	gatggcgcag	gggatcaaga	tctgatcaag	2460
	agacaggatg	aggatcgttt	cgcattgatg	acaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	2520
	ccgcttgggt	ggagaggcta	ttcggctatg	actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	2580
	atgcccggct	gttccggctg	tcagcgcagg	ggcggccgg	tcttttltgc	aagaccgacc	2640
	tgtccggctg	cctgaatgaa	ctgcaggacg	aggcagcgg	gctatcgtgg	ctggccacga	2700
45	cgggcttcc	ttgcgcagct	gtgctcagc	ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	2760
	tattggcgca	agtgccgggg	caggatctcc	tgtcatctca	ccttgctcct	gcccagaaag	2820
	tatccatcat	ggctgatgca	atgcccggcg	tgcatacqct	tgatccggct	acctgccct	2880
	tcgaccacca	agcgaacat	cgcattcagc	gagcacglac	tcggatggaa	gcccgtcttg	2940
	tcgatcagga	tgatctggac	gaagagcatc	aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgcca	3000
50	ggctcaaggc	gcgcatgcc	gacggcgagg	atctcgtcgt	gacctatggc	gatgcctgct	3060
	tgccgaatat	catggtggaa	aatggccgct	ttctcggatt	catcgactgt	ggcggctgg	3120
	gtgtggcgga	ccgctatcag	gacatagcgt	tgctaccgg	tgatattgct	gaagagcttg	3180
	gcggcgaatg	ggctgaccgc	ttcctcgtgc	tttacgggat	cgccgctccc	gattcgcagc	3240
	gcattcgcct	ctatcgcctt	cttgacgagt	tctctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	3300
	gaccgacca	gcgacgccc	acctgccatc	acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	3360
55	tgaaggttg	ggcttcggaa	tcgttttccg	ggacgcgggc	tgatgatcc	tcagcgcgg	3420
	ggatctcatg	ctggagttct	tcgcccacgc	tagcggcgcg	ccggccggcc	cgggtgaaa	3480
	taccgcacag	atgcgtaagg	agaaaatacc	gcatcaggcg	ctctccgct	tctcgtctca	3540
	ctgactcgtc	gcgctcgttc	gttcggctgc	ggcagcgggt	atcagctcac	tcaaaggcgg	3600
	taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	3660
60	agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggcct	cgttgcctgg	gttttccat	aggctccggc	3720
	cccctgagca	gctacacaaa	aatcgacgct	caagtcaag	gtggcgaaac	ccgacaggac	3780
	tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	3840
	tgcgccttac	cggatacctg	tcgcctttc	tccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	3900
	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggtcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	3960
65	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgct	ccttatccgg	taactatcgt	cttgatcca	4020
	accggtaag	acacgactta	tcgccaactg	cagcagccac	tggtaaacag	attagcagag	4080
	cgaggtatgt	aggcgggtgt	acagagttct	tgaagtggtg	gcctaactac	ggctacacta	4140

ES 2 355 942 T3

```

gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 4200
gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 4260
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 4320
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 4380
5 ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg gccgcggccg ccatcggcat tttcttttgc 4440
gtttttattt gtttaactggt aattgtcctt gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg 4500
ttttcttgcc ttgatggtc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgctg 4560
agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta 4620
cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat cgtaggatac aagatccatt ttaacacaa 4680
10 ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca 4740
tgtaaatatc gtttagacgta atgccgtcaa tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcaagtga 4800
acaggtacca tttgccggtc attttaaaga cgttcgcggc ttcaatttca tctgttactg 4860
tgtagatgac aatcagcggg ttcatcactt ttttcagtggt gtaatcatcg ttttagctcaa 4920
tcataccgag agcgcgggtt gctaactcag ccgtgcggtt ttatcgctt tgcagaagtt 4980
15 tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag 5040
attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt 5100
ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt 5160
tgccttcacg gatgaactgc tgtacatttt gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg 5220
atttataatc ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt 5280
20 gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gttttaccgga gaaatcagtg tagaataaac 5340
ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttcttgtgtt tggcttttca 5400
ggatagaatc atttgcatcg aatttgcgc tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc 5460
agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg 5520
25 catttttagg atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag ttgcgacag 5580
tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga 5640
tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata tttttcattt ttttgcgtgt 5700
cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatggt tccttatatg 5760
gcttttgggt cgtttctttc gcaaaccgctt gagttgcgcc tcccgccagc agtgcggtag 5820
30 taaaggttaa tactgttgct tgttttgcaa actttttgat gttcatcggt catgtctcct 5880
tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt 5940
tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa tatgtaaggg gtgacgcca agtatacact 6000
ttgcccttta cacattttag gtcttgccgt ctttatcagt aacaaaccgg cgcgatttac 6060
ttttcgacct cactctatta gactctcggt tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt 6120
35 gtttgataga aatcataaaa aggatttgca gactacgggc taaagaactt aaaaactcta 6180
tctgtttctt ttcattctct gtatttttta tagttctgt tgcatgggca aaaagttgcc 6240
tttttaataca caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg 6300
caggatatg tgatggggtt aaaaggatcg gcggccgctc gatttaaatc 6350

```

<210> 8

40 <211> 6440

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

50 <400> 8

```

tcgagaggcc tgacgtcggg cccgacgtcg catgctccc gccgcatgg ccgcgggata 60
tcaactagtgc ggccgcctgc aggtcgacca tatgggagag ccactagtag gagcacaac 120
acatgtccct aacgaacatc ccagcctcat ctcaatgggc aattagegac gttttgaagc 180
55 gtccctcacc cggccgagta cctttttctg tcgagttat gccaccccgc gacgatgcag 240
ctgaagagcg tctttaccgc gcagcagagg tcttccatga cctcgggtga tcgtttctct 300
ccgtgactta tgggtgctggc ggtcaaccc gtgagagaac ctcacgtatt gctcgacgat 360
tagcgaaaca accgttgacc actctggtgc acctgaccct ggttctgctg ccgcacagcg 420
atcccagagg aatatcctc tggggctcgt gtgtcgacct taaagtttgg ctgccatgtg 480
60 aatttttagc accctcaaca gttgagtgt ggcactctcg ggggtagagt gccaatagg 540
ttgtttgaca cacagttggt caccgcgcag gacggtgtg ctggaaacc acaaccggca 600
cacacaaaat ttttctagag gagggttca tcatgaatac atacgaaca attaataaag 660
75 tgaaaaaaat acttcggaac cttttaaata ataacttat tggacttac atgtttggat 720
caggagttag gagtggacta aaaccaata gtgacttga ctttttagtc gtcgtatctg 780
aaccattgac agatcaaagt aaagaaatac ttatacaaaa aattagacct atttcaaaaa 840
65 aataggaga taaagcaac ttacgatata ttgaattaac aattattatt cagcaagaaa 900
tggtaccgtg gaatcatcct cccaacaag aatttattta tggagaatgg ttacaagagc 960
tttatgaaca aggatacatt cctcagaagg aattaaattc agatttaacc ataatgcttt 1020

```

ES 2 355 942 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

```

accaaagcaaa acgaaaaaat aaaagaatat acggaaatta tgacttagag gaattactac 108C
ctgatattcc attttctgat gtgagaagag ccattatgga ttcgtcagag gaattaatag 114C
ataattatca ggatgatgaa accaactcta tattaacttt atgccglatg altttaacta 120C
tggaacaggg taaaatcata ccaaaagata ttgcgggaaa tgcagtggct gaatcttctc 126C
cattagaaca tagggagaga attttgttag cagttcgtag ttatcttggg gagaatattg 132C
aatggactaa tgaaaatgta aatttaacta taaactattt aaataacaga ttaaaaaaat 138C
tataaaaaaa ttgaaaaaat ggtggaacaa cttttttcaa tttttttggt ttattattta 144C
atatttgggg aatattcatt ctaattggta atcagatttt agaaaaaat aaacccttgc 150C
atagggggat cgatatccgt ttaggctggg cggatccgcc ctcccgcacg ctttcgggga 156C
ggcggtacc agctcatcga tcttattaag tccactctcg agttccggga attcgacctc 162C
ggtatcgcct ccttccccga agggcatttc cgggcgaaaa ctctagaaga agacaccaa 168C
tactctctgg cgaagctgcg tggaggggca gagtactcca tcacgcagat gttctttgat 174C
gtggaagact acctgcgact tctgtatcgc cttgtcgtcg cagaccccat tcatggtgcg 180C
aagccaatca ttcttggcat catgcccatt acgagcctgc ggtctgtgcg tcgacaggtc 186C
gaactctctg gtgctcaatt gccgagccaa ctagaagaat cacttgttcg agctgcacac 192C
ggcaatgaaq aagcgaacaa agacagatc cgcaaggtgg gcattgaata ttccaccaat 198C
atggcagagc gactcattgc cgaaggtgcg gaagatctgc acttcatgac gcttaacttc 204C
acctgtcaa cccaagaagt gttgtacaac cttggcatgg cgctgcttg gggagcagag 210C
cagggccaag acgcggtgcg ttaagggatc cttaggaagg ctcccaacgc gtcatatgac 216C
tagttcggag ctagggatal cgtcagatc gctccttc tgcgttaatt acaaatggg 222C
atcctctaga ccgggattt aaatcgttag cgggtgcta aaggaaqcg aacacgtaga 228C
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 234C
caagggaaaa cycaaycgc aayqaaagc aggtagcttg cagtggtctt acatggcgat 240C
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcacct 246C
ctggttaagg tgggaagccc actggatggc tttcttgcct ccaaggatct 252C
gatggccag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcattgtg 258C
aacaagatgg attgcacgca ggtlctccgg ccqcttggg ggagaggcta ttcggctatg 264C
actgggcaca acagacaatc ggtcgtctcg atgcccgct gttccggctg tcagcgcagg 270C
ggcgccccgt tctttttgtc aagaccgacc tgcctggtc cctgatgaa ctgcaggagc 276C
agcgacgcg gctatcgtgg ctggccaaga cggcgcttc ttgcgcagct gtgcagacg 282C
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tatlggcgca aqlgccqggg caggatctcc 288C
tgtcatctca ccttgcctct gccgagaaag tatccatcat ggtgatgca atgcggcggc 294C
tgcatacgtc tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaacat cgcattcagc 300C
gagcacqtac tccgatggaa gccqqtcttg tcatcagga tgatctggac gaagagcatc 306C
aggggctcgc gccagccgaa ctggtcgcca gcttgcgca ccycatgccc gacggcgagg 312C
atctcgtcgt gaccatggc gatgacctgt tgcgaatat catggtggaa aatggccgct 318C
ttctgqatt catcgactgt ggcggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 324C
tggtacccg tgatattgct gaaagacttg gcqccaatg ggtgaccgc ttcctcgtgc 330C
tttacggtat cggcgtccc gatcgcagc gcatgcctt ctatgcctt cttgaccagt 336C
tctctgagc gggactctgg gttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccc acctgcatc 342C
acgagattc gatccaccg ccgcttcta tgaaggttg ggttcggaa tcgttttccg 348C
ggacgcgggc tggatgatcc tccagcgcg ggalctcalg ctggagtct tcgcccacgc 354C
tagcggcgcg ccggccggcc cgtgtgaaa taccgcacag atcgcgtaagg agaaaaatcc 360C
gatcauqcg ctcttcgct tctcgtcga ctgactcgt gcctcggtc gctcggctg 366C
ggcgagcgg tcaauggcy taalacggtt atccacagaa tcaggggata 372C
acgcagaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccy 378C
cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaac aatcgacgct 384C
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataagata ccaggcgttt ccccctggaa 390C
gctccctcgt gcgctctcct gtcccagcc tgcgcttac cggataacct tccgctttc 396C
tcccttcggg aagcgtggc cttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtc 402C
aggtcgttcg ctccaagctg ggtcgtgtgc acgaaccctc cgttcagccc gaccgctgcg 408C
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acctggtaag acacgactta tcgccactgg 414C
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aqggcgtgct acagagtct 420C
tgaagtggg gcctaactac ggctacacta gaaggacaqt atttggtatc tgcgctctgc 426C
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtactcttg atccggcaaa caaacctccg 432C
ctqgtaycgt tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 438C
aagaagatcc ttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt 444C
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggalctcac ctagatcctt ttaaaggccg 450C
gccggccgg ccatcggcat ttctttttgc gtttttattt gtttaactgtt aattgicctt 456C
gttcaaggat qctgtctttg acaacagatg tttcttggc ttgatgttc agcaggaagc 462C
tcggcgaaaa cgttgattgt ttgtctcgtt agaatcctct gtttgtcata tagcttghaa 468C
tcacgacatt gtttcccttc gcttgaggta cagcqaagtg tgagttaagta aaggttacat 474C
cgttagatc aagatccatt ttaacacaaa ggccagttt gttcagcggc ttgtatggcg 480C
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgaatatc gtttagacgta atgccgtcaa 486C
cgtcatttt tgatccgcg agtcagtgga atcaggtacca tttgcccgtt 492C
cgttcgcgcg ttoaattea tctgttactg ttttagatgc aatcagcgg 498C
  
```

ES 2 355 942 T3

```

5      ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgcctgtt gctaactcag 5040
      ccgatgcgtt tttatcgctt tgcagaagt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 5100
      ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 5160
10     cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 5220
      tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt tgccttcacg gatgaactgc tgtacatctt 5280
      gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 5340
      aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 5400
      gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 5460
15     aacctgacca ttcttgtggt tggcttttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgcgc 5520
      tgtctttaaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttgc cgcacttttt 5580
      gatagaacat gtaaatcgat gtgtcaccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5640
      cgatgtggtg gccgtgatag tttgcgacg tgcctcagc gttttgtaat ggccagctgt 5700
      cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5760
20     aaacttgata tttttcattt ttttgcgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5820
      tatgggaaat gccgtatggt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5880
      gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaagttaa tactgttgct tgttttgcaa 5940
      actttttgat gttcatcgtt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 6000
      ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 6060
25     tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacattttag gtcttgctgt 6120
      ctttatcagt aacaaaccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgtt 6180
      tggattgcaa ctggtctatt ttctctttt gttgalaga aaatcataaa aggatttgca 6240
      gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 6300
      tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 6360
30     tatctcattt cactaaataa tagtgaacg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 6420
      gcgccgctc gatttaaatc                                     6440

```

30 <210> 9

<211> 5106

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

40

45

50

55

60

65

ES 2 355 942 T3

<400> 9

```

5      tcgaggtcga  cggtatcgat  ggtttgatgt  tggttccgat  gggcatcacc  tctgtggtga  60
      tgtcaccagt  aattggacga  ttggtggatc  gcctggcacc  aggaatgacc  tccaagatcg  120
      gattcggcgc  gctgattttc  tcgatggcgt  tgatggctgt  ctttatgacc  gccaacctat  180
      cgccgtgggtg  gctactcacc  ccgattatct  tgttcggtag  ctccaacgcg  atgagttttg  240
      caccgaactc  tgtgattgct  ctgctgatg  ttccgcagga  tttagtgggc  tctgcttctg  300
10     gtttttacia  cacctcacgc  caggtgggcg  ctgttttggg  cgccgctacc  ttgggcctcg  360
      tgatgcaaat  aggagtgggc  acggtgtcct  tcggtgttgc  catgggtgcg  gcaatcctgg  420
      tgacactcgt  gcccttaatc  tttgggttcc  tagcggtaac  ccaatgctag  ctcltctgac  480
      gatgtttcaa  ggttcgcgaa  atcaccgggt  ggcagaaagc  tgccccgggg  gtttcctcgc  540
      ctttttgtaa  tcgaggtcgt  cccacttaac  gcttaaaatt  tccattcaga  aagctttggc  600
15     gttcctcacc  atccggggct  ccagcgagag  gattaaaagt  gaaccgattg  cgttttcaac  660
      caaaccttag  actgctcggg  ctgtcaagaa  gttccgggga  tttaaattca  tgggtgccgt  720
      ttgggctcct  gttgtctgcg  tcgggtgggg  aagtggcgt  aaggtgtgca  acctcatagt  780
      caagttgacg  gaaaagggga  gatcgcatct  taccctcgca  gattttgggg  aacctgtttt  840
      gaactggggg  ttgcaaaaat  gcaacgcggg  gacgtgtggt  tacaactagt  tctagacctg  900
20     ggatttaaat  cgctagcggg  ctgctaaagg  aagcggaaac  cgtagaaagc  cagtcgcgag  960
      aaacgggtgt  gaccccggt  gaatgtcagc  tactgggcta  tctggacaag  ggaaaacgca  1020
      agcgcgaaaga  gaaagcaggt  agcttgcagt  gggcttacat  ggcgatagct  agactgggcg  1080
      gttttatgga  cagcaagcga  accggaattg  ccagctgggg  cgccctctgg  taaggttggg  1140
      aagccctgca  aagtaaactg  gatggctttc  ttgccgcaa  ggatctgatg  gcgcagggga  1200
25     tcaagatctg  atcaagagac  aggatgagga  tcgtttcgca  tgattgaaca  agatggattg  1260
      caccgaggtt  ctccggccgc  ttgggtggag  aggctattcg  gctatgactg  ggcacaacag  1320
      acaatcggct  gctctgatgc  cgccgtgttc  cggctgtcag  cgcaggggcg  cccggttctt  1380
      tttgtcaaga  ccgacctgtc  cggtgccctg  aatgaactgc  aggacgaggc  agcgcggcta  1440
      tcgtggctgg  ccacgacggg  cgttccttgc  gcagctgtgc  tcgacgttgt  cactgaagcg  1500
30     ggaagggact  ggctgctatt  gggcgaagtg  ccggggcagg  atctcctgtc  atctcacctt  1560
      gctcctgccg  agaaagtatc  catcatggct  gatgcaatgc  ggcggctgca  tacgcttgat  1620
      ccggctacct  gccattcga  ccaccaagcg  aaacatcgca  tcgagcgagc  acgtactcgg  1680
      atggaagccg  gtcttgtcga  tcaggatgat  ctggacgaag  agcatcaggg  gctcgcgcca  1740

```

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 355 942 T3

	gccgaactgt	tcgccaggct	caaggcgcgc	atgcccgacg	gcgaggatct	cgtcgtgacc	1800
	catggcgatg	cctgcttgcc	gaatatcatg	gtggaaaatg	gccgcttttc	tggattcatc	1860
	gactgtggcc	ggctgggtgt	ggcggaccgc	tatcaggaca	tagcgttggc	taccctgat	1920
5	attgctgaag	agcttggcgg	cgaatgggct	gaccgcttcc	tcgtgcttta	cggatcggc	1980
	gctcccgat	cgcagcgc	cgccttctat	cgccttcttg	acgagtctt	ctgagcggga	2040
	ctctgggggt	cgaaatgacc	gaccaagcga	cgcccaacct	gccatcacga	gatttcgatt	2100
	ccaccgccc	cttctatgaa	aggttgggct	tcggaatcgt	tttccgggac	gccggctgga	2160
10	tgatcctcca	gcgcggggat	ctcatgctgg	agttcttcgc	ccacgctagc	ggcgcgccgg	2220
	ccggcccgg	gtgaaatacc	gcacagatgc	gtaaggagaa	aataccgcat	caggcgtct	2280
	tccgcttco	cgctcactga	ctcgctgcgc	tcggtcgttc	ggctgcggcg	agcggtatca	2340
	gctcactcaa	aggcggta	acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	aggaaagaac	2400
	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgct	gctggcgttt	2460
15	ttccatagc	tccgcccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagagggtg	2520
	cgaaacccga	caggactata	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	2580
	tctcctgct	cgaccctgcc	gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	ttcgggaagc	2640
	gtggcgttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	cgggtgagtt	cgctcgtctc	2700
	aagctgggct	gtgtgcacga	acccccggt	cagccccacc	gctgcgcctt	atccggtaac	2760
20	tatcgtcttg	agtccaacc	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	agccactggt	2820
	aacaggatta	gcagagcag	gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	gtggtgccct	2880
	aactacggct	acactagaag	gacagtat	ggtatctgcg	ctctgctgaa	gccagttacc	2940
	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaaacaaa	ccaccgctgg	tagcgggtgt	3000
	ttttttggt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	agatcctttg	3060
25	atcttttcta	cggggtctga	cgctcagtag	aacgaaaact	cacgttaagg	gattttggtc	3120
	atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	aggccggccg	cggccgccat	3180
	cggcattttc	ttttgcggtt	ttatttggtt	actgttaatt	gtccttggtc	aaggatgctg	3240
	tctttgacaa	cagatgtttt	cttgcccttg	atgttcagca	ggaagctcgg	cgcaaaccgt	3300
	gattgtttgt	ctgcgtagaa	tcctctggtt	gtcataatagc	ttgtaatcac	gacattgttt	3360
30	cctttcgctt	gaggtacagc	gaagtgtgag	taagtaaagg	ttacatcgtt	aggtcaaga	3420
	tccattttta	acacaaggcc	agttttggtc	agcggcttgt	atgggccagt	taaagaatta	3480
	gaaacataac	caagcatgta	aatatcgtta	gacgtaatgc	cgtaatcgt	ctttttgat	3540
	ccgcgggagt	cagtgaacag	gtaccatttg	ccgttcattt	taaagacggt	cgcgcgttca	3600
	atctcatctg	ttactgtggt	agatgcaatc	agcggtttca	tcactttttt	cagtgtgtaa	3660
35	tcacgtttta	gctcaatcat	accgagagcg	ccgtttgcta	actcagccgt	gcgtttttta	3720
	tcgctttgca	gaagtttttg	actttcttga	cggaagaatg	atgtgctttt	gccatagtat	3780
	gctttgttaa	ataaagattc	ttcgccttgg	tagccatctt	cagttccagt	gtttgcttca	3840
	aatactaagt	atgtgtggcc	tttatcttct	acgtagttag	gatctctcag	cgatgggttg	3900
	tcgctgagc	tgtagtggc	ttcatcgatg	aactgctgta	cattttgata	cgtttttccg	3960
40	tcaccgtcaa	agattgattt	ataatcctct	acaccgttga	tgttcaaaga	gctgtctgat	4020
	gctgatacgt	taacttgtgc	agttgtcag	gtttgtttgc	cgtaatgttt	accggagaaa	4080
	tcagtgtaga	ataaacggat	ttttccgtca	gatgtaaagt	tggctgaacc	tgaccattct	4140
	tgtgtttggt	cttttaggat	agaatcattt	gcatcgaatt	tgtcgtgctc	tttaaagacg	4200
	cggccagcgt	ttttccagct	gtcaatagaa	gtttcgccga	ctttttgata	gaacatgtaa	4260
45	atcgatgtgt	catccgcatt	tttaggatct	ccggctaagt	caaagacgat	gtggtagccg	4320
	tgatagtttg	cgacagtgcc	gtcagcgttt	tgtaatggcc	agctgtccc	aacgtccagg	4380
	ccttttgag	aagagatatt	tttaattgtg	gacgaatcaa	attcagaaac	ttgatatttt	4440
	tcattttttt	gctgttcagg	gatttgcagc	atatcatggc	gtgtaatatg	ggaaatgccg	4500
	tatgtttcct	tatatggctt	ttggttcgtt	tctttcgcaa	acgcttgagt	tgcgcctcct	4560
50	gccagcagtg	cggtagtaaa	ggttaatact	gttgcctggt	ttgcaaactt	tttgatgttc	4620
	atcgttcgat	tctccttttt	tatgtactgt	gttagcggtc	tgcttcttcc	agccctcctg	4680
	tttgaagatg	gcaagttagt	taccacaatg	aaaaaaagac	ctaaaatatg	taagggtgta	4740
	cgccaaagta	tacactttgc	cctttacaca	ttttaggctc	tgctgctttt	atcagtaaca	4800
	aaccgcgcg	atctactttt	cgacctcatt	ctattagact	ctcgtttgga	ttgcaactgg	4860
55	tctattttcc	tcttttggtt	gatagaaaat	cataaaagga	tttgacagact	acgggcctaa	4920
	agaactaaaa	aatctatctg	tttcttttca	ttctctgtat	tttttatagt	ttctgttgca	4980
	tgggcataaaa	gttgcctttt	taatcacaat	tcagaaaata	tcataaatatc	tcatttcact	5040
	aaataatagt	gaaccggcagg	tatatgtgat	gggttaaaaa	ggatcggcgg	ccgctcgatt	5100
60	taaate						5106

<210> 10

<211> 5512

65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 355 942 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

5 <400> 10

	tcgagaggcc	tgacgtcggg	cccggtagca	cgcgatcatat	gactagttcg	gacctagggg	60
10	tatcgctcgac	atcgatgctc	ttctgctgta	attaacaatt	gggatctctc	aactaatgca	120
	gcgatgcggt	ctttccagaa	tgctttcatg	acagggatgc	tgtcttgatc	aggcagggcg	180
	ctgtgctgga	tgccgaagct	ggattttattg	tcgcctttgg	aggtgaagtt	gacgctcact	240
	cgagaatcat	cggccaacca	tttggcattg	aatgttctag	gttcggaggc	ggaggttttc	300
	tcaattagtg	cgggatcgag	ccactgccc	cgaggtcat	cgtctccgaa	gagctccac	360
15	açtttttcga	ccggcaggtt	aagggtttt	gaggcatgg	ccgcgaaccc	atcgctggtc	420
	atccccgggt	tgccgatgcc	acgttcgtat	tcataaccaa	tcgcatgcc	ttgagcccac	480
	cagccactga	catcaaagt	gtccacgatg	tgctttgcga	tgtgggtgtg	agtccaagag	540
	gtggctttta	cgtcgtcaag	caatttttagc	cactcttccc	acggctttcc	ggtgccgttg	600
	aggatagctt	caggggacat	gcctgggtgt	gagccttgcg	gagtggagtc	agtcacgca	660
20	ccgagactag	tggcgctttg	gtacccttgg	tgtatggcta	cttcccagcg	gtcgcggaag	720
	gcgatgacgt	ggtgatcttg	gaatccccgg	atccacacgc	agccgaacgc	atgcgcttta	780
	gcttcccacg	ccagcagcgc	ggcaggttct	tgtgcatcgc	ggatttcatt	cgcccacgcg	840
	agcaagctgt	caaggacggc	caagtggacg	tcatgccatt	ccagctggtc	accatgggta	900
	atcctaltgc	tgatttcgcc	aacgagttgt	tcgcagccaa	tgaataccgc	gagtacttgg	960
25	aagttcacgg	catcggcgtg	cagctcaccg	aagcatggc	cgagtactgg	cactcccagag	1020
	tgccgcagcga	actcaagctg	aacgacggg	gatctgtcgc	tgattttgat	ccagaagaca	1080
	agaccaagtt	cttcgacctg	gattaccgcg	gcgcccgctt	ctcctttggt	tacggttctt	1140
	gccctgatct	ggaagaccgc	gcaaagctgg	tggaattgct	cgagccaggc	cgtatcggcg	1200
	tggagttgtc	cgaggaaactc	cagctgcacc	cagagcagtc	cacagacgcg	tttgtgctct	1260
30	accaccacaga	ggcaaagtac	tttaacgtct	aatctagacc	cgggatttaa	atgatccgct	1320
	agcgggctgc	taaaggaagc	ggaacacgta	gaaagccagt	ccgcagaaac	ggtgctgacc	1380
	ccggatgaat	gtcagctact	ggyctatctg	gacaagggaa	aaccgaagcg	caaagagaaa	1440
	gcaggtagct	tgcatggggc	ttacatggcg	atagctagac	tggcggttt	tatggacagc	1500
	aagcgaaccg	gaattgccag	ctggggcgcc	ctctggtaag	gttgggaagc	cctgcaaagt	1560
35	aaactggatg	gctttcttgc	cgcaaggat	ctgatggcgc	aggggatcaa	gatctgatca	1620
	agagacagga	tgaggatcgt	ttcgcatgat	tgaacaagat	ggattgcacg	caggttctcc	1680
	ggccgcttgg	gtggagaggc	tattcggcta	tgactgggca	caacagacaa	tcggctgctc	1740
	tgatgcccgg	gtgttccggc	tgtcagcgca	ggggcgcccg	gttctttttg	ccaagaccga	1800
	cctgtccggt	gccctgaatg	aactgcagga	cgaggcagcg	cggctatcgt	ggctggccac	1860
40	gacgggctgt	ccttgcgcag	ctgtgctcga	cgttgtcact	gaagcgggaa	gggactggct	1920
	gctattgggc	gaagtgccgg	ggcaggatct	cctgtcatct	caccttgctc	ctgccgagaa	1980
	agtatccatc	atggctgatg	caatgcggcg	gctgcatacg	cttgatccgg	ctacctgccc	2040
	atcagaccac	caagcgaaac	atcgcacgca	cgagcacgct	actcggatgg	aagccggtct	2100
	tgtcgatcag	gatgatctgg	acgaagagca	tcaggggctc	gcgccagccg	aactgttcgc	2160
	caggctcaag	gcgcgcgatgc	ccgacggcga	ggatctcgtc	gtgacccatg	gcgatgcctg	2220
45	cttgcccgaat	atcatggtgg	aaaatggccg	cttttctgga	ttcatcgact	gtggccggct	2280
	gggtgtggcg	gaccgctatc	aggacatagc	gttggctacc	cgtgatattg	ctgaagagct	2340
	tggcggcgaa	tgggctgacc	gcttctctgt	gctttacggg	atcgccgctc	ccgattcgca	2400
	gcgcacgcgc	ttctatcgcc	ttcttgacga	gttctctgga	gcgggactct	ggggttcgaa	2460
	atgaccgacc	aagcgcagcc	caacctgcca	tcacgagatt	tcgattccac	cgccccttcc	2520
	tatgaaaggt	tgggcttcgg	aatcgttttc	cgggacggcg	gctggatgat	cctccagcgc	2580
50	ggggatctca	tgctggagtt	cttcgcccac	gctagcggcg	cgccggccgg	cccgggtgga	2640
	aataccgcac	agatgcgtaa	ggagaaaata	ccgcatcagg	cgctcttccg	cttctctcgt	2700
	cactgactcg	ctgcgctcgg	tcgttcggct	gcggcgagcg	gtatcagctc	actcaaaggc	2760
	ggtaatacgg	ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	agaacatgt	gagcaaaagg	2820
	ccagcaaaag	gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgcttgcctg	gcgtttttcc	ataggctccg	2880
55	ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcag	aggtggcgaa	acccgacagg	2940
	actataaaga	taccaggcgt	ttccccctgg	aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	3000

60

65

ES 2 355 942 T3

```

cctgccgctt accggatacc tqtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca 3060
tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 3120
gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 3180
5 caaccgggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggttaaca ggattagcag 3240
agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 3300
tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 3360
tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa 3420
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 3480
10 gtctgacgct cagtggaaag aaaactcacg ttaagggttt ttggtcatga gattatcaaa 3540
aaggatcttc acctagatcc ttttaaaggg cggccgcggc cgccatcggc attttctttt 3600
gcgtttttat ttgttaactg ttaattgtcc ttgttcaagg atgctgtctt tgacaacaga 3660
tgtttctctg cctttgatgt tcagcaggaa gctcggcgca aacgttgatt gtttgcctgc 3720
gtagaatcct ctgttttgtca tatagcttgt aatcacgcaca ttgtttcctt tcgcttgagg 3780

15 tacagcgaag tgtgagtaag taaaggttac atcgtttagga tcaagatcca tttttaacac 3840
aaggccagtc ttgttcagcg gcttqtatgg gccagttaaa gaattagaaa cataaccaag 3900
catgtaataa tcgttagacg taatgccgtc aatcgtcatt tttgatccgc gggagtcagt 3960
gaacaggtac catttgccgt tcattttaaa gacgttcgcg cgttcaattt catctgttac 4020
20 tgtgttagat gcaatcagcg gtttcatcac ttttttcagt gtglaatcat cgtttagctc 4080
aatcataccg agagegcgct ttgctaactc agccgtgcgt tttttatcgc tttgcagaag 4140
tttttgactt tcttgacgga agaatgatgt gcttttgcca tagtatgctt tgttaataa 4200
agattcttcg ccttggtagc catcttcagt tccagtgttt gcttcaataa ctaagtattt 4260
gtggccttta tcttctacgt agtgaggatc tctcagcgta tggttgtcgc ctgagctgta 4320
25 gttgccttca tcgatgaact gctgtacatt ttgatacgtt tttccgtcac cgtcaaagat 4380
tgatttataa tctctacac cgttgatgtt caaagagctg tctgatgctg atacgttaac 4440
ttgtgcagtt gtcagtgttt gtttgccgta atgtttaccg gagaaatcag tgtagaataa 4500
acggattttt ccgtcagatg taaatgtggc tgaacctgac cattcttctg tttggtcttt 4560
taggatagaa tcatttgcac cgaatttgtc gctgtcttta aagacgcggc cagcgttttt 4620
30 ccagctgtca atagaagttt cgcgcacttt ttgatagaac atgtaaatcg atgtgtcac 4680
cgcattttta ggatctcggg ctaatgcaaa gacgatgtgg tagccgtgat agtttgcgac 4740
agtgcgctca gcgttttqta atggccagct gtcccaaacg tccaggecct ttgcagaaga 4800
gatattttta attgtggacg aatcaaattc agaaacttga tatttttcat ttttttgcg 4860
ttcaggggatt tgcagcatat catggcgtgt aatatgggaa atgccgtatg tttccttata 4920
35 tggcttttgg ttcgtttctt tcgcaaacgc ttgagttgcg cctcctgcca gcagtgcggt 4980
agtaaagggt aatactgttg cttgttttgc aaactttttg atgttcacg ttcagtctc 5040
cttttttatg tactgtgtta gcggtctgct tcttcagcc ctctgtttg aagatggcaa 5100
gttagttacg cacaaataaa aaagacctaa aatatgtaag gggtagcggc aaagtataca 5160
ctttgccctt tacacatttt aggtcttgc tgetttatca gtaacaaacc cgcgcgattt 5220
40 acttttcgac ctcatctat tagactctcg tttggattgc aactggctca ttttctctt 5280
ttgtttgata gaaaatcata aaaggatttg cagactacgg gcctaagaa ctaaaaaatc 5340
tatctgtttc ttttcattct ctgtattttt tatagtttct gttgcatggg cataaagtgt 5400
cctttttaat cacaaatcag aaaaatcat aatatctcat ttcactaaat aatagtgaac 5460
55 ggcaggtata tgtgatgggt taaaaaggat cggcggcgcc tcgatttaaa tc 5512

```

<210> 11

<211> 914

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

ES 2 355 942 T3

<400> 11

```

5      atgccaaagt acgacaattc caatgctgac cagtggggct ttgaaaccgg ctccattcac 60
      gcaggccagt cagtagacgc acagaccagc gcacgaaacc ttccgatcta ccaatccacc 120
      gctttcgtgt tcgactccgc tgagcacgcc aagcagcgtt tcgcacttga ggatctaggg 180
      cctgtttact cccgcctcac caacccaacc gttgaggctt tggaaaaccg catcgcttcc 240
      ctogaagggt ggcgtccaagc tgtageggtt tcttccggac aggccgcaac caccaacgcc 300
10     attttgaacc tggcaggagc gggcgaccac atcgtcacct ccccacgcct ctacgggtggc 360
      accgagactc tattccttat cactcttaac cgcctgggta tcgatgtttc cttcgtggaa 420
      aaccccagcg accctgagtc ctggcaggca gccgttcagc caaacaccaa agcattcttc 480
      ggcgagactt tcgccaaccc acaggcagac gtcttgata ttctgcggt ggctgaagtt 540
      gcgcaccgca acagcgttcc actgatcadc gacaacacca tcgctaccgc agcgctcgtg 600
15     cgcccgtctt cctcgttgt taccagca accaccacc attcacagtc cgacgaagct 660
      ggctggcac gcgcggggt taccagtc accgtccgc tgctcggttg catcgagacc 720
      attgatgata tcatcgctga cctcgaaggc ggctttgctg caatctagct ttaaatagac 780
      tcaccccagt gcttaaagcg ctgggtttt cttttcaga ctcgtgagaa tgcaaactag 840
      actagacaga gctgtccata tacactggac gaagttttag tcttgtccac ccagaacagg 900
20     cggttatatt catg 914

```

<210> 12

25 <211> 184

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

<400> 12

```

35
      ggctcgagcgg cttaaagtt ggctgccatg tgaattttta gcaccctcaa cagttgagtg 60
      ctggcactct cgggggtaga gtgccaaata ggttgtttga cacacagttg ttcaccgcg 120
40     acgacggctg tgctggaac ccacaaccgg cacacacaaa atttttctca tggagggatt 180
      catc 184

```

45 <210> 13

<211> 8554

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

55

60

65

ES 2 355 942 T3

<400> 13

5 tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtaccg ttgctcgtg atctttcggc ttaacaactt 60
 6 tgtattcaat cagtcgggca tagaaagaaa acgcaatgat ataggaacca actgccgcca 120
 7 aaaccagcca cacagagttg attgtttcgc cacgggagaa agcgattgct ccccaacca 180
 8 ccgccgcat aaccccaaag acaaggagac caacgcgggc ggtcggtgac attttagggg 240
 9 acttcttcac gcctaactga aggtcagtag cgttgctgta caccaaatca tcgtcattga 300
 10 tgttgctcagt ctgttttatg gtcacgatct ttactgtttt ctcttcgggt cgtttcaaag 360
 11 ccactatgcg tagaaacagc gggcagaaac tgtgtgcaga aatgcatgca gaaaaaggaa 420
 12 agttcggcca gatgggtgtt tctgtatgcc gatgatcgga tctttgacag ctgggtatgc 480
 13 gacaaatcac cgagagttgt taattcttaa caatggaaaa gtaacattga gagatgattt 540
 14 ataccatcct gcaccattta gagtggggct agtcataccc ccataaccct agctgtacgc 600
 15 aatcgatttc aaatcagttg gaaaaagtca agaaaattac ccgagacata tgcggcttaa 660
 16 agtttggtcg ccatgtgaat ttttagcacc ctcaacagtt gagtgctggc actctcggag 720
 17 gtagagtgcc aaatagttg ttgacacac agttgttcac ccgcgacgac ggtgtgtctg 780
 18 gaaaccacac accggcacac acaaaathtt tctcatggag ggattcatca tgccaaagta 840
 19 cgacaattcc aatgctgacc agtggggctt tgaaccggc tccattcacg caggccagtc 900
 20 agtagacgca cagaccagcg cacgaaacct tccgatctac caatccaccg ctttcgtgtt 960
 21 cgactccgct gagcacgcca agcagcgttt cgcacttgag gatctaggcc ctgtttactc 1020
 22 ccgcctcacc aaccacaccg ttgaggcttt ggaaaaccgc atcgcttccc tcgaagggtg 1080
 23 cgtccacgct gtagcgttct cctccggaca ggccgcaacc accaacgcca ttttgaacct 1140
 24 ggcaggagcg ggcgaccaca tcgtcacctc cccagcctc tacggtggca cagagactct 1200
 25 attccttate actcttaacc gcctgggtat cagtgtttcc ttcgtggaaa accccgacga 1260
 26 ceetgagtc tggcaggcag ccgttcagcc aaacacccaa gcattcttcg gcgagacttt 1320
 27 cgccaacca caggcagacg tcctggatat tcctgcggtg gctgaagttg cgcaccgcaa 1380
 28 cagcgttcca ctgatcatcg acaacaccat cgctaccgca gcgctcgtgc gcccgctcga 1440
 29 gctcggcgca gacgttgtcg tcgcttccct caccaagttc tacaccggca acggtccgg 1500
 30 actggggcgg gtgcttatcg acggcggaat gtctgattgg actgtcgaat aggatggaaa 1560
 31 gccagtattc ccctacttcg tcactccaga tgctgcttac cacggattga agtaccgaga 1620
 32 ccttggtgca ccagccttcg gcctcaaggt tcgcgttggc cttctacgcg acaccggctc 1680
 33 caccctctcc gcattcaacg catgggctgc agtccagggc atcgacacc tttccctcgc 1740
 34 cctggagcgc cacaacgaaa acgcatcaa ggtgcagaa ttctcaaca accacgagaa 1800
 35 ggtggaaaag gttacttcg caggcctgaa ggattcccct tggtagcga ccaaggaaaa 1860
 36 gcttggcctg aagtaaccg getccgttct caccttcgag atcaaggcg gcaaggatga 1920
 37 ggcttgggca tttatcgacg cctgaagct acactccaac ctgcaaaaca tcggcgatgt 1980
 38 tcgctccctc gttgttcacc cagcaaccac caccattca cagtccgacg aagctggcct 2040
 39 ggcacgcgcg ggcgttacc agtccaccgt ccgcctgtcc gttggcatcg agaccattga 2100
 40 tgatatcatc gctgacctcg aaggcggctt tgctgcaatc tagcactagt tcggacctag 2160
 41 ggatatcgtc gagagctgcc aattattccg ggttgtgac ccgctacccg ataaataggt 2220
 42 cggtgaaaa atttcgttc aatatcaaca aaaaggccta tcattgggag gtgtcgcacc 2280
 43 aagtactttt gcgaagcgc atctgacgga ttttcaaaag atgtatatgc tcggtcggga 2340
 44 aacctacgaa aggattttt acccatgcc accctcgcgc cttcaggta acttgaaatc 2400
 45 caagcgatcg gtgatgtctc caccgaagcc ggagcaatca ttacaaacgc tgaatcgcc 2460
 46 tatcaccgct ggggtgaata ccgcgtagat aaagaaggac gcagcaatgt cgttctcatc 2520
 47 gaacacgccc tcaactggaga ttccaacgca gccgattggt gggctgactt gctcggccc 2580
 48 ggcaaagcca tcaacactga tatttactgc gtgatctgta ccaacgtcat cgggtggttc 2640
 49 aacggttcca ccggacctgg ctccatgcat ccagatggaa atttctgggg taatcgcttc 2700
 50 cccgccacgt ccatctgta tcaggtaaac gccgaaaaac aattcctcga cgcactcggc 2760
 51 atcaccacgg tcgccgcagt acttggtggt tccatgggtg gtgcccgcac cctagagtgg 2820

55

60

65

ES 2 355 942 T3

5 ggcgcaatgt acccagaaac tgttggcgca gctgctgttc ttgcagtttc tgcacgcgcc 2880
 agcgctggc aaatcggcac tcaatccgcc caaattaagg cgattgaaa cgaccaccac 2940
 tggcacgaag gcaactacta cgaatccggc tgcaaccag ccaccggact cggcgccgcc 3000
 cgacgcatcg cccacctcac ctaccgtggc gaactagaaa tcgacgaacg ctctcggcacc 3060
 aaagcccaaa agaacgaaaa cccactcggc ccctaccgca agcccgacca gcgcttcgcc 3120
 gtggaatcct acttgacta ccaagcagac aagtagtac agcgtttcga cgcggctcc 3180
 tacgtcttgc taccggacgc cctcaaccgc cagcagattg gtgcgaccg cggaggcctc 3240
 aacaaggcac tcgaatccat caaagttcca gtccttgcg caggcgtaga taccgatatt 3300
 10 ttgtaccctt accaccagca agaacacctc tccagaaacc tgggaaatct actggcaatg 3360
 gcaaaaatcg tatcccctgt cggccaatcg gcttctctca ccgaaagccg ccaaatggat 3420
 cgatcgtga ggaacttctt cagcctcacc tcccagacg aagacaacc ttcgacctac 3480
 atcgagttct acatctaaca tatgactagt tcggacctag ggatctcgtc gacatcgatg 3540
 ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc tctagaccg ggatttaaat cgctagcggg 3600
 ctgctaaagg aagcggaaca cgtagaagc cagtccgag aaacgggtgt gaccccggat 3660
 15 gaatgtcagc tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt 3720
 agcttgacg gggcttacat ggcgatagct agactggcg gttttatgga cagcaagcga 3780
 accggaattg ccagctggg cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaactg 3840
 gatggctttc ttgcgcgcaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac 3900
 20 aggatgagga tcgtttcgca tgatgaaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc 3960
 ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc 4020
 cgccgtgttc ccgctgtcag cgcagggcg cccggttctt ttgtcaaga ccgacctgtc 4080
 cggtgccctg aatgaaactgc aggcagaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg 4140
 cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt 4200
 gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacct gctcctgcc agaaagtatc 4260
 25 catcatggct gatgcaatgc ggcggtgca tacgctgat ccggtacct gcccatcga 4320
 ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcg atggaagccg gtcttctgca 4380
 tcaggatgat ctggacgaag agcatcagg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct 4440
 caaggcgcgc atgccgcag gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc 4500
 gaatatcatg gtgaaaaatg gccgctttc tggattcacc gactgtggcc ggctgggtgt 4560
 30 ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc taccctgat attgctgaag agcttggcg 4620
 cgaatgggct caccgttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccatt cgcagcgat 4680
 cgcttctat cgcttcttg acgagttct ctgagcggga ctctggggtt cgaatgacc 4740
 gaccaagcga cgccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccg ctctatgaa 4800
 aggttgggct tcggaatcgt ttccgggac gccggtgga tgatcctca gcgcggggat 4860
 35 ctcatgctgg agttcttcgc ccacgctagc ggcgcgcgg cggcccgggt gtgaaatacc 4920
 gcacgatgac gtaaggagaa aataccgat caggcgctct tccgcttctt cgctcactga 4980
 ctogctgcgc tcggtcgctt ggctcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat 5040
 acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca 5100
 aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt gctggcgctt ttccatagge tccgcccccc 5160
 40 tgacggcat caaaaaatc gacgctcaag ctgaggtgg cagaaaccga caggactata 5220
 aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgccc tctcctgttc cgaccctgcc 5280
 gcttaccgga tactgtccg ccttctccc ttccgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc 5340
 acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgttcgtcc aagctgggt gtgtgacga 5400
 acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tategtcttg agtccaacc 5460
 45 ggtaagacac cactggcagc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcag 5520
 gtatgtaggc ggtgctacag agttctttaa gtgggtggcct aactacggct acactagaag 5580
 gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttccgaaaaa gagttggtag 5640
 ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca 5700
 gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta cggggtctga 5760
 50 cgctcagtg aacgaaaaact cacgttaagg gattttgtc atgagattat caaaaaggat 5820
 cttcacctag atccttttaa agccggcgg cggccgcgca aagtcccgt tcgtgaaaat 5880
 tttcgtgccc cgtgattttc cgcaaaaaac tttaacgaac gttcgttata atgggtgcat 5940
 gaccttcacg acgaagtact aaaattggcc cgaatcatca gctatggatc tctctgatgt 6000
 cgcgctggag tcgcagcgc tcgatgctgc cgtcgattta aaaacggtga tcggattttt 6060
 ccgagctctc gatacagcgg acgcgccagc atcacgagac tgggccagt cgcgagcga 6120
 cctagaaact ctctggcgg atctgagga gctggctgac gagctgctg ctcgccagc 6180
 55 gccaggagga cgcacagtag tggaggatgc aatcagttgc gcctactcg gtggcctgat 6240
 toctccccg cctgacccgc gaggacggcg cgcaaaatat tgctcagat cgtgtcgtgc 6300
 cgcagccag cgcgagcgc ccaacaaacg ccacgccgag gagctggagg cggctaggtc 6360
 gcaaatggcg ctggaagtgc gtccccgag cgaaattttg gccatggtcg tcacagagct 6420
 ggaagcggca gcgagaatta tcgcatcgt ggcggtgcc gcaggcatga caaacatcgt 6480
 60 aatgccgcg tttcgtgtgc cgtggccgc cgctcgaaa agcgcacag gcggcaagaa gcgataagct 6540
 ccgaatcggc agcagcgtcg cgtgaacgccc cgtgagcgg aactcacagg gcgtcgcta 6600
 gcacgaatc caaacctggg agaaagcgt caaaaatgac tctagcggat tcacgagaca 6660
 acccccagtc ggcctgaaa ttttccgct atctgttcca caccatccc gagctcgcgc 6720
 ttgacacacc

ES 2 355 942 T3

```

5   tgcgatcacg tggctggacg agcgaagacc gccgcgaatt cctcgctcac ctgggcagag 6840
    aaaatttcca gggcagcaag acccgcgact tcgccagcgc ttggatcaaa gaccgggaca 6900
    cggagaaaca cagccgaagt tataccgagt ttggtcaaaa tcgcttgccc ggtgccagta 6960
    tgttgctctg acgcacgcgc agcacgcagc cgtgcttgtc ctggacattg atgtgccgag 7020
    ccaccaggcc ggccgggaaaa tcgagcacgt aaaccccag gttctacgcga ttttggagcg 7080
    ctgggcacgc ctggaaaaag cgccagcttg gatcggcgtg aatccactga gcgggaaatg 7140
    ccagctcatc tggctcattg atccggtgta tgccgcagca ggcatgagca gccccaatat 7200
    gcgectgctg gctgcaacga ccgaggaaat gaccgcgctt ttcggcgctg accaggcttt 7260
    ttcacatagg ctgagccgtg gccactgcac tctccgacga tcccagccgt accgctggca 7320
10  tgcccagcac aatcgctgg atcgcttagc tgatcttatg gaggttgctc gcatgatctc 7380
    aggcacagaa aaacctaaaa aacgctatga gcaggagttd tctagcggac gggcacgtat 7440
    cgaagcggca agaaaaagcca ctgcggaagc aaaagcactt gccacgcttg aagcaagcct 7500
    gccgagcgcc gctgaagcgt ctggagagct gatcgacggc gtccgtgtcc tctggactgc 7560
    tcagggcgtg gccgcccgtg atgagacggc ttttcgccac gctttgactg tgggatacca 7620
15  gttaaaagcg gctggtgagc gcctaaaaga caccaagggt catcgagcct acgagcgtgc 7680
    ctacaccgtc gctcagggcg tcggaggagg ccgtgagcct gatctgccgc cggactgtga 7740
    ccgccagacg gattggccgc gacgtgtgcg cggctacgtc gctaaaggcc agccagtcgt 7800
    cctgctcgtg cagacagaga cgcagagcca gccgaggcga aaagctctgg ccactatggg 7860
    aagacgtggc ggtaaaaagc ccgcagaacg ctggaaaagc ccaaacagtg agtacgcccg 7920
20  agcacagcga gaaaaactag ctaagtccag tcaacgacaa gctaggaaag ctaaaggaaa 7980
    tcgcttgacc attgcaggtt ggttiatgac tgttgaggga gagactggct cgtggccgac 8040
    aatcaatgaa gctatgtctg aatttagcgt gtcaagtcag accgtgaata gagcacttaa 8100
    ggtctgcggg cattgaactt ccacgaggac gccgaaagct tcccagtaaa tgtgccatct 8160
    cgtaggcaga aaacggttcc cccgtagggg ctctctcttg gcctcctttc taggtcgggc 8220
25  tgattgctct tgaagctctc taggggggct cacaccatag gcagataacg tccccaccg 8280
    gctcgctcgc taagcgcaca aggactgctc ccaaagatct tcaaagccac tgccgcgact 8340
    gccttcgca gacttgccc cgcggaatt tctccaccg agttcgtgca caccctatg 8400
    ccaagcttct ttcaccctaa attcgagaga ttggattctt accgtggaaa ttcttcgcaa 8460
    aaatcgtccc ctgatcgccc ttgcgacgtt ggcgtcggtg ccgctggttg cgcttgctt 8520
30  gaccgacttg atcagcggcc gctcgattta aatc                                     8554

```

<210> 14

<211> 6583

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

<400> 14

```

45  gtaccacgcg tcatatgceg cttaaagttt ggctgccatg tgaattttta gcaccctcaa 60
    cagttgagtg ctggcactct cgggggtaga gtgccaaata ggttgtttga cacacagttg 120
    ttcaccgcg acgacggctg tgctggaaac ccacaaccgg cacacacaaa atttttctca 180
    tggagggatt catcatgcc aagtagcaca attccaatgc tgaccagtgg ggctttgaaa 240
    cccgctccat tcacgcagge cagtcagtag acgcacagac cagcgcacga aaccttccga 300
    tctaccaatc caccgcttcc gtgttcgact ccgctgagca cgccaagcag cgtttcgac 360
50  ttgaggatct aggcctggt tactcccgcc tcaaccaacc aaccgttgag gctttggaaa 420
    accgcatcgc ttccctcgaa ggtggcgtcc acgctgtagc gttctcctcc ggacaggccc 480
    caaccaccaa cgccattttg aacctggcag gagcgggcga ccacatcgtc acctccccac 540
    gcctctacgg tggcaccgag actctattcc ttatactct taaccgctg ggtatcgatg 600
    tttccttctg gaaaaacccc gacgacccct agtccctggca ggcagccgtt cagccaaaca 660
55  ccaaagcatt cttcggcgag actttcgcca acccagggc agacgtcctg gatattcctg 720
    cggtgctga agttgcgac cgcaacagcg ttccactgat catcgacaac accatcgcta 780
    ccgcagcgtc cgtgcgcccg ctcgagctcg gcgcagacgt tgtcgtcgtc tccctacca 840
    agttctacac cggcaacggc tccggactgg gcggcgtgct tatcgacggc ggaaagttcg 900
60  attggactgt cgaaaaggat ggaaagccag tattecccta cttcgtcact ccagatgctg 960
    cttaccacgg attgaagtac gcagaccttg gtgaccagc cttcggcctc aaggttcgcy 1020
    ttggccttct acgcgacacc ggtccacccc tctccgact caacgcattg gctgcagtc 1080
    agggcatcga cacccttccc ctgcgcttg agcggcacia cgaaaacgccc atcaaggttg 1140
    cagaattcct caacaaccac gagaaggttg aaaaggttaa cttcgcaggc ctgaaggtt 1200
65  ccccttggtg cgcaaccaag gaaaagcttg gcctgaagta caccggctcc gttctcact 1260
    tcgagatcaa gggcggcaag gatgaggctt gggcatttat cgacgccctg aagctacact 1320
    ccaaccttgc aaacatcggc gatgttcgct ccctcgttgt tcaccagca accaccacc 1380
    attcacagtc cgacgaagct ggccctggcac gcgcgggcgt taccagtc ccctccgcc 1440

```

ES 2 355 942 T3

5 tgtccggttg catcgagacc attgatgata tcatcgctga cctcgaaggc ggctttgctg 1500
 caatctagca ctagtccgga cctagggata tctgctgacat cgatgctctt ctgctgtaat 1560
 taacaattgg gatcctctag acccgggatt taatctgcta gcgggctgct aaaggaagcg 1620
 gaacacgtag aaagccagtc cgcgaaacg gtgctgacct cggatgaatg tcagctactg 1680
 ggctatctgg acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaa caggtagctt gcagtgggct 1740
 tacatggcga tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc 1800
 tggggcgccc tctggttaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc 1860
 gccaaggatc tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt 1920
 10 tgcgatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct 1980
 attcggctat gactgggcac ttgatccggc cggctgctct tacctgcca gatgcccgcg tgttccggct 2040
 gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggtg ccctgaatga 2100
 actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acggcggttc cttgcccagc 2160
 tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattggggc aagtgccggg 2220
 15 gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc 2280
 aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc taccctgcca ttcgaccacc aagcgaaca 2340
 tgcatacgag cgagcacgta ctcggatgga agccggctct gtcgatcagg atgatctgga 2400
 cgaagagcat caggggctcg cgcagccga actgttcgcc aggctcaagg cgcgatgcc 2460
 cgacggcgag gatctcgtcg tgacctatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga 2520
 20 aaatggcggc ttttctggat tcatcgactg tggcggctg ggtgtggcgg accgctatca 2580
 ggacatagcg ttggctacct ctgatattgc tgaagactt ggcggcgaat gggctgaccg 2640
 cttctctcgtg ctttacggta tcgcccctcc cgattcgcag cgcatacgcct tctatcgctt 2700
 tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcagcggc 2760
 aacctgccat cacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt gggttcgga 2820
 atcgttttcc gggacggcgg ctggatgac ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc 2880
 25 ttccccacg ctagcggcgc cccggccggc ccggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag 2940
 gagaaaatac cgcatacagg gctcttccgc ttctctcgtc actgactcgc tgcgctcgg 3000
 cgttccggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg taatacggg 3060
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 3120
 taaaagggc cgtttctggc cgttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaaa 3180
 30 aaatcgacgc tcaagtcaga gttggcgaaa cccgacagga ctataaagat accagcggtt 3240
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgcccgtta ccggatacct 3300
 gtccccttt ctccctcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggatctt 3360
 cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 3420
 cgaccgctg gccttatccg gtaactatcg ttttagtcc aaccggtaa gacacgactt 3480
 35 atgccactg gcagcagcca ttggtaacag cttagcaga gcgaggtatg tagcgggtg 3540
 tacagagtte ttgaagtggg gccctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 3600
 ctgctcctg ctgaagccag ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 3660
 acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 3720
 aaaagatct caagaagatc ctttgatctt ttctacggg tctgacgctc agtggaaagc 3780
 40 aaactcacgt taagggattt tggctcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 3840
 tttaaaggcc ggccgcccgc gcgcaaagtc ccgctcgtg aaaattttcg tgcccgtgga 3900
 ttttccgcca aaaactttaa cgaacgttcg ttataatggt gtcatacctt gatgtcgcgc 4020
 gtaactaaaat tggcccgaat atttaaaaac ggtgatcggg tttttccgag ctctcgatac 4080
 45 ctcgctcag gacggacgag ccagcatcac gagactgggc cagtgccgag agcgacctag aaactctcgt 4140
 ggccgatctt gaggagctgg ctgacgagct gcgtgctcgg ccagcggcag gaggacgcac 4200
 agtagtgag gatgcaatca gttgccccta ctgcccggc ctgattcctc cccggcctga 4260
 cccgcagga cggcggcga aatattgctc agatgcgtgt cgtgccgag ccagccgca 4320
 50 gcgcccac aaagccacg ccgagagct agggcggct aggtcgcaa tggcgtgga 4380
 agtgcgtccc ccgagcgaaa ttttggccat ggtcgtcaca gagctggaag cggcagcgag 4440
 aattatcgg atcgtggcgg tgcccgcagg catgacaaac atcgtaaatg ccgctttcg 4500
 55 tgtgccgtgg ccgcccagga cgtgtcagcg ccgcccacc acagagcgt aagctgcag aatacctgaa 4620
 aatgttgaa gcccccgta caggttaactc agaggcgtc ggctaaccct cagtccaaac 4680
 ctgggagaaa gcgctcaaaa atgactctag cggattcac agacattgac acaccggct 4740
 ggaaatttt cgctgatctg ttcgacacc atcccagct cgcgctgca tcacgtggct 4800
 60 ggacgagcga agaccggcgc gaattcctcg ctcaacctgg cagagaaaat ttccagggca 4860
 gcaagaccgg cgacttcgcc agcgccttga tcaaagacc ggacacggag aaacacagcc 4920
 gaaattatac cgagttggtt caaaatcgct tcccgggtg cagtatgtt ctctgacga 4980
 cgcgcagcac gcagccgtg ttgtcctgga cattgatgtg ccgagccacc agggcggcgg 5040
 gaaaatcgag cacgtaaac ccgaggtcta cgcgattttg gagcgtggg cacgcctgga 5100
 65 aaaagcgcca gcttggatcg gcgtgaatcc actgagcggg aaatgccagc tcatctggct 5160
 aacgaccgag gtaatgacc gagcaggcat gagcagccc aatatgcgcc tgetggctg 5220
 ccgtggccac tgcactctcc gcttttccg cgtgaccag gctttttcac ataggctgag 5280
 cgtggatcgc ctatggaggt tgctcgcag atctcaggca cagaaaaacc 5340

ES 2 355 942 T3

```

5   taaaaaacgc tatgagcagg agttttctag cggacgggca cgtatcgaag cggcaagaaa 5460
    agccactgcg gaagcaaaaag cacttgccac gcttgaagca agcctgccga gcgcccgtga 5520
    agcgtctgga gagctgatcg accggcgtccg tgtcctctgg actgctccag ggcgtgccgc 5580
    ccgtgatgag acggcttttc gccacgcttt gactgtggga taccagttaa aagcggctgg 5640
10  tgagcgccta aaagacacca agggtcacg agcctacgag cgtgcctaca ccgtcgctca 5700
    ggccgtcgga ggagcccggtg agcctgatct gccgccggac tgtgaccgcc agacggattg 5760
    gccgcgacgt gtgcgcggct acgtcgctaa aggccagcca gtcgtccctg ctcgctcagac 5820
    agagacgcag agccagccga ggcgaaaagc tctggccact atgggaagac gtggcggtaa 5880
    aaaggccgca gaacgctgga aagacccaaa cagtgagtac gcccgagcac agcgagaaaa 5940
15  actagctaag tccagtcaac gacaagctag gaaagctaaa ggaaatcgct tgaccattgc 6000
    aggttggttt atgactggtg agggagagac tggctcgtgg ccgacaatca atgaagctat 6060
    gtctgaattt agcgtgtcac gtcagaccgt gaatagagca ctttaaggtct gcgggcattg 6120
    aacttccacg aggacgccga aagcttccca gtaaatgtgc catctcgtag gcagaaaacg 6180
    gttcccccggt agggctctctc tcttggcctc ctttctaggt cgggctgatt gctcttgaag 6240
20  ctctctaggg gggctcacac cataggcaga taaogttccc caccggctcg cctcgtaagc 6300
    gcacaaggac tgctcccaaa gatcttcaaa gccactgccg cgactgcctt cgcgaagcct 6360
    tgccccgcgg aaatttccctc caccgagttc gtgcacaccc ctatgccaaag cttctttcac 6420
    cctaaattcg agagattgga ttcttaccgt ggaaattctt cgaaaaaatc gtccccctgat 6480
    cgcccttgcg acgttggcgt cgggtgccgt ggttgcgctt ggcttgaccg acttgatcag 6540
    cggccgctcg atttaaatct cgagaggcct gacgtcgggc ccg 6583

```

<210> 15

<211> 5091

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido sintético

<400> 15

```

35  tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcocggtag cacgcgtcat atgactagt 60
    cggacctagg gatatcgctg acatcgatgc tcttctgcgt taattaacaa ttgggatcct 120
    ctagaccceg gatttaaata gctagcgggc tgctaaagga agcggaaacac gtagaaagcc 180
    agtccgcaga aacgggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg 240
    gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgcagtg ggcttacatg gcgatagcta 300
    gactggcggg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc gccctctggt 360
40  aaggltgga agccctgcaa agtaaaactgg atggctttct tgccgccaag gatctgatgg 420
    cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggaatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa 480
    gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 540
    gcacaacaga caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg 600
    ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca 660
45  gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgc 720
    actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca 780
    tctcaccttg cctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcy cggtctgcat 840
    acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat gcagcgagca 900
    cgtactcgga tggaaagccg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 960
50  ctcgcgccag ccgaactggt cggcaggtc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc 1020
    gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttggcg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct 1080
    ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gccgaccgct atcaggacat agcgttggct 1140
    acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac 1200
    ggtatcgccg ctcccgatcc gcagcgcate gccttctatc gccttcttga cgagtcttc 1260
55  tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag 1320
    atttcgatcc caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg 1380
    ccggctggat gatcctccag cgcggggate tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg 1440
    gcgcgccggc cggcccgggtg tgaataaccg cacagatgcy taaggagaaa ataccgcatc 1500
    aggcctctct cgccttctc gctcaactgac tctctgctc cgttcgctc ggtagcggca 1560
60  gcggtatcag ctcaactcaaa ggcggtaata cggttateca cagaatcagg gtgataacgca 1620
    ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtg 1680
    ctggcgtttt tccataggct ccgccccctc gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt 1740
    cagagggtgc gaaacccgac aggaactataa agataaccag cgtttcccc cggaaagctcc 1800
    ctcgtcgctc ctctgttcc gacctgccc cttaccggat acctgtccc ctttctccct 1860
65  tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgtctaggt atctcagttc ggtgtaggtc 1920
    gttcgctcca agctgggctg tgtgcaagaa cccccgctc agcccagccg ctgcgctta 1980
    tccgtaact atcgtcttga gtccaaccgg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2040

```

ES 2 355 942 T3

	gccactggt	acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	2100
	tggtggccta	actacggcta	cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	2160
	ccagttacct	tccgaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaaaaaac	caccgctggt	2220
5	agcggtggtt	tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	atctcaagaa	2280
	gatcccttga	tcttttctac	gggtctgac	gctcagtgga	acgaaaactc	acgttaaggg	2340
	attttggtea	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaaa	ggccggccgc	2400
	ggccgcgcaa	agtcccgcct	cgtgaaaatt	ttcgtgccgc	gtgattttcc	gccaaaaact	2460
	ttaacgaacg	ttcgttataa	tggtgtcatg	accttcacga	cgaagtacta	aaattggccc	2520
10	gaatcatcag	ctatggatct	ctctgatgtc	gcgctggagt	ccgacgcgct	cgatgctgcc	2580
	gtcgatttaa	aaacggtgat	cgattttttc	cgagctctcg	atacgacgga	cgcgccagca	2640
	tcacgagact	gggccagtg	cgcgagcgac	ctagaaaactc	tcgtggcgga	tcttgaggga	2700
	ctggctgacg	agctgcgtgc	tccggccagc	ccaggaggac	gcacagtagt	ggaggatgca	2760
	atcagttgcg	cctactgctg	tgccctgatt	cctccccggc	ctgacccgcg	aggacggcgc	2820
15	gcaaaatatt	gctcagatgc	gtgtcgtgcc	gcagccagcc	gcgagcgcgc	caacaaacgc	2880
	cacgccgagg	agctggaggc	ggctaggctc	caaatggcgc	tggaagtgcg	tccccgagc	2940
	gaaattttgg	ccatggtcgt	cacagagctg	gaagcggcag	cgagaattat	cgcgatcgtg	3000
	gcggtgcccg	caggcatgac	aaacatcgta	aatgcgcgct	ttcgtgtgcc	gtggccgccc	3060
	aggacgtgtc	agcgccgcca	ccacctgcac	cgaatcggca	gcagcgtcgc	gcgtcgaaaa	3120
20	agcgcacagg	cggcaagaag	cgataagctg	cacgaatacc	tgaaaaatgt	tgaacgcccc	3180
	gtgagcggta	actcacaggg	cgctcgctaa	ccccagctcc	aaacctggga	gaaagcgtc	3240
	aaaaatgact	ctagcggatt	cacgagacat	tgacacaccg	gcctggaaat	tttccgctga	3300
	tctgttcgac	acccatcccc	agctcgcgct	gcatcacgt	ggctggacga	gcgaagaccg	3360
	cccggaattc	ctcgtcacc	tggcgagaga	aaatttccag	ggcagcaaga	cccgcgactt	3420
25	cgccagcgct	tgatcaaag	acccggacac	ggagaaacac	agccgaagtt	ataccgagtt	3480
	ggttcaaaat	cgcttgcccc	gtgccagtat	gttgccttga	cgcacgcgca	gcacgcagcc	3540
	gtgcttgtcc	tggacattga	tgtgccgagc	caccaggccg	gcgggaaaat	cgagcacgta	3600
	aaccccgagg	tctacgcgat	tttggagcgc	tgggcacgcc	tggaaaaagc	gccagcttgg	3660
	atcggcgtga	atccactgag	cgggaaatgc	cagctcatct	ggctcattga	tccgggtgat	3720
30	gccgcagcag	gcatgagcag	cccgaatatg	cgctctgtgg	ctgcaacgac	cgaggaatg	3780
	acccgcgctt	tcggcgtga	ccaggctttt	tcacataggc	tgagccgtgg	ccactgact	3840
	ctccgacgat	cccagccgta	ccgctggcat	gcccagcaca	atcgcgtgga	tgccttagct	3900
	gatcttatgg	aggttgctcg	catgatctca	ggcacagaaa	aacctaaaaa	acgctatgag	3960
	caggagtttt	ctagcggacg	ggcacgtatc	gaagccgcaa	gaaaagccac	tgcggaagca	4020
35	aaagcaactt	ccacgcttga	agcaagcctg	ccgagcgccg	ctgaagcgtc	tggagagctg	4080
	atcgcggcgc	tccgtgtcct	ctggactgct	ccagggcgct	ccgcccgtga	tgagacggct	4140
	tttgcgccac	ctttgactgt	gggataaccag	ttaaaaagcgg	ctggtgagcg	cctaaaagac	4200
	accaagggtc	atcgcgccta	cgagcgtgcc	tacaccgtcg	ctcaggcggg	cggaggagge	4260
	cgtgagcctg	atctgccgcc	ggactgtgac	cgccagacgg	attggcccg	acgtgtgcgc	4320
40	ggctacgtcg	ctaaaggcca	gccagtcgtc	cctgctcgtc	agacagagac	gcagagccag	4380
	ccgaggcgaa	aagctctggc	cactatggga	agacgtggcg	gtaaaaaggc	cgcagaacgc	4440
	tggaaagacc	caaacagtga	gtacgcccga	gcacagcgag	aaaaactagc	taagtccagt	4500
	caacgacaag	ctaggaaaagc	taaaggaaat	cgcttgacca	ttgcaggttg	gtttatgact	4560
	gltgagggag	agactggctc	gtggccgaca	atcaatgaag	ctatgtctga	athtagcgtg	4620
45	tcacgtcaga	ccgtgaatag	agcacttaag	gtctgcgggc	attgaacttc	cacgaggacg	4680
	ccgaaagctt	cccagtaaat	gtgccatctc	gtaggcagaa	aacggttccc	ccgtagggct	4740
	tctctcttgg	cctcctttct	aggtcgggct	gattgctctt	gaaqctctct	aggggggctc	4800
	acacataggg	cagataacgt	tccccaccgg	ctcgcctcgt	aagcgcacaa	ggactgctcc	4860
	caaagatctt	caaagccact	gccgcgactg	ccttcgcgaa	gccttgcccc	gcggaaattt	4920
50	cctccaccga	gttcgtgcac	accctatg	caagcttctt	tcaccctaaa	ttcgagagat	4980
	tggattctta	ccgtggaaat	tcttcgcaaa	aatcgtcccc	tgatcgcctt	tgcgacgttg	5040
	gcgtcgggtc	cgctggttgc	gcttggcttg	accgacttga	tcagcggccg	c	5091

55

60

65