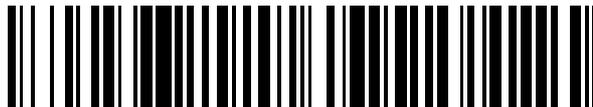


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 640**

51 Int. Cl.:

C12P 1/04 (2006.01)

C12P 17/10 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2008 E 08721014 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013 EP 2130907**

54 Título: **Cepa transformada derivada de una cepa deficiente en proteína de eflujo multifármaco y método de bioconversión utilizando la misma**

30 Prioridad:

01.03.2007 JP 2007050935

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

24.10.2013

73 Titular/es:

**MICROBIOPHARM JAPAN CO., LTD. (100.0%)
3-3-6, Nihonbashihoncho, Chuo-ku
Tokyo 103-0023, JP**

72 Inventor/es:

**FUJII, TADASHI;
OCHIAI, ATSUSHI;
ITO, MASASHI;
KABUMOTO, HIROKI;
FUJII, YOSHIKAZU y
MACHIDA, KAZUHIRO**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 426 640 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

- 5 Cepa transformada derivada de una cepa deficiente en proteína de eflujo multifármaco y método de bioconversión utilizando la misma
- Referencia cruzada a solicitudes relacionadas
- 10 [0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud de patente japonesa nº: 2007-50935 presentada el 1 de marzo de 2007.
- Campo técnico
- 15 [0002] La presente invención se refiere a cepas transformadas que son obtenibles por introducción de un gen originado a partir de organismos xerogénicos que codifican cualquier enzima seleccionada del grupo que consiste en oxidorreductasa y transferasa en el *E. coli* que es defectuoso en cualquier gen de los genes que codifican la proteína de eflujo multifármaco seleccionado del grupo que consiste en *tolC* y *acrAB*, y a un método para conversión microbiana de compuesto de sustrato utilizando las mismas.
- 20 Estado de la técnica
- [0003] En general, los medios de producción de compuestos incluyen la síntesis química y la síntesis enzimática. Para producir los compuestos que pueden ser materiales para una variedad de productos farmacéuticos, es esencial efectuar eficazmente modificaciones regioespecíficas y esteroespecíficas de los compuestos iniciales. Se sabe que la síntesis enzimática es superior en términos de estas reacciones.
- 25 [0004] Para utilizar una enzima como catalizador práctico a nivel industrial, no obstante, se tiene que tener en cuenta el margen fundamental de la enzima. Éste comprende una extensión de vida corta de la enzima y la necesidad de una coenzima para eventos catalíticos. Se ha puesto mucha atención hasta el momento en la forma de ampliar el periodo de vida de la enzima y retener la actividad enzimática en el diseño de procesos de fabricación con la enzima. Además, la mayoría de las enzimas utilizadas para la síntesis enzimática requieren coenzimas en los eventos catalíticos y, por ejemplo, las reacciones enzimáticas para la oxidación-reducción requieren un nucleótido de piridina, tal como NADH. Estas coenzimas son costosas en general y, por lo tanto, la adición de coenzima se ha convertido en una cuestión económicamente importante cuando se llevan a cabo reacciones enzimáticas a nivel industrial.
- 30 [0005] Como solución para superar el margen de estas reacciones enzimáticas, se ha desarrollado una estrategia utilizando células de un microorganismo, particularmente de *E. coli*, como campo para la reacción enzimática. Esto es, mediante la transformación de *E. coli* con un gen enzimático, la enzima objetivo se puede expresar abundantemente en la célula. Esto significa que la enzima se produce continuamente en la célula y la actividad enzimática se puede retener puesto que la célula está viva. Además, una variedad de reacciones intracelulares de metabolismo permiten que se generen las coenzimas necesarias para las reacciones enzimáticas.
- 35 [0006] Se ha intentado producir las sustancias químicas que pueden ser variedades de materiales farmacéuticos mediante "conversión microbiana", que comprende el cultivo de tal transformante de *E. coli* en un medio de cultivo y puesta en contacto del cultivo con un compuesto de sustrato para obtener el compuesto modificado. En particular, la reacción de oxidación por conversión microbiana de un compuesto hidrofóbico o anfipático usando *E. coli* que se ha transformado con un gen de citocromo P-450 es importante en la industria farmacéutica.
- 40 [0007] Una enzima de citocromo P-450 que se codifica con un gen de citocromo P-450 (de ahora en adelante también denominado simplemente enzima P-450) es el término genérico para un grupo del protohemo que contiene la proteína que está ligada al monóxido de carbono en su forma reducida para dar la banda de Soret en aproximadamente 450 nm. La enzima P-450 está ligada a los tejidos de la mayoría de los animales y plantas, al microsoma de mohos y levaduras y a la membrana interna mitocondrial de una parte de los tejidos animales y existe en algunos tipos de bacterias y mohos en su forma soluble.
- 45 [0008] Las enzimas P-450 tienen diferentes especificidades de sustrato. Hay enzimas que muestran una especificidad de sustrato extraordinariamente amplia que pueden utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como sustrato, mientras que algunas enzimas tienen una especificidad de sustrato más bien estrecha que reaccionan sólo con tipos comparativamente limitados de compuestos orgánicos. También algunas muestran una excelente selectividad en estéreo-especificidad o regio-especificidad para el sitio de reacción. Además, se sabe que las enzimas P-450 están implicadas, como funciones específicas, en una amplia variedad de reacciones, tales como la epoxidación, desalquilación, desnitrogenación e hidroxilación de xenobióticos en las células que exhiben las enzimas P-450 por catalización de la mono-oxigenación.
- 50 [0009] En particular, una parte de las enzimas P-450 originadas a partir de microorganismos se ha utilizado prácticamente para la producción industrial de compuestos útiles. Uno de los ejemplos típicos es la enzima P-450 de
- 55
- 60
- 65

Streptomyces carbophilus, que hidroxila la posición 6 β de la compactina, un sustrato, para producir pravastatina como un producto que es un agente terapéutico para la hiperlipidemia (véase el punto Literatura distinta de la de patentes 1). Además, el método para producir vitamina activa D₃ por hidroxilación de la posición 1 α y la posición 25 de la vitamina D₃ utilizando la enzima P-450 de la cepa ATCC33795 de *Pseudonocardia autotrophica* se ha puesto en uso práctico. Estas enzimas P-450 originadas a partir del microorganismo pueden catalizar la mono-oxigenación sólo por conjugación con el sistema de transporte de electrones (ferredoxina y ferredoxina reductasa) que dona electrones a las enzimas.

[0010] Tal conversión microbiana de compuestos que utilizan la enzima P-450 de citocromo originada a partir de microorganismos se ha realizado usando una solución de cultivo o cuerpo bacteriano del microorganismo que expresaba la enzima. Se ha utilizado también otra solución de cultivo que se da por introducción de un gen que codifica la enzima P-450 originada a partir de microorganismos en el *Streptomyces lividans* adecuado como huésped, y se hizo que expresara su actividad enzimática. No obstante, la conversión microbiana de un compuesto de sustrato por un actinomiceto que tiene tal gen requiere un tiempo considerable para cultivar y convertir el compuesto de sustrato en el producto objetivo debido a la naturaleza única de los actinomicetos. Además, dependiendo de la enzima, es preciso investigar las condiciones inductoras de expresión para aumentar eficazmente el nivel de expresión de la enzima. Por otra parte, algunos actinomicetos usados para la conversión tienen un sistema de reacción que metaboliza o degrada el compuesto de sustrato o el producto objetivo, y esto contribuye a la generación de subproductos y la reducción en el compuesto de sustrato y el producto objetivo para bajar la productividad del producto objetivo.

[0011] Por estas razones, se ha querido establecer un sistema que pueda expresar funcionalmente el gen de citocromo P-450 originado a partir de microorganismos y que utilice como huésped un *E. coli* que requiere un periodo de tiempo relativamente corto para el cultivo y también se considera que tiene menos sistemas de reacción para metabolizar o degradar el compuesto de sustancia y el producto objetivo. Como tal sistema, se ha propuesto un sistema que coexpresa el gen *camAB* que codifica el sistema de transporte de electrones de P450cam y hace que se exprese funcionalmente el gen de citocromo P-450 de una amplia variedad de actinomicetos (véase Documento de patente 1). No obstante, la actividad de conversión microbiana por este sistema fue bastante baja e inadecuada para su utilización en la producción industrial. Por lo tanto, con el fin de llevar a cabo realmente la producción industrial por conversión microbiana utilizando *E. coli* que exprese el gen que codifica la enzima P-450 de citocromo originada a partir de microorganismos, se ha requerido una mayor mejora de la actividad.

[0012] Como la técnica para ello, se ha examinado el método para introducir activamente la sustancia en la célula. Por ejemplo, el *E. coli* que se hizo que expresara el gen *lat* que codifica la L-lisina 6-aminotransferasa originada a partir de la cepa IF03084 de *Flavobacterium lutescens* es capaz de convertir L-lisina en ácido L-pipecólico (véase Literatura distinta de la de patentes 2), y se sabe que, en la conversión microbiana que utiliza el transformante, la actividad de conversión microbiana se mejora por amplificación del gen *lysP* que codifica la permeasa específica de L-lisina para introducir activamente el sustrato L-lisina en la célula (véase Literatura distinta de la de patentes 3).

[0013] Así, en la conversión microbiana, se ha sugerido que el transporte de membrana de moléculas de sustrato en las células es el tema importante, pero no existe ningún mecanismo en *E. coli* que realice activamente el transporte de membrana en las células los compuestos anfipáticos o hidrofóbicos que se usan frecuentemente como compuestos de sustrato en la conversión microbiana para la fabricación de medicamentos. Además, se ha informado de que la abundancia intracelular del compuesto dado (hormona esteroide de mamíferos) aumenta en la cepa de *E. coli* sometida a interrupción de la proteína de eflujo de medicamento (véase Literatura distinta de la de patentes 4). Esto sugiere el aumento de la abundancia intracelular basándose en que el compuesto que penetra pasivamente en la célula se hace difícil de eliminar del cuerpo.

[0014] Por otro lado, se ha publicado una solicitud de patente de la que el *quid* es que el *E. coli* sometido a transformación con al menos un gen de los genes *acrA*, *acrB* o *tolC* que codifican la proteína de eflujo de medicamento está provisto de resistencia a los solventes orgánicos, y la conversión microbiana en el sistema de doble capa usando este *E. coli* se puede realizar con alta eficiencia (Literatura de patentes 2). Estas cuestiones hacen difícil presumir el efecto de la interrupción de la proteína resistente al multifármaco del microorganismo huésped en la conversión microbiana. Usando mutantes de *tolC* de *E. coli* de cepas que llevan el transposón Tn10, de Cristóbal *et al.* demostraron que la proteína de membrana externa *TolC* es necesaria para resistencia de alto nivel a la tetraciclina conferida por las bombas Tet(A) codificadas por Tn10 y plásmido (Literatura distinta de la de patentes 7).

La WO 03/018817 A1 describe un sistema de expresión de proteína de membrana de levadura y su aplicación en la selección de medicamentos, basado en vectores que contienen la secuencia codificante de una proteína de membrana objetivo, en particular implicada en el eflujo de multifármaco (Literatura de patentes 3).

Brown *et al.* describen la caracterización de las bombas de flujo multifármaco codificadas por *acrA* y *dinF*, su regulación, y su función en la virulencia de la marchitez bacteriana (Literatura distinta de la de patentes 8).

Fujii *et al.* informan sobre métodos para biotransformaciones eficaces de compuestos hidrofóbicos y anfifílicos para producir sus productos oxidados regio-específicos utilizando cepas de *E. coli* con mutaciones *tolC* *acrAB* que expresan los genes P-450 (Literatura distinta de la de patentes 9).

- Srikumar *et al.* informan de que los componentes de sistema de flujo individual se expresaron en *E. coli*, donde aportaron resistencia a los tintes, detergentes y antibióticos, incluyendo β -lactamos (Literatura distinta de la de patentes 10).
- 5 Nakamura *et al.* han desarrollado un ensayo sobre una bomba de medicamento de vesícula secretora de levadura para investigar los mecanismos de translocación de medicamentos para transportadores específicos heterológamente expresados en *S. cerevisiae* (Literatura distinta de la de patentes 11).
- 10 Niimi describe un sistema de expresión para clonar y expresar genes que codifican bombas de flujo de medicamentos a partir de diferentes hongos patógenos que se basa en el uso de recombinación homóloga para integrar de forma estable constructos de copia única en el genoma huésped bajo el control de un regulador transcripcional altamente activo (Literatura distinta de la de patentes 12).
- 15 Arisawa *et al.* describen sistemas de biotransformación en el nivel de la célula entera de *E. coli*, en los que los genes para el actinomiceto P-450 y las proteínas de transporte de electrones se coexpresaron (Literatura distinta de la de patentes 13).
- 20 Sawada *et al.* han expresado CYP105A1 en *E. coli* y han comparado sus propiedades enzimáticas hacia la vitamina D₂ y la vitamina D₃ con las de CYP105A1 mitocondrial humana (Literatura distinta de la de patentes 14).
- Uchida *et al.* describen una expresión mejorada de CYP27B1 en *E. coli* que podría inducirse por coexpresión de chaperoninas moleculares GroEL/ES (Literatura distinta de la de patentes 15).
- 25 Wada *et al.* informan de que el citocromo bovino P450sc se puede expresar en *E. coli* en una forma catalíticamente activa y que las propiedades estructurales de la proteína recombinante se pueden evaluar por espectros de CO-diferencia o por espectros de unión al sustrato (Literatura distinta de la de patentes 16).
- 30 Sugano *et al.* investigaron la producción catalizada por el citocromo P-450sc de la progesterona a partir de la colestenoa y mediante la aplicación de diferentes concentraciones de un detergente, descubriendo que la colestenoa es metabolizada por dos rutas (Literatura distinta de la de patentes 17).
- [0015]
- 35 [Literatura de patentes 1] Folleto de publicación internacional nº: 2003/087381, su familia en inglés US 2006234337 A1.
- [Literatura de patentes 2] Descripción accesible al público de solicitud de patente japonesa Kokai, número Heisei 11-221080 (221080/1999A1)
- 40 [Literatura de patentes 3] Descripción accesible al público de solicitud de patente PCT WO 03/018817 A1.
- [Literatura distinta de la de patentes]
- [0016]
- 45 [Literatura distinta de la de patentes 1] Cloning, characterization and expression of the gene encoding cytochrome P-450sca-2 from *Streptomyces carbophilus* involved in production of pravastatin, a specific HMG-CoA reductase inhibitor. *Gene*. 1995 Sep 22;163(1):81-85.
- 50 [Literatura distinta de la de patentes 2] Microbial conversion of L-lysine to L-pipecolic acid catalyzed by L-lysine 6-aminotransferase and pyrroline-5-carboxylate reductase. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002 Mar;66(3):622-627.
- [Literatura distinta de la de patentes 3] Increase in the rate of L-pipecolic acid production using lat-expressing *Escherichia coli* by *lysP* and *yeiE* amplification. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002 Sep;66(9):1981-1984.
- 55 [Literatura distinta de la de patentes 4] Mammalian steroid hormones are substrates for the major RND- and MFS-type tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2006 Feb;188(3):1191-1195.
- 60 [Literatura distinta de la de patentes 5] Entry into and release of solvents by *Escherichia coli* in an organic-aqueous two-liquid- phase system and substrate specificity of the *AcrAB-TolC* solvent-extruding pump. *J Bacteriol*. 2000 Sep;182(17):4803-10.
- 65 [Literatura distinta de la de patentes 6] Production of alpha, omega-alkanediols using *Escherichia coli* expressing a cytochrome P450 from *Acinetobacter* sp. OC4. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006 Jun;70(6):1379-1385.

[Literatura distinta de la de patentes 7] R.E. de Cristóbal et al.: Multidrug resistance pump *AcrAB*-*TolC* is required for high-level, Tet(A)-mediated tetracycline resistance in *E. coli*. *J of Antimicrobial chemotherapy* 2006 May; 58(1): 31-36.

5

[Literatura distinta de la de patentes 8] D.G. Brown et al.: Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Applied and Environmental Microbiol.* 2007 May; 73(9): 2777-2786.

10

[Literatura distinta de la de patentes 9] T. Fujii et al.: Efficient Biotransformations using *E. coli* with *tolC* *acrAB* Mutations Expressing Cytochrome P450 Genes. *Bioscience Biotech. and Biochem.* 2009 April; 73(4): 805-810.

15

[Literatura distinta de la de patentes 10] R. Srikumar et al.: Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Efflux Pumps *MexA*- *MexB*-*OprM* and *MexC*-*MexD*-*OprJ* in a Multidrug-Sensitive *E. coli* Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998 Jan; 42(1): 65-71.

20

[Literatura distinta de la de patentes 11] K. Nakamura et al.: Functional expression of *Candida albicans* Drug Efflux Pump *Cdr1p* in a *Saccharomyces cerevisiae* Strain Deficient in Membrane Transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001 Dec; 45(12): 3366-3374.

25

[Literatura distinta de la de patentes 12] M. Niimi: Analysis of function and expression of drug resistance genes in baker's yeasts. *Jpn. J. Med. Mycol.* 2004; 45: 63-69.

30

[Literatura distinta de la de patentes 13] A. Arisawa et al.: Construction of biotransformation system by *E. coli* strains coexpressing genes for actinomycetes cytochrome P-450 monooxygenase and redox partner proteins. *Bioresource Laboratories, Mercian Corporation.*

35

[Literatura distinta de la de patentes 14] N. Sawada et al.: Conversion of vitamin D3 to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2004 June; 320: 156-164.

40

[Literatura distinta de la de patentes 15] E. Uchida et al.: Purification and characterization of mouse CYP27B1 overproduced by an *E. coli* system coexpressing molecular chaperonins GroEL/ES. *Biochem. and Biophys. Research Communication* 2004 Sept; 323: 505-511.

45

[Literatura distinta de la de patentes 16] A. Wada et al.: Expression of Functional Bovine Cholesterol Side Chain Cleavage Cytochrome P450 (P450scc) in *E. coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1991 Nov; 290(2): 376-390, 1991.

50

[Literatura distinta de la de patentes 17] S. Sugano et al.: Cytochrome P-450scc-catalyzed production of progesterone from cholestenone. 1995 Jan; 35(1): 31-36.

55

[0017] El objetivo de la presente invención es proporcionar unos medios para mejorar la baja eficiencia de conversión mostrada en la presente conversión microbiana que utiliza el transformante insertado con un gen originado a partir de organismos xerogénicos. Este objeto se resuelve por el objeto de la reivindicación 1.

Descripción de la invención

60

[0018] Para conseguir el objeto anterior, los presentes inventores prepararon un transformante que se puede obtener por inserción de un gen originado a partir de un organismo xerogénico que codifica cualquier enzima seleccionada del grupo que consiste en oxidorreductasa y transferasa en *E. coli* que es defectuoso en cualquier gen de los genes que codifican la proteína de eflujo multifármaco seleccionada del grupo que consiste en *tolC* y *acrAB*. Además, descubrieron que este transformante convierte el compuesto de sustrato hidrofóbico o anfipático en su compuesto objetivo en alta eficiencia para lograr la presente invención.

65

[0019] Así, la presente invención se refiere a los siguientes puntos de [1] a [6].

60

[1] Un transformante que se puede obtener por introducción de un gen originado a partir de un organismo xerogénico que codifica cualquier enzima seleccionada del grupo que consiste en oxidorreductasa y transferasa en el *E. coli* que es defectuoso en cualquier gen de los genes que codifican la proteína de eflujo multifármaco seleccionado del grupo que consiste en *tolC* y *acrAB*.

65

[2] El transformante según el punto [1], donde el gen originado a partir de un organismo xerogénico es un gen que codifica la enzima de citocromo P-450 o aminotransferasa.

[3] El transformante según el punto [1], donde el gen originado a partir de un organismo xerogénico es el gen que codifica la enzima de citocromo P-450.

[4] Un método de conversión microbiana que utiliza el transformante según cualquiera de los puntos [1] a [3].

[5] Un método de conversión microbiana según el punto [4], caracterizado por el hecho de que se realiza monooxigenación en un compuesto de sustrato.

[6] El método según el punto [5], donde el compuesto de sustrato se selecciona del grupo que consiste en vitamina D₃, 4-colesten-3-ona y compactina.

[0020] A continuación se explicará la definición de los términos, símbolos y demás descritos en este documento y se ilustrará en detalle la presente invención.

[0021] El término "proteína de eflujo multifármaco", usado en este caso, incluye todas las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en *toIC* y *acrAB* existentes en *E. coli* y que constituyen principalmente el mecanismo de resistencia al medicamento que elimina los compuestos hidrofóbicos y anfipáticos desde el interior de los cuerpos bacterianos hacia el exterior.

[0022] El término "un gen originado a partir de un microorganismo xerogénico" utilizado en este caso incluye todos los genes que se pueden aislar o amplificar a partir de un organismo vivo diferente del microorganismo que se va a usar como huésped y que codifican cualquier enzima seleccionada del grupo que consiste en oxidoreductasa y transferasa. Comprende los genes aislados o amplificados de ADN cromosómico y ADN plásmido de un organismo vivo, los amplificados de ARNm y demás sin limitación.

[0023] El término "un transformante" utilizado en este caso se refiere a un microorganismo que se da por inserción en un microorganismo específico de un gen originado a partir de otro organismo vivo en una forma expresable mediante tecnologías de recombinación genética, y la técnica para transferencia de genes usada para éstos incluye no sólo la recombinación génica utilizando un vector tal como un plásmido, sino también la recombinación homóloga plásmida y demás.

[0024] El término "conversión microbiana" utilizado en este caso se refiere a un método de cultivo de un transformante en un medio, poner el cultivo en contacto con un compuesto de sustrato, modificar el compuesto para convertirlo en el compuesto objetivo y obtener ésta.

[0025] El término "un compuesto de sustrato" en la presente invención se refiere a un compuesto hidrofóbico o anfipático que se pueden modificar por varios tipos de reacciones de conversión microbiana. Por ejemplo, cuando el gen originado a partir de un organismo xerogénico es un gen P450, éste incluye compuestos alcanos tales como hexano, heptano, octano y nonano, compuestos aromáticos tales como tolueno, fenol y cumeno, esteroides tales como colesterol, testosterona, 4-colesten-3-ona, deshidropiandrosterona, vitamina D₂ y vitamina D₃, péptidos lineales tales como leucil-leucina, leucilvalina, polileucina y polivalina, diquetopiperazinas que se dan por ciclocondensación de un dipéptido tales como prolilfenilalanina y leucilalanina, péptidos cíclicos con actividad fisiológica tales como ciclosporina y equinomicina, monoterpenos tales como pineno, camfeno, limoneno y geraniol, sesquiterpenos tales como ambrosano, cariofilano y drimano, diterpenos tales como ácidos abióticos y ácidos giberélicos, triterpenos tales como dammarano, hopano y lanostano, estatinas tales como compactina, macrólidos tales como tilosina, FK-506 y eritromicina, y también varios tipos de fármacos, o sus precursores, metabolitos, derivados, etcétera.

[0026] El término "análogo del gen" utilizado en este caso se refiere a un polinucleótido que tiene sustancialmente las mismas funciones que el gen original, y

1. (1) que hibridiza con el gen original bajo condiciones rigurosas,
2. (2) que tiene una secuencia de nucleótidos con 70% o más de homología con la del gen original,
3. (3) que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria de la del gen original, o
4. (4) que no hibridiza con el gen original bajo condiciones rigurosas debido a la degeneración de códigos genéticos, pero que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia que la secuencia de aminoácidos codificada por el polinucleótido definido en cualquiera de los puntos (1) a (3).

[0027] Además, el término "un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones rigurosas" se refiere, por ejemplo, a un polinucleótido obtenido usando la técnica de hibridación de colonia, la técnica de hibridación de placa o el método de hibridación Southern, etcétera, en los que el gen original se usa como sonda y, en particular, incluye un polinucleótido que se puede identificar llevando a cabo la hibridación con el filtro que está fijado a un polinucleótido originado a partir de una colonia o placa en presencia de 0,7 a 1,0 M de cloruro sódico a 65°C, y luego limpiando el filtro con solución

SSC en 0,1 a 2 veces la concentración (la composición de la solución SSC en 1 vez la concentración está compuesta por 150 mM de cloruro sódico y 15 mM de citrato sódico) bajo la condición de 65°C.

[0028] Según la presente invención, un transformante que se puede obtener por introducción de un gen originado a partir de un organismo xerogénico que codifica cualquier enzima seleccionada del grupo que consiste en oxidorreductasa y transferasa en el *E. coli* que es defectuoso en cualquier gen de los genes que codifican la proteína de eflujo multifármaco seleccionado del grupo que consiste en *tolC* y *acrAB* se puede preparar, y, usando el transformante, varios tipos de compuestos de sustrato se pueden convertir eficazmente en los compuestos objetivo.

[Mejor modo de realización de la invención]

[0029] A continuación se describirán en detalle formas de realización de la presente invención.

Huésped defectuoso en el gen que codifica la proteína de eflujo multifármaco

[0030] En la presente invención, primero, se prepara un huésped defectuoso en las funciones de la proteína de eflujo multifármaco que son aquellas que el microorganismo que se va a utilizar como huésped posee originalmente. En este huésped, falta una parte o todo el gen que codifica la proteína de eflujo multifármaco, o el gen está segmentado por estar insertado en su interior con otro ADN, o el gen tiene al menos una mutación, de modo que una parte o todas las funciones de la proteína de eflujo multifármaco codificada por el gen se pierden (o a veces se dice que "se interrumpen"). Tal microorganismo con funciones genéticas interrumpidas se puede obtener por el uso de la conocida técnica de transducción P1 o la técnica de recombinación de ADN homóloga. El microorganismo huésped se puede cultivar y usar para amplificación del gen insertado con un vector tal como el plásmido o el ADN del fago, e incluye microorganismos de *E. coli*.

[0031] El gen que codifica la proteína de eflujo multifármaco incluye como uno originado a partir de *E. Coli*, *tolC*, que es el gen que codifica TolC, que es una proteína de eflujo multifármaco originada a partir de la cepa K-12 de *E. coli* y está representada por la secuencia de nucleótidos continua que empieza con el nucleótido nº 1 hasta el nucleótido nº 1488 en la SEC ID nº: 22. Además, se describe *acrA*, que es el gen que codifica AcrA, que es una proteína de eflujo multifármaco originada a partir de la cepa K-12 de *E. coli* y está representada por la secuencia de nucleótidos continua que empieza a partir del nucleótido nº 329 hasta el nucleótido nº 1522 en la SEC ID nº: 23. Además, se describe *acrB*, que es un gen que codifica AcrB, que es una proteína de eflujo multifármaco originada a partir de la cepa K-12 de *E. coli* y representada por la secuencia de nucleótidos continua que empieza a partir del nucleótido nº 1545 hasta el nucleótido nº 4694 en la SEC ID nº: 23, o sus análogos.

[0032] Los microorganismos huéspedes obtenidos de este modo son defectuosos en parte o todas las funciones de la proteína de eflujo multifármaco, de modo que el compuesto de sustrato se considera que permanece fácilmente en el microorganismo en la conversión microbiana y, como resultado, la eficiencia de conversión y también la eficiencia de producción del producto objetivo se hace mayor.

Preparación del transformante

[0033] El gen originado a partir de un microorganismo xerogénico o su análogo (de ahora en adelante simplemente denominados "genes xerogénicos") se incorpora luego en el huésped resultante para preparar un transformante adecuado para la conversión microbiana. El método para incorporar los genes xerogénicos en el huésped no está particularmente limitado y, por ejemplo, los genes xerogénicos se pueden insertar en un vector apropiado para ser incorporados en el huésped por el método de protoplasto o método de electroporación. La especie del vector que se puede usar no está particularmente limitada y se pueden utilizar, por ejemplo, vectores de replicación autónoma (p. ej., plásmido, etc.) o también se pueden utilizar vectores que se han incorporado al genoma de la célula huésped al introducirse en el huésped y se han replicado junto con el cromosoma incorporado, pero se prefieren los vectores de expresión. En los vectores de expresión, los genes xerogénicos y demás están funcionalmente conectados con elementos que son esenciales para la transcripción (p. ej., promotor, etc.). El promotor es una secuencia de ADN que muestra actividad de transcripción en la célula huésped y se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de los tipos del huésped.

Gen originado a partir del organismo xerogénico

[0034] Los genes xerogénicos y demás incorporados en el huésped incluyen oxidorreductasa y transferasa. La oxidorreductasa no está particularmente limitada siempre que sea una enzima para catalizar la reacción de redox, e incluye la enzima de citocromo P-450, aldehído reductasa, etcétera. La más preferida incluye la enzima de citocromo P-450, especialmente la categorizada en la familia CYP105 y la familia CYP107. La transferasa no está particularmente limitada siempre que sea una enzima para transferir un grupo de átomo (tal como un grupo funcional) desde una molécula a otra, e incluye aminotransferasa (catalizando la reacción para dar el grupo α -amino del compuesto de sustrato para el ácido 2-oxoglutarico y hacer que el compuesto de sustrato en sí sea 2-oxo ácido).

[0035] La hidrolasa se describe como una enzima para catalizar hidrólisis, e incluye lipasa, amilasa, etcétera. La liasa se describe como una enzima para catalizar la disociación de enlaces entre grupos de átomo, e incluye hidratasa carbónica, etcétera. La isomerasa se describe como una enzima para catalizar una reacción para isomerizar específicamente a sustrato un isómero, e incluye glucosa isomerasa, etcétera. La sintetasa se describe como una enzima para combinar dos moléculas utilizando energía de hidrólisis de ATP, e incluye ADN ligasa, etcétera.

Cultivo del transformante

[0036] El transformante preparado de este modo se cultiva en un medio nutritivo apropiado bajo las condiciones para permitir la expresión del gen insertado, si es necesario, por adición de un inductor, etcétera. Tal medio nutritivo consiste en fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y nutrientes orgánicos naturales apropiados y demás, y como fuentes de carbono se pueden usar uno o más tipos de glucosa, fructosa, glicerol, sorbitol, ácidos orgánicos, etcétera, y como fuentes de nitrógeno se pueden usar uno o más tipos de compuestos tales como amoníaco, urea, sulfato de amonio, nitrato de amonio y acetato de amonio. Como sal inorgánica se pueden usar sales tales como fosfato potásico, fosfato de dipotasio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso y sulfato ferroso. Por otra parte, como nutrientes orgánicos naturales que tienen un efecto de promoción del crecimiento en la bacteria que se va a usar se puede utilizar peptona, extracto de carne, extracto de levadura, licor de maíz, ácido casamino, etcétera, y una pequeña cantidad de vitaminas y ácidos nucleicos puede estar contenida.

Conversión microbiana utilizando el transformante

[0037] Luego, el cuerpo bacteriano que expresa estos genes se pone en contacto con el compuesto de sustrato para realizar la reacción de conversión. La temperatura en la reacción de conversión se puede determinar apropiadamente en vista de la temperatura óptima del transformante. El tiempo de reacción también se puede determinar apropiadamente en vista de la conversión en el compuesto objetivo (el grado de progreso de la reacción), etcétera. Cuando el huésped es *E. coli*, la reacción se lleva a cabo preferiblemente a 20-37°C durante 1-5 días. Por otra parte, el modo de reacción puede ser de tipo lote o de tipo continuo o se puede llevar a cabo la reacción de cualquier forma.

[0038] Para el aislamiento y la purificación del producto objetivo generado, se pueden utilizar los métodos de aislamiento y de purificación usados generalmente para el aislamiento del metabolito microbiano de su solución de cultivo. Por ejemplo, incluyen cualquier método conocido tal como la extracción de solvente orgánico utilizando metanol, etanol, acetona, butanol, acetato de etilo, acetato de butilo, cloroformo, tolueno, etcétera, tratamiento de adsorción-desorción usando resina de adsorción hidrofóbica tal como Diaion HP-20, cromatografía de filtración en gel usando Sefadex LH-20, etcétera, cromatografía de adsorción con carbono activo, gel de sílice, etcétera, o tratamiento de adsorción-desorción por cromatografía en capa fina, o cromatografía en fase líquida de alta eficacia utilizando una columna de fase inversa y otros. No obstante, los métodos no están particularmente limitados a los mencionados en la presente. Mediante el uso de estos métodos de forma individual o en combinación en cualquier orden o repetidamente, el compuesto objetivo se puede aislar y purificar.

Ejemplos

[0039] A continuación se explicará la presente invención con más detalle con ejemplos específicos, pero no se pretende limitar la presente invención a estos ejemplos. El porcentaje (%) en los siguientes ejemplos indica el porcentaje en peso en la explicación de los medios de cultivo y el porcentaje en volumen en la de la fase móvil de HPLC.

Ejemplo 1: construcción de la cepa interrumpida *tolC* de *E. coli*

[0040] De la cepa CAG12184 (*tolC::Tn 10*) de *E. coli* obtenida del *E. coli* Genetic Stock Centre (Universidad de Yale), mediante el método de transducción P1, se transfirió *tolC::Tn 10* a la cepa BL21-star (DE3). En pocas palabras, la cepa CAG12184 de *E. coli* se cultivó en el medio L (1% de polipeptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,5% de cloruro sódico, pH 7,2) que contenía 2,5mM de cloruro de calcio y se añadió 0,2 mL de la solución de cultivo con el fago P1 y se cultivó a 37°C durante 10 minutos. Esta solución de reacción se añadió al agar blando (1% de polipeptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,5% de cloruro sódico, 0,3% de agar, 2,5mM de cloruro de calcio, pH 7,2) precalentado a 45°C y se sembró en el medio de agar L (1% de polipeptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,5% de cloruro sódico, 1,8% de agar, pH 7,2) que contenía 2,5mM de cloruro de calcio. El medio resultante se cultivó a 37°C durante 18 horas y luego se agregó 3 mL del medio L, el agar blando se trituró y el sobrenadante se recogió para dar la solución *tolC*-fago. Luego, se cultivó la cepa BL21-star (DE3) de *E. coli* (Invitrogen Co.) en el medio L que contenía 2,5mM de cloruro de calcio, se agregó 0,1 ml de la solución de cultivo a la solución *tolC*-fago y se cultivó a 37°C durante 10 minutos. Luego, se recogió el cuerpo bacteriano por centrifugado, se agregó 1 ml del medio L, se cultivó a 37°C durante 10 minutos y se sembró en el medio L que contenía 10 µg/mL de tetraciclina. Después de cultivo a 37°C durante 18 horas, las colonias emergidas se dieron como la cepa B1star*TolC*. La cepa B1star*TolC* es una cepa interrumpida de *tolC* con deficiencia de la función *TolC*.

Ejemplo 2: construcción de la cepa interrumpida *acrAB* de *E. coli*

[0041] De la misma manera, de la cepa JA300A de *E. coli* estando JA300A (*acrAB::cat*) de *E. coli* descrita en Literatura distinta de la de patentes 5, *acrAB::cat* se transfirió a la cepa BL21-star (DE3) por el método de transducción P1 y se

llevó a cabo selección con el medio de agar L que contenía 5 µg/mL de cloranfenicol para dar la cepa BLstarAcrAB. También, *acrAB::cat* se transfirió a la cepa BLstarToIC para dar la cepa BLstarToICAcraB. La cepa BLstarAcrAB es la cepa interrumpida *anacrAB* con deficiencia de la función *AcrA* y la función *AcrB*. La cepa BLstarToICAcraB es una cepa interrumpida ToIC, *acrAB* adicionalmente con la deficiencia de la función ToIC.

5

Ejemplo 3: construcción de varios plásmidos

(1) Vector pETAcIBC-SD

10 [0042] A partir de aquí todas las reacciones de PCR se efectuaron con ADN polimerasa KOD#PLUS (Toyobo Co., Ltd.). El plásmido pDolABC (véase Literatura distinta de la de patentes 6) se trató con las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI* para dar un fragmento de ADN que contenía el gen *aciB* (véase nucleótido nº 1 a 321 en la SEC ID nº: 3) que codifica ferredoxina originada a partir de la cepa OC4 de la especie *Acinetobacter*. Este fragmento se unió a los sitios *NcoI* y *BamHI* de un vector plásmido de *E. coli*, pETduet-1 (Novagen), por ADN ligasa T4 para dar el Plásmido A. Por otra parte, se llevó a cabo la PCR usando el Cebador A (véase SEC ID nº: 6) y el Cebador B (véase SEC ID nº: 7) y pDolABC como modelo para amplificar el fragmento de ADN que contenía el gen *aciC* (véase nucleótido nº 1978 a 3192 de la SEC ID nº: 3) que codifica ferredoxina reductasa originada a partir de la cepa OC4 de la especie *Acinetobacter* y el tratamiento se realizó con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*. Este fragmento se unió a los sitios *BamHI* y *HindIII* del Plásmido A por ADN ligasa T4 para dar el Plásmido B. Luego, para eliminar el posterior de los dos promotores T7 del Plásmido B, se trató el Plásmido B con las enzimas de restricción *EcoRV* y *NotI*, suavizadas usando el kit BKL (Takara Shuzo Co., Ltd.) y luego unidas por ADN ligasa T4 para dar el Plásmido C. Por otro lado, se llevó a cabo la PCR usando el Cebador C (véase SEC ID nº: 8) y el Cebador D (véase SEC ID nº: 9), y el ADN genómico de la cepa ATCC33795 de *Pseudonocardia autotrophica* como modelo para amplificar el fragmento de ADN para ser la secuencia de ADN espaciadora, y el tratamiento se realizó con las enzimas de restricción *BglII* y *BamHI*. Este fragmento se unió a los sitios *BglII* y *BamHI* del Plásmido C por ADN ligasa T4 para dar el vector pETAcIBC-SD.

25

(2) Plásmido pETAcIBC-50AABP195

30 [0043] Se llevó a cabo la PCR usando el Cebador E (véase SEC ID nº: 10) y el Cebador F (véase SEC ID nº: 11) y el ADN genómico de la cepa OC4 de la especie *Acinetobacter* como modelo para amplificar el fragmento de ADN (el fragmento de ADN de nucleótido nº 398 al 541 de la SEC ID nº: 3) que codifica el sitio N-terminal de la enzima P-450 oxidativa de alcanos *AciA* originado a partir de la cepa OC4 de la especie *Acinetobacter*, y el tratamiento se realizó con las enzimas de restricción *NdeI* y *SpeI*. Por otro lado, se llevó a cabo la PCR usando el cebador BP195F (véase SEC ID nº: 12) y el cebador BP195R (véase SEC ID nº: 13) y el ADN genómico de la cepa IFO14104 de *Dactylosporangium variesporum* como modelo para amplificar el gen BP195 (véase los nucleótido nº 1 a 1203 de la SEC ID nº: 2) que codifica la enzima P-450, y el tratamiento se realizó con las enzimas de restricción *SpeI* y *BamHI*. Estos fragmentos de ADN se unieron a los sitios *NdeI* y *BamHI* del vector pETAcIBC-SD por ADN ligasa T4 para dar un plásmido, pETAcIBC-50AABP195.

35

(3) Plásmido pETAcIBC-50AAvdh

40 [0044] Se efectuó la PCR usando el cebador *vdhF* (véase SEC ID nº: 14) y el cebador *vdhR* (véase SEC ID nº: 15) y el ADN genómico de la cepa ATCC33795 de *Pseudonocardia autotrophica* como modelo para amplificar el gen *vdh* (véase los nucleótido nº 320 a 1531 de la SEC ID nº: 1) que codifica la enzima P-450, y el tratamiento se realizó con las enzimas de restricción *SpeI* y *BglII*. Estos fragmentos de ADN se unieron a los sitios *SpeI* y *BamHI* de pETAcIBC-50AABP195 por ADN ligasa T4 para dar un plásmido, pETAcIBC-50AAvdh.

45

(4) Plásmido pETduet-boxA

50 [0045] El vector pETAcIBC-SD del plásmido se trató con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, y se unió por ADN ligasa T4 al fragmento de ADN que contenía el gen *aciC* que codifica la proteína que comparte homología con la ferredoxina reductasa para dar un plásmido, pETduetaciC. Luego, usando los cebadores *boxBNcoF* (véase SEC ID nº: 16) y *boxBBamR* (véase SEC ID nº: 17) y el ADN genómico de la cepa TM-7 de la especie *Streptomyces*, se amplió el fragmento de ADN que contenía el gen *boxB* (véase los nucleótidos nº 1782 a 1973 de la SEC ID nº: 4) que codifica la ferredoxina asociada a la enzima P-450 oxidativa de compactina y se llevó a cabo el tratamiento con las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI*. Este fragmento de ADN se unió por ADN ligasa T4 al pETduetaciC tratado con las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI* para dar un plásmido, pETduetboxB. Por otra parte, usando los cebadores *boxANdeF* (véase SEC ID nº: 18) y *boxAXhoR* (véase SEC ID nº: 19) y el ADN genómico de la cepa TM-7 de la especie *Streptomyces*, el fragmento de ADN con el gen *boxA* (véase nucleótidos nº 544 a 1761 de la SEC ID nº: 4) que codifica la enzima P-450 oxidativa de compactina se amplificó, y el tratamiento se realizó con el *NdeI* de enzimas de restricción y *XhoI*. Este fragmento de ADN se unió por ADN ligasa T4 a pETduetboxB tratado con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* para dar un plásmido, pETduet-boxA.

55

60

(5) Plásmido pTrcRat

65

[0046] Se efectuó la PCR usando el cebador ExratF (véase SEC ID nº: 20) y el cebador ExratR (véase SEC ID nº: 21) y el ADN genómico de la cepa 895-3 de *Burkholderia cepacia* como modelo para amplificar el gen *ratA* (véase los nucleótidos nº 230 a 1330 de la SEC ID nº: 5) que codifica (R)- α -metiltryptamina aminotransferasa, y el tratamiento se realizó con las enzimas de restricción *PstI* y *EcoRI*. Este fragmento de ADN se unió a los sitios *EcoRI* y *PstI* mediante pTrcHisA (Invitrogen Co.) por ADN ligasa T4 para dar un plásmido pTrcRat.

(6) Plásmido pTrcRat

[0047] Se efectuó la PCR usando el cebador latSacF (véase SEC ID nº: 24) y el cebador latXhoR (véase SEC ID nº: 25) y el ADN genómico de la cepa IFO3084 de *Flavobacterium lutescens* como modelo para amplificar el gen *lat* (véase SEC ID nº: 30) que codifica lisina aminotransferasa, y se realizó el tratamiento con las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*. Se efectuó la PCR usando el cebador ZARXhoF (véase SEC ID nº: 26) y el cebador ZARBamR (véase SEC ID nº: 27) y el ADN genómico de la cepa IFO3084 de *Flavobacterium lutescens* como modelo para amplificar el gen *zar* (véase SEC ID nº: 31) que codifica N-benciloxicarbonil-L-ácido aminoácido-delta-semialdehído reductasa, y se llevó a cabo el tratamiento con las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI*. Y luego, se efectuó la PCR usando el cebador rocGBamF (véase SEC ID nº: 28) y el cebador rocGXbaR (véase SEC ID nº: 29) y el ADN genómico de la cepa ATCC23857 de la cepa de *Bacillus subtilis* 168 como modelo para amplificar el gen *rocG* (véase SEC ID nº: 32) y se llevó a cabo el tratamiento con las enzimas de restricción *SacI* y *XbaI*. Estos tres fragmentos de ADN se unieron a los sitios *SacI* y *XbaI* de pHSG298 (Takara Bio Co.) por ADN ligasa T4 para dar un *lat*, *zar* y *rocG* insertado en el plásmido pHSG-ZAR, en este orden.

Ejemplo 4: conversión microbiana a partir de vitamina D₃ en 25-hidroxivitamina D₃

[0048] Utilizando el plásmido pETAcIBC-50AAvdh, la cepa B1starToICAcRAB, la cepa BLstarToIC, la cepa BLstarAcrAB y la cepa BL21star(DE3) de *E. coli* fueron sometidas a transformación para dar, respectivamente, la cepa B1starToICAcRAB/pETAcIBC-50AAvdh, la cepa BLstarToIC/pETAcIBC-50AAvdh, la cepa BLstarAcrAB/pETAcIBC-50AAvdh y la cepa BL21star/pETAcIBC-50AAvdh. De la misma manera, usando el plásmido pETAcIBC-50AABP195, la cepa B1starToICAcRAB, la cepa BLstarToIC, la cepa BLstarAcrAB y la cepa BL21star(DE3) de *E. coli* se sometieron a transformación para dar, respectivamente, la cepa B1starToICAcRAB/pETAcIBC-50AABP195, la cepa BLstarToIC/pETAcIBC-50AABP195, la cepa BLstarAcrAB/pETAcIBC-50AABP195 y la cepa BL21 star/pETAcIBC-50AABP195. Estas cepas fueron sembradas en el medio líquido M9SEED (3,39% de Na₂HPO₄, 1,5% de KH₂PO₄, 0,25% de cloruro de calcio, 0,5% de cloruro amónico, 1% de ácido casamino, 0,002% de timina, 0,1 mM de cloruro de calcio, 0,1 mM de sulfato de hierro, 0,4% de glucosa, 0,001 mM de cloruro de magnesio) que contenía carbenicilina de sodio (100 µg/mL) y se cultivaron con agitación a 220 r.p.m., a 25°C, durante 24 horas. Esta solución de cultivo 200 µL se añadió a 25 mL del medio líquido M9Main (3,39% de Na₂HPO₄, 1,5% de KH₂PO₄, 0,25 % de cloruro sódico, 0,5 % de cloruro amónico, 1 % de ácido casamino, 0,002% de timina, 0,1 mM de cloruro de calcio, 0,1 mM de sulfato de hierro, 80 µg/mL de ácido 5-aminolevulínico) que contenía carbenicilina de sodio (100 µg/mL) y *Overnight Express Autoinduction Systems* (sistemas de autoinducción exprés durante toda la noche) (Novagen) y se cultivó con agitación a 220 r.p.m., a 25°C, durante 24 horas. El cuerpo bacteriano se recogió por centrifugado y se suspendió en 5 mL de tampón CV2 (50mM de tampón de fosfato potásico, 2% de glicerina, 50 µg/mL de carbenicilina, 0,1M de IPTG) para obtener la suspensión del cuerpo bacteriano en la concentración de 5 veces para la solución de cultivo. Para 1 mL de esta suspensión del cuerpo bacteriano, 25 µL de 1% de solución DMSO de vitamina D₃ (la concentración final 250 µg/mL) y ciclodextrina parcialmente metilada (la concentración final 0,75%) se adicionaron y la solución resultante se cultivó con agitación a 220 r.p.m., a 28°C, durante 24 horas. Luego, a la mezcla reactiva se añadió 2 mL de metanol, agitado en vórtex a temperatura ambiente durante 10 minutos, y luego se sometió a centrifugado por el centrifugador Eppendorf a 15 000 r.p.m., durante 10 minutos, y el sobrenadante resultante se analizó por HPLC para detectar 25-hidroxivitamina D₃ generada por hidroxilación de la vitamina D₃ de sustrato. El resultado se mostró en la tabla 1.

[0049] [Tabla]

Tabla 1

Huésped <i>E. coli</i>	Gen usado para conversión microbiana y concentración de acumulación de producto hidroxilado de vitamina D ₃ (µg/mL)		Gen usado para conversión microbiana y actividad específica para la cepa salvaje	
	<i>vdh</i>	BP195	<i>vdh</i>	BP195
Cepa salvaje	46,7	13,0	1,0	1,0
cepa interrumpida <i>acrAB</i>	135,1	23,5	2,9	1,8
cepa interrumpida <i>toIC</i>	187,0	30,2	4,0	2,3
cepa interrumpida <i>toIC, acrAB</i>	216,4	38,7	4,6	3,0

[0050] Las condiciones de medición de HPLC fueron las siguientes:

5 Analizador: Agilent 100 series
 Columna: J' sphere ODS-H80 (YMC, Inc.), 75 mm x 4.6 mm I.D.
 Fase móvil: A; acetonitrilo
 B; agua intercambiada de iones

Ajuste del tiempo de

gradiente:	0 minutos	fase móvil A/B = 30:70
	13,00 minutos	fase móvil A/B = 30:70
	14.00 minutos	fase móvil A/B = 100:0
	21.00 minutos	fase móvil A/B = 100:0
	22.00 minutos	fase móvil A/B = 70:30
	25,00 minutos	fase móvil A/B = 70:30

10

[0051]

Velocidad de flujo: 1,0 mL/minute
 Detección: UV 265 nm
 Volumen de inyección: 10 µL
 15 Temperatura de columna: 40°C
 Tiempo de análisis: 25 minutos

Tiempo de
 retención:

25- hidroxivitamina D ₃	8,8 minutos
Vitamina D ₃	21,0 minutos

20

[0052] En la conversión microbiana de vitamina D₃ utilizando el *E. coli* que se había hecho que expresara el gen *vdh* que codifica Vdh, que es una enzima P-450 y el gen *aciAB* que codifica el sistema de transporte de electrones, en comparación con el caso que utiliza el *E. coli* de tipo salvaje como huésped de expresión para el método convencional, se mostró 2,9 veces de acumulación de 25-hidroxivitamina D₃ al usar la cepa interrumpida *acrAB*, 4,0 veces cuando se usó la cepa interrumpida *tolC* y 4,6 veces cuando se usó la cepa interrumpida *tolCacrAB*.

25

[0053] También en la conversión microbiana de la vitamina D₃ utilizando el *E. coli* que se había hecho que expresara el gen que codifica BP195, que es una enzima P-450 y el gen *aciAB* que codifica el sistema de transporte de electrones, en comparación con el caso que utiliza el *E. coli* de tipo salvaje como huésped de expresión para el método convencional, se mostró 1,8 veces de acumulación de 25-hidroxivitamina D₃ al usar la cepa interrumpida *acrAB*, 2,3 veces al usar la cepa interrumpida *tolC* y 3,0 veces al usar la cepa interrumpida *tolCacrAB*.

30

Ejemplo 5: conversión microbiana de 4-colesten-3-ona en 25-hidroxi-4-colesten-3-ona

35

[0054] Usando la cepa B1starToICAcAB /pETAcIBC-50AABP195, la cepa BLstarToIC/pETAcIBC-50AABP195, la cepa BLstarAcrAB/pETAcIBC-50AABP195 y la cepa BL21star/pETAcIBC-50AABP195 de *E. coli* anteriormente mencionadas, se preparó la suspensión del cuerpo bacteriano de la misma manera que en el ejemplo 4. A 1 mL de esta suspensión del cuerpo bacteriano, se agregó 25 µL de 1% de solución 4-colesten-3-ona metanol (la concentración final 250 µg/mL) y ciclodextrina parcialmente metilada (la concentración final 0,75%) y la solución resultante se cultivó con agitación a 220 r.p.m., a 28°C, durante 24 horas. Después, a la mezcla de reacción se agregó 2 mL de metanol, agitado en vórtex a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se sometió a centrifugado mediante el centrifugador Eppendorf a 15 000 r.p.m., durante 10 minutos, y el sobrenadante resultante se analizó por HPLC para detectar 25-hidroxi-4-colesten-3-ona generada por hidroxilación del sustrato 4-cholesten-3-ona. El resultado se mostró en la tabla 2.

40

[0055] [Tabla 2]

Tabla 2

Huésped <i>E. coli</i>	Gen usado para conversión microbiana y concentración de acumulación de producto hidroxilado de 4-colesten-3-ona (µg/mL)	Gen usado para conversión microbiana y actividad específica para la cepa salvaje
	BP195	BP195
Cepa salvaje	14,1	1,0
cepa interrumpida <i>acrAB</i>	19,9	1,4
cepa interrumpida <i>tolC</i>	151,0	10,5
cepa interrumpida <i>tolC</i> / <i>acrAB</i>	155,5	11,0

5

[0056] Las condiciones de medición de HPLC fueron de la siguiente manera:

Analizador: Agilent 100 series
 Columna: Inertsil ODS/3 50 mm x 4.6 mm I.D.
 Fase móvil: A; acetonitrilo
 B; 0,85% de solución de fosfato acuoso

10

Ajuste del tiempo de gradiente: 0 minutos fase móvil A/B = 40:60
 5,00 minutos fase móvil A/B = 100:0
 8,00 minutos fase móvil A/B = 100:0
 8,30 minutos fase móvil A/B = 40:60
 11,00 minutos fase móvil A/B = 40:60

15

[0057]

Velocidad de flujo: 1,2 mL/minuto
 Detección: UV 235 nm
 Volumen de inyección: 40 µL
 Temperatura de columna: 40°C
 Tiempo de análisis: 11 minutos

20

Tiempo de retención: 25-hidroxi-4-colesten-3-ona 4,97 minutos
 4-colesten-3-ona 7,45 minutos

25

[0058] También en la conversión microbiana de 4-colesten-3-ona, en comparación con el caso que utiliza el *E. coli* de tipo salvaje como huésped de expresión para el método convencional, se mostró 1,4 veces de acumulación de 25-hidroxi-4-colesten-3-ona al usar la cepa interrumpida *acrAB*, 10,5 veces al usar la cepa interrumpida *tolC* y 11,0 veces al usar la cepa interrumpida *tolCacrAB*.

30

Ejemplo 6: conversión microbiana de compactina a pravastatina

[0059] Usando el plásmido pETduet-boxA anteriormente mencionado, se sometieron las cepas B1starTolCAcrAB y BL21 star(DE3) de *E. coli* a transformación para dar la cepa B1starTolCAcrAB-pETduet-boxA y la cepa BL21star/pETduet-boxA, respectivamente. Usando estas cepas bacterianas, se preparó la suspensión del cuerpo bacteriano de la misma manera que en el ejemplo 4. Para 1 mL de esta suspensión del cuerpo bacteriano, se agregó 30 µL de 25 mg/mL de compactina (la concentración final 750 µg/mL) y la solución resultante se cultivó con agitación a 220 r.p.m., a 28 °C, durante 8 horas. Por otra parte, 30 µL de 25 mg/mL de compactina se adicionó de forma suplementaria (la concentración final 1500 µg/mL) y la solución resultante se cultivó con agitación a 220 r.p.m., a 28 °C, durante 16 horas. Luego, a la mezcla de reacción se le agregó 1 mL de metanol y 1 mL de acetonitrilo, se agitó en vórtex a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se sometió a centrifugado por el centrifugador Eppendorf a 15 000 r.p.m. durante 10 minutos, y el sobrenadante resultante se analizó por HPLC para detectar pravastatina generada por hidroxilación de la compactina de sustrato. El resultado se mostró en la tabla 3.

35

40

[0060] [Tabla 3]

Tabla 3

5

Huésped <i>E. coli</i>	Gen usado para conversión microbiana y concentración de acumulación de producto hidroxilado de compactina ($\mu\text{g/mL}$)	Gen ha usado para conversión microbiana y actividad específica para la cepa salvaje
	<i>boxA</i>	<i>boxA</i>
Cepa salvaje	51,1	1,0
cepa interrumpida <i>acrAB</i>	NT	NT
cepa interrumpida <i>tolC</i>	NT	NT
cepa interrumpida <i>tolC</i> , <i>acrAB</i>	1689,0	33,1

[0061] Las condiciones de medición de HPLC fueron de la siguiente manera:

Analizador: Agilent 100 series

10

Columna: rendimiento de Chromolith RP-18e 100 mm x 4.6 mm I.D.

Fase móvil: A; metanol: trietilamina: ácido acético = 100:0.1:0.1

B; agua: trietilamina: ácido acético = 100:0.1:0.1

Ajuste del tiempo de gradiente: 0 minutos fase móvil A/B = 50:50
 3,00 minutos fase móvil A/B = 90:10
 3,50 minutos fase móvil A/B = 90:10
 3,51 minutos fase móvil A/B = 40:50
 5.00 minutos fase móvil A/B = 50:50

15

[0062]

Velocidad de flujo: 2,0 mL/ minuto

Detección: UV 238 nm

Volumen de inyección: 15 μL

Temperatura de columna: 40°C

20

Tiempo de análisis: 6 minutos

Tiempo de retención: pravastatina 1,77 minutos
 compactina 3,23 minutos

25

[0063] También en la conversión microbiana de compactina utilizando el *E. coli* que se había hecho que expresara el gen que codifica BoxA, que es una enzima P-450, y los genes *boxB* y *aciC* que codifican su sistema de transporte de electrones, en comparación con el caso que utiliza el *E. coli* de tipo salvaje como huésped de expresión para el método convencional, se mostró acumulación de 33,1 veces de pravastatina al usar la cepa interrumpida *tolCacrAB*.

30

Ejemplo 7: conversión microbiana de (R)- α -metiltriptamina en indol-3-acetona

35

[0064] Usando el plásmido pTrcRat anteriormente mencionado, la cepa B1starToICAcRAB y la cepa BL21 star(DE3) de *E. coli* fueron sometidas a transformación para dar la cepa B1starToICAcRAB /pTrcRat y la cepa BL21star/pTrcRat, respectivamente. Estas cepas se sembraron en el medio líquido L (1,0% de polipeptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,5% de cloruro sódico, pH 7,2) que contenía carbenicilina de sodio (100 $\mu\text{g/mL}$) y se cultivaron con agitación a 220 r.p.m., a 37°C, durante 8 horas. Esta solución de cultivo 50 μL se añadió a 25 ml del medio líquido L que contenía carbenicilina de sodio (100 $\mu\text{g/mL}$) y Overnight Express Autoinduction Systems (Novagen) y se cultivó con agitación a 220 r.p.m., a 30°C, durante 20 horas. El cuerpo bacteriano se recogió por centrifugado y se suspendió en 2,5 ml del tampón de borato (200mM, pH 9,0) para obtener la suspensión del cuerpo bacteriano en 10 veces la concentración de la solución de cultivo. Para 0,5 mL de esta suspensión del cuerpo bacteriano, se agregaron 0,5 mL del medio líquido L, 25 μL de 50% de solución de glicerol, 1,25 μL de 50 mg/mL de carbenicilina de sodio, 10 μL de 100mM de IPTG y 250 μL de 25mM de (R)- α -metiltriptamina y la solución resultante se cultivó con agitación a 220 r.p.m., a 30°C, durante 18 horas. Luego, a la mezcla de reacción se le añadió 50 μL de 5N de solución de hidróxido sódico y 2 mL de acetato de etilo, agitado en vórtex a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se sometió a centrifugado por el centrifugador Eppendorf a 15 000 r.p.m., durante 10 minutos, y el sobrenadante resultante se concentró a sequedad y se disolvió en 300 μL de metanol. La solución resultante se analizó por HPLC para detectar indol-3-acetona generada por disociación del grupo amino del sustrato (R)- α -metiltriptamina (R-MT). El resultado se mostró en la tabla 4.

45

[0065] [Tabla 4]

Tabla 4

Huésped <i>E. coli</i>	Gen usado para conversión microbiana y concentración de acumulación de producto hidroxilado de R-MT ($\mu\text{g/mL}$)	Gen usado para conversión microbiana y actividad específica para la cepa salvaje
	<i>ratA</i>	<i>ratA</i>
Cepa salvaje	81,6	1,0
cepa interrumpida <i>acrAB</i>	NT	NT
cepa interrumpida <i>tolC</i>	NT	NT
cepa interrumpida <i>tolC</i> , <i>acrAB</i>	97,8	1,2

[0066] Las condiciones de medición de HPLC fueron de la siguiente manera:

Analizador: Agilent 100 series

Columna: CHILALPAK AS-H (DAICEL) 250 mm x 4.6 mm I.D.

Fase móvil: hexano: alcohol isopropílico: dietilamina = 75:25:0.6

Velocidad de flujo: 0,7 mL/minut0

Detección: UV 238 nm

Volumen de inyección: 15 μL

Temperatura de columna: 25°C

Tiempo de análisis: 15 minutos

Tiempo de retención:	(R)- α -metilriptamina	6,5 minutos
	indol-3-acetona	11,4 minutos

[0067] En la conversión microbiana de (R)- α -metilriptamina utilizando el *E. coli* que se había hecho que expresara el gen que codifica RatA, que es una (R)- α -metilriptamina aminotransferasa, en comparación con el caso que utiliza el *E. coli* de tipo salvaje como huésped de expresión para el método convencional, se mostró 1,2 veces de acumulación de indol-3-acetona al usar la cepa interrumpida *tolCacrAB*.

25 Ejemplo 8: conversión microbiana de N-benciloxycarbonil-L-lisina (Z-Lys) en N-benciloxycarbonil-6-hidroxi-L-norleucina (Z-HNL)

[0068] Z-Lys es convertida en N-benciloxycarbonil-L-ácido aminoácido-delta-semialdehído (L-ASA) por lisina aminotransferasa codificada por el gen *lat* en el plásmido pHSG-ZAR, Z-ASA es convertida en Z-HNL por una Z-ASA reductasa codificada por el gen *zar*, una coenzima NADPH es regenerada por deshidrogenasa de ácido glutámico codificada por el gen *rocG*. Usando el plásmido pHSG-ZAR, la cepa B1starTolCAcrAB y la cepa BL21 star(DE3) de *E. coli* fueron sometidas a transformación para dar, respectivamente, la cepa B1starTolCAcrAB -pHSG-ZAR y la cepa BL21 star/pHSG-ZAR. Estas cepas se sembraron en el medio líquido M9SEED (3,39% de Na_2HPO_4 , 1,5% de KH_2PO_4 , 0,25% de cloruro de calcio, 0,5% de cloruro amónico, 1% de ácido de casamino, 0,002% de timina, 0,1mM de cloruro de calcio, 0,1mM de sulfato de hierro, 0,4% de glucosa, 0,001mM de cloruro de magnesio) que contenía sulfato de canamicina (25 $\mu\text{g/mL}$) y se cultivaron con agitación a 220 r.p.m., a 25°C, durante 24 horas. Esta solución de cultivo 200 μL se añadió a 25 mL del medio líquido M9ZAR (3,39% de Na_2HPO_4 , 1,5% de KH_2PO_4 , 0,25% de cloruro sódico, 0,5% de cloruro amónico, 1% de ácido casamino, 0,002% de timina, 0,1mM cloruro de calcio) que contenía sulfato de canamicina (80 $\mu\text{g/mL}$) y Overnight Express Autoinduction Systems (Novagen) y se cultivó con agitación a 220 r.p.m., a 30°C, durante 7 horas y luego se cultivó con agitación a 140 r.p.m., a 25°C, durante 17 horas. El cuerpo bacteriano se recogió por centrifugado y se suspendió en 5 mL del tampón CV3 (50mM de tampón de fosfato potásico, 2% de glicerina, 20 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de canamicina, 0,1M de IPTG) para obtener la suspensión del cuerpo bacteriano en la concentración de 5 veces la solución de cultivo. A 1 mL de esta suspensión del cuerpo bacteriano, se agregó 40 μL de 25 mg/mL de solución Z-Lys (la concentración final 1000 $\mu\text{g/mL}$) y γ -ciclodextrina (la concentración final 2%) y la solución resultante se cultivó con agitación a 220 r.p.m., a 28°C, durante 24 horas. Luego, a la mezcla de reacción se agregó 2 mL de metanol, se agitó en vórtex a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se sometió a centrifugado por el centrifugador Eppendorf a 15 000 r.p.m., durante 10 minutos, y el sobrenadante resultante se analizó por HPLC para detectar Z-HNL convertido a partir del sustrato Z-Lys. El resultado se mostró en la tabla 5.

[Tabla 5]

Huésped <i>E. coli</i>	Gen usado para conversión microbiana y concentración de acumulación de Z- HNL (µg/mL)	Gen usado para conversión microbiana y actividad específica para la cepa salvaje
	<i>lat, zar, rocG</i>	<i>lat, zar, rocG</i>
Cepa salvaje	288	1
cepa interrumpida <i>acrAB</i>	N.T.	N.T.
cepa interrumpida <i>tolC</i>	N.T.	N.T.
cepa interrumpida <i>tolC, acrAB</i>	420	1.5

5 [0069] Las condiciones de medición de HPLC fueron de la siguiente manera:

Analizador: Agilent 100 series

Columna: J' sphere ODS-H80 (YMC; Inc.), 75 mm x 4.6 mm I.D.

Fase móvil: A; acetonitrilo

10 B; 0,85% de solución de fosfato acuoso

Ajuste del tiempo de gradiente: 0 minutos fase móvil A/B = 20:80
 6,00 minutos fase móvil A/B = 20:80
 8,00 minutos fase móvil A/B = 60:40
 10,00 minutos fase móvil A/B = 20:80

Velocidad de flujo: 1,5 mL/minuto

Detección: UV 220 nm

15 Volumen de inyección: 10 µL

Temperatura de columna: 40 °C

Tiempo de análisis: 10 minutos

Tiempo de retención: Z-HNL 3,1 minutos

20 [0070] En la conversión microbiana de Z-Lys utilizando el *E. coli* que se había hecho que expresara los genes que codifican respectivamente lisina aminotransferasa, N-benciloxycarbonil-L-ácido aminoacético-delta-semialdehído reductasa y deshidrogenasa de ácido glutámico, en comparación con el caso que utiliza el *E. coli* de tipo salvaje como huésped de expresión para el método convencional, se mostró 1,5 veces de acumulación de Z-HNL al usar la cepa interrumpida *tolCacrAB*.

25 [Aplicación Industrial]

[0071] La presente invención es útil en el dominio de la fabricación de compuestos utilizando conversión microbiana.

30 Listado de secuencias

[0072]

<110> Mercian Corporation

35 <120> Cepas transformadas originadas a partir de cepas deficientes de proteína de eflujo multifármaco y un método para la conversión microbiana que utiliza las mismas.

<130> A75274H

40 <160> 32

<210> 1

<211> 2011

45 <212> DNA

<213> ATCC33795 de *Pseudonocardia autotrophica*

<220>

<221> CDS

50 <222> (320)..(1528)

<223> vdh

<400> 1

gcgctcgggc	tggaccggat	cggcgaggtg	acgacgctgg	ggctgcgctc	ggtgcggacc	60
gcctgggccc	ggctgcggac	gttcgccccg	gaccgggccc	cggtgctggg	ggagtggccc	120
gatcatcccc	ggttccactt	cgctgcgggc	caggggtggat	ccggtatcga	gtcggctccc	180
gcgctggccc	cgctggcagc	gtcgatgac	gtcgggccc	cgccgcccgc	cgatgtcgcg	240
ctcgatcccc	ctgtgtgctc	ggcactcgt	ctccggtgac	gtaagcgcgc	gcttacgctc	300
cgctggcacc	atggggccc	atg gcg ctg	acc acc acc	ggc acc gag	cag cac	352
		Met Ala Leu	Thr Thr Thr	Gly Thr Glu	Gln His	
		1	5	10		
gac ctg ttc tgc ggc acc ttc tgg	cag aac ccg cat ccc gcc tac gcg					400
Asp Leu Phe Ser Gly Thr Phe Trp	Gln Asn Pro His Pro Ala Tyr Ala					
		15	20	25		
gca ctc cgt gcc gag gat ccg gta cgc aag ctc gcg ctg ccg gac ggg						448
Ala Leu Arg Ala Glu Asp Pro Val Arg Lys Leu Ala Leu Pro Asp Gly						
		30	35	40		
ccg gtc tgg ctg ctc acc cgc tac gcc gac gtg cgc gag gcc ttc gtc						496
Pro Val Trp Leu Leu Thr Arg Tyr Ala Asp Val Arg Glu Ala Phe Val						
		45	50	55		
gat ccg cgc ctg tgc aag gac tgg cgc cac acg ctg ccc gag gac cag						544
Asp Pro Arg Leu Ser Lys Asp Trp Arg His Thr Leu Pro Glu Asp Gln						
		60	65	70		
ccg gcg gac atg ccg gcc acg ccg acg ccg atg atg atc ctg atg gat						592
Arg Ala Asp Met Pro Ala Thr Pro Thr Pro Met Met Ile Leu Met Asp						
		80	85	90		
ccg ccg gat cac acc ccg ctg cgc aag ctg gtc gcc agg tgc ttc acc						640
Pro Pro Asp His Thr Arg Leu Arg Lys Leu Val Gly Arg Ser Phe Thr						
		95	100	105		
gtc cgc ccg atg aac gag ctg gag ccg ccg atc acc gag atc gcc gac						688
Val Arg Arg Met Asn Glu Leu Glu Pro Arg Ile Thr Glu Ile Ala Asp						
		110	115	120		
ggc ctg ctc gcc ggc ctg ccc acc gac gcc ccg gtc gac ctg atg cgc						736
Gly Leu Leu Ala Gly Leu Pro Thr Asp Gly Pro Val Asp Leu Met Arg						
		125	130	135		
gag tac gcg ttc cag atc ccg gta cag gtg atc tgc gag ctg ctc ggg						784
Glu Tyr Ala Phe Gln Ile Pro Val Gln Val Ile Cys Glu Leu Leu Gly						
		140	145	150		
gtg ccc gcc gag gac cgc gac gac ttc tcc gcg tgg tgc tgc gtg ctg						832
Val Pro Ala Glu Asp Arg Asp Asp Phe Ser Ala Trp Ser Ser Val Leu						
		160	165	170		
gtc gac gac tgc ccg gcc gac gac aag aac gcg gcc atg gcc aag ctg						880
Val Asp Asp Ser Pro Ala Asp Asp Lys Asn Ala Ala Met Gly Lys Leu						
		175	180	185		
cac gcc tac ctg tcc gac ctg ctg gag cgc aag cgc acc gag ccc gac						928
His Gly Tyr Leu Ser Asp Leu Leu Glu Arg Lys Arg Thr Glu Pro Asp						
		190	195	200		
gac gcg ctg ttg tgc tgc ctg ctg gcg gtg tcc gac gag gac gcc gac						976
Asp Ala Leu Leu Ser Ser Leu Leu Ala Val Ser Asp Glu Asp Gly Asp						
		205	210	215		
ccg ctc tcc cag gag gag gtc gcg atg gcg atg ctg ctg ctg atc						1024
Arg Leu Ser Gln Glu Glu Leu Val Ala Met Ala Met Leu Leu Leu Ile						
		220	225	230		
gcc ggg cac gag acg acg gtc aac ctg atc gcc aac gcc gtc ctc gcc						1072
Ala Gly His Glu Thr Thr Val Asn Leu Ile Gly Asn Gly Val Leu Ala						
		240	245	250		

```

ctg ctc acg cac ccc gac cag cgg aag ctg ctg gcc gag gac ccg tcg      1120
Leu Leu Thr His Pro Asp Gln Arg Lys Leu Leu Ala Glu Asp Pro Ser
                255                260                265
ctg atc agc tcg gcg gtc gag gag ttc ctg cgg ttc gac tct ccc gtc      1168
Leu Ile Ser Ser Ala Val Glu Glu Phe Leu Arg Phe Asp Ser Pro Val
                270                275                280
tcg cag gcc ccg atc cgg ttc acc gcg gag gac gtc acc tac tcc gcc      1216
Ser Gln Ala Pro Ile Arg Phe Thr Ala Glu Asp Val Thr Tyr Ser Gly
                285                290                295
gtg acc atc ccg gcc gcc gcc gag atg gtc atg ctc ggg ctg gcc gcc gcc      1264
Val Thr Ile Pro Ala Gly Glu Met Val Met Leu Gly Leu Ala Ala Ala
300                305                310                315
aac cgg gac gcc gac tgg atg ccc gag ccg gac cgg ctc gac atc acc      1312
Asn Arg Asp Ala Asp Trp Met Pro Glu Pro Asp Arg Leu Asp Ile Thr
                320                325                330
cgg gac gcc tcc gcc ggc gtc ttc ttc ggg cac gcc atc cac ttc tgc      1360
Arg Asp Ala Ser Gly Gly Val Phe Phe Gly His Gly Ile His Phe Cys
                335                340                345
ctc ggt gcc cag ctg gcc cgg ctg gag gcc cgg gtc gcg atc gga cgg      1408
Leu Gly Ala Gln Leu Ala Arg Leu Glu Gly Arg Val Ala Ile Gly Arg
                350                355                360
ctg ttc gcc gat cgc ccg gag ctg gcg ctc gcg gtc gcc ctc gac gag      1456
Leu Phe Ala Asp Arg Pro Glu Leu Ala Leu Ala Val Gly Leu Asp Glu
365                370                375
ctg gtc tac ccg gag tcg acg ctg gtc cgg ggg ctg tcg agg atg ccg      1504
Leu Val Tyr Arg Glu Ser Thr Leu Val Arg Gly Leu Ser Arg Met Pro
380                385                390                395
gtg acg atg ggg ccg cgc agc gcc tga tcccgttcgc ggacgggccc      1551
Val Thr Met Gly Pro Arg Ser Ala
                400
ggcggcccgt ccgcgagtac ggtcagccgc tcagtgggac cccggctctc tcccgcacct      1611
cgctcggcggg gacgcgccgga gcggtctcga ccagcgcgag gccgcccggg gtgacgtcga      1671
tgacggcgag atcgggtgacg atccgggtga cgcagcccag cccggtgatg ggcaggctgc      1731
acgactcgac gatcttgggc gtgccgtcgc gggacacgtg gtccatcacc acgatgacgg      1791
tgcggggccc gtgcacgagg tccatcgcgc cgcctatccc cttgatcacc ttcccgggca      1851
cggcccfagkt ggcgagatcg ccgttggcgg cgacctgcat gccgcccagc acggcgacgt      1911
cgagcttccc ggcgcggatc tgggcgaagc tgteccagga gccgaagtag gcggcgccgt      1971
cgttgacggg gacggtctcc ttgcccgcgt tgatcaggtc      2011

```

<210> 2
 <211> 1203
 5 <212> DNA
 <213> IF014104 de Dactylosporangium variesporum

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(1200)
 <223> SP195

<400> 2

ES 2 426 640 T3

atg	acc	gaa	acg	ctg	tac	ccc	gag	ctg	ccc	acg	act	cgc	agc	tca	ccg	48
Met	Thr	Glu	Thr	Leu	Tyr	Pro	Glu	Leu	Pro	Thr	Thr	Arg	Ser	Ser	Pro	
1				5				10						15		
ctg	gac	ccg	ccc	gcg	gaa	ctg	ggg	gtg	ttg	cgc	gag	acc	gaa	ccc	atc	96
Leu	Asp	Pro	Pro	Ala	Glu	Leu	Gly	Val	Leu	Arg	Glu	Thr	Glu	Pro	Ile	
			20					25					30			
agc	cgg	ctg	gcg	ttc	ccg	gac	ggc	acc	ctg	ggg	tgg	ctg	gtg	acc	agc	144
Ser	Arg	Leu	Ala	Phe	Pro	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Trp	Leu	Val	Thr	Ser	
		35					40					45				
cac	gcg	ctc	gcg	cgg	gag	gtg	ctg	gcc	gac	aac	cgg	ttc	agc	aac	cgg	192
His	Ala	Leu	Ala	Arg	Glu	Val	Leu	Ala	Asp	Asn	Arg	Phe	Ser	Asn	Arg	
	50					55				60						
gcc	gag	cta	cag	cac	tcg	ccg	atc	cgg	gcg	ggc	ggc	aaa	ccc	atc	ccg	240
Ala	Glu	Leu	Gln	His	Ser	Pro	Ile	Arg	Ala	Gly	Gly	Lys	Pro	Ile	Pro	
65					70					75					80	
caa	cag	ccg	ccg	gcc	aag	ccc	ggc	atg	ttc	atc	aac	atg	gac	ggc	cag	288
Gln	Gln	Pro	Pro	Ala	Lys	Pro	Gly	Met	Phe	Ile	Asn	Met	Asp	Gly	Gln	
				85					90					95		
gag	cac	gcc	aag	tac	cgg	cgg	ctg	ctg	acc	ggc	cag	ttc	acc	gtc	cgg	336
Glu	His	Ala	Lys	Tyr	Arg	Arg	Leu	Leu	Thr	Gly	Gln	Phe	Thr	Val	Arg	

<223> aciA

<220>

<221> CDS

5 <222> (1978)..(3189)

<223> aciC

<400> 3

atg ggc caa att aca ttt att gcc cac gat ggt gca caa acc agc gtt	48
Met Gly Gln Ile Thr Phe Ile Ala His Asp Gly Ala Gln Thr Ser Val	
1 5 10 15	
gca atc gaa gcg ggt aag tca cta atg cag ttg gcg gtt gaa aac ggt	96
Ala Ile Glu Ala Gly Lys Ser Leu Met Gln Leu Ala Val Glu Asn Gly	
20 25 30	
gtt gcc gga att gat ggg gat tgc ggt ggc gaa tgc gcc tgt ggt acc	144
Val Ala Gly Ile Asp Gly Asp Cys Gly Gly Glu Cys Ala Cys Gly Thr	
35 40 45	
tgc cac gtg att gtc agt gct gag tgg tcg gat gtt gcg ggt acg gca	192
Cys His Val Ile Val Ser Ala Glu Trp Ser Asp Val Ala Gly Thr Ala	
50 55 60	
caa gcg aat gag cag cag atg ttg gaa atg acc cca gag cgt gct gcc	240
Gln Ala Asn Glu Gln Gln Met Leu Glu Met Thr Pro Glu Arg Ala Ala	
65 70 75 80	
acc tca cgt ttg gcg tgt tgt atc caa gtg acc gat gca atg gat ggc	288
Thr Ser Arg Leu Ala Cys Cys Ile Gln Val Thr Asp Ala Met Asp Gly	
85 90 95	
atg acg gta cat ctg cct gag ttt cag atg taa cacgtcagct gtaaccagc	341
Met Thr Val His Leu Pro Glu Phe Gln Met	
100 105	
ggatcaaccg ccttaacaaa cacacctcgt caacgatgct cagtcaggag accatc	397
atg aac tca gtc gca gaa att ttt gag aaa ata acc caa act gtc acc	445
Met Asn Ser Val Ala Glu Ile Phe Glu Lys Ile Thr Gln Thr Val Thr	
110 115 120	
agc acc gct gca gac gta gca acc acg gtt acg gat aaa gtc aag tct	493
Ser Thr Ala Ala Asp Val Ala Thr Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser	
125 130 135	
aat gag cag ttt caa acg ggc aag cag ttt ttg cat ggt caa gtg acc	541
Asn Glu Gln Phe Gln Thr Gly Lys Gln Phe Leu His Gly Gln Val Thr	
140 145 150	
cgt ttt gtc cca ttg cac acg cag gtt cgc ggc att cag tgg atg caa	589
Arg Phe Val Pro Leu His Thr Gln Val Arg Gly Ile Gln Trp Met Gln	
155 160 165 170	
aaa gcc aaa ttc cgt gtg ttt aac gtg caa gaa ttt cct gca ttt atc	637
Lys Ala Lys Phe Arg Val Phe Asn Val Gln Glu Phe Pro Ala Phe Ile	
175 180 185	
gag caa ccg att cca gaa gtt gca aca ctg gca ctt gct gag att gat	685
Glu Gln Pro Ile Pro Glu Val Ala Thr Leu Ala Leu Ala Glu Ile Asp	
190 195 200	
gtt agc aac cca ttt tta tac aag caa aaa aaa tgg cag tct tac ttt	733
Val Ser Asn Pro Phe Leu Tyr Lys Gln Lys Lys Trp Gln Ser Tyr Phe	
205 210 215	
aag cgg ctg cgt gat gaa gca ccg gta cat tat caa gcc aac agt ccg	781
Lys Arg Leu Arg Asp Glu Ala Pro Val His Tyr Gln Ala Asn Ser Pro	
220 225 230	
ttt ggg gca ttt tgg tcg gtc acg cgt tac gat att gtc tat gtc	829
Phe Gly Ala Phe Trp Ser Val Thr Arg Tyr Asp Asp Ile Val Tyr Val	
235 240 245 250	
gat aaa aat cat gag att ttt tca gct gaa cct gtg atc gcg att ggc	877
Asp Lys Asn His Glu Ile Phe Ser Ala Glu Pro Val Ile Ala Ile Gly	
255 260 265	
aac acc cct cct ggg tta ggt gct gaa atg ttt att gca atg gac cca	925
Asn Thr Pro Pro Gly Leu Gly Ala Glu Met Phe Ile Ala Met Asp Pro	
270 275 280	
ccc aag cac gat gtg cag cgg cag gcc gta cag gat gta gtc gca cca	973
Pro Lys His Asp Val Gln Arg Gln Ala Val Gln Asp Val Val Ala Pro	
285 290 295	
aaa aat ctc aaa gag cta gag ggt ttg att cgg cta cgc gtg caa gag	1021
Lys Asn Leu Lys Glu Leu Glu Gly Leu Ile Arg Leu Arg Val Gln Glu	
300 305 310	
gtt ttg gat cag ttg cca acg gat cag ccg ttt gat tgg gtg cag aat	1069

Val 315	Leu	Asp	Gln	Leu	Pro 320	Thr	Asp	Gln	Pro	Phe 325	Asp	Trp	Val	Gln	Asn 330		
ggt	tcg	att	gag	ctg	aca	gcc	cgt	atg	ttg	gca	aca	tta	ttt	gat	ttc	1117	
Val	Ser	Ile	Glu	Leu	Thr	Ala	Arg	Met	Leu	Ala	Thr	Leu	Phe	Asp	Phe		
				335					340						345		
cca	tac	gaa	aag	cgg	cac	aaa	ttg	ggt	gaa	tgg	tca	gac	ttg	atg	gct	1165	
Pro	Tyr	Glu	Lys	Arg	His	Lys	Leu	Val	Glu	Trp	Ser	Asp	Leu	Met	Ala		
			350					355					360				
ggc	act	gcg	gag	gcc	aca	ggt	ggg	aca	gtg	aca	aat	ttg	gat	gag	att	1213	
Gly	Thr	Ala	Glu	Ala	Thr	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Asn	Leu	Asp	Glu	Ile		
			365				370					375					
ttt	gat	gca	gca	gtc	gat	gca	gca	aag	cat	ttt	gcg	gag	tta	tgg	cat	1261	
Phe	Asp	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Phe	Ala	Glu	Leu	Trp	His		
								385									
aga	aaa	gcc	gca	caa	aaa	tct	gca	ggc	gct	gaa	atg	ggc	tat	gat	ttg	1309	
Arg	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Ser	Ala	Gly	Ala	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Leu		
395					400				405						410		
atc	agc	ttg	atg	cag	tca	aac	gaa	gcg	act	aaa	gac	ctg	att	tat	cgg	1357	
Ile	Ser	Leu	Met	Gln	Ser	Asn	Glu	Ala	Thr	Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Arg		
				415					420					425			
ccg	atg	gag	ttt	atg	ggc	aat	ttg	gtc	ttg	cta	att	gtc	ggc	ggc	aac	1405	
Pro	Met	Glu	Phe	Met	Gly	Asn	Leu	Val	Leu	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Asn		
				430				435					440				
gat	acc	aca	cgc	aac	tcg	atg	acg	ggt	ggg	gta	tac	gca	ctt	aac	ctg	1453	
Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Thr	Gly	Gly	Val	Tyr	Ala	Leu	Asn	Leu		
				445			450					455					
ttt	cca	aat	gag	ttc	gtc	aaa	ctc	aaa	aac	aat	ccg	agc	ttg	atc	ccg	1501	
Phe	Pro	Asn	Glu	Phe	Val	Lys	Leu	Lys	Asn	Asn	Pro	Ser	Leu	Ile	Pro		
							465					470					
aac	atg	gta	tcc	gaa	att	att	cgc	tgg	caa	acc	ccg	ctg	gcc	tat	atg	1549	
Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr	Pro	Leu	Ala	Tyr	Met		
475					480				485						490		
cgt	cgg	att	gcc	aag	caa	gat	gta	gag	ctt	aac	ggg	cag	acc	atc	aaa	1597	
Arg	Arg	Ile	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Asn	Gly	Gln	Thr	Ile	Lys		
				495				500					505				
aaa	ggc	gac	aag	gtg	gtg	atg	tgg	tac	gtt	tct	ggc	aac	cgc	gat	gag	1645	
Lys	Gly	Asp	Lys	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Val	Ser	Gly	Asn	Arg	Asp	Glu		
			510					515					520				
cga	gtg	att	gag	cga	cct	gat	gaa	ttg	atc	att	gat	cgt	aaa	ggt	gcg	1693	
Arg	Val	Ile	Glu	Arg	Pro	Asp	Glu	Leu	Ile	Ile	Asp	Arg	Lys	Gly	Ala		
			525				530					535					
cgt	aat	cat	ctg	tca	ttt	ggt	ttt	ggt	gtg	cat	cgc	tgt	atg	ggt	aat	1741	
Arg	Asn	His	Leu	Ser	Phe	Gly	Phe	Gly	Val	His	Arg	Cys	Met	Gly	Asn		
						545					550						
cgc	ttg	gcc	gag	atg	cag	ttg	cga	atc	tta	tgg	gaa	gag	ctg	ctt	cag	1789	
Arg	Leu	Ala	Glu	Met	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Trp	Glu	Glu	Leu	Leu	Gln		
555					560					565					570		
cgt	ttt	gaa	aat	att	gag	gtt	ttg	ggt	gag	cca	gaa	att	gtg	caa	tct	1837	
Arg	Phe	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Leu	Gly	Glu	Pro	Glu	Ile	Val	Gln	Ser		
				575				580						585			
aac	ttt	gtg	cgc	ggc	tat	gcc	aag	atg	atg	gtc	aaa	ctg	act	gcc	aaa	1885	
Asn	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr	Ala	Lys	Met	Met	Val	Lys	Leu	Thr	Ala	Lys		
				590				595					600				
gcg	tag	gta	tcaaaa	aat	agg	cga	caga	ggc	attttgc	aact	gtc	gtc	ggc	aac	gatt	ga	1943
Ala																	
tgct	gtg	cat	caacc	atgaa	ctg	agt	gaat	tcat	atg	caa	aca	atc	gtc	atc	att	1998	
									Met	Gln	Thr	Ile	Val	Ile	Ile		
															610		
ggc	gca	agt	cat	gct	gcg	gcg	cag	ttg	gcg	gca	agt	ctg	cgg	cca	gat	2046	
Gly	Ala	Ser	His	Ala	Ala	Ala	Gln	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	Arg	Pro	Asp		
				615					620					625			
ggc	tgg	cag	ggc	gag	att	gtg	gtg	atc	ggc	gat	gag	ccg	tat	ttg	ccg	2094	
Gly	Trp	Gln	Gly	Glu	Ile	Val	Val	Ile	Gly	Asp	Glu	Pro	Tyr	Leu	Pro		
				630				635					640				
tat	cat	cga	ccg	ccg	ttg	tcc	aag	acc	ttt	tta	cgc	ggt	gca	caa	ctg	2142	
Tyr	His	Arg	Pro	Pro	Leu	Ser	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Gly	Ala	Gln	Leu		
				645			650					655					

gtc	gat	gag	tta	ttg	att	cgg	cca	gcc	gct	ttt	tat	caa	aaa	aat	cag	2190
Val	Asp	Glu	Leu	Leu	Ile	Arg	Pro	Ala	Ala	Phe	Tyr	Gln	Lys	Asn	Gln	
	660					665					670					
atc	gaa	ttt	cgg	cac	ggg	cgg	gtg	ggt	gcg	att	gat	cgg	gca	gcg	cgc	2238
Ile	Glu	Phe	Arg	His	Gly	Arg	Val	Val	Ala	Ile	Asp	Arg	Ala	Ala	Arg	
	675				680					685					690	
agc	gtg	aca	cta	caa	gat	ggc	agt	acg	ctt	gcg	tat	gac	cag	ttg	gcg	2286
Ser	Val	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly	Ser	Thr	Leu	Ala	Tyr	Asp	Gln	Leu	Ala	
				695					700					705		
ctg	tgt	acc	ggt	gca	cga	gtc	agg	acg	gtg	tcg	ctg	gct	ggg	tct	gat	2334
Leu	Cys	Thr	Gly	Ala	Arg	Val	Arg	Thr	Val	Ser	Leu	Ala	Gly	Ser	Asp	
			710					715					720			
ttg	gca	ggt	gtg	cat	tat	ctt	aga	aat	atc	agc	gat	gta	cag	gct	atc	2382
Leu	Ala	Gly	Val	His	Tyr	Leu	Arg	Asn	Ile	Ser	Asp	Val	Gln	Ala	Ile	
		725					730					735				
cag	cca	ttt	gta	caa	ccc	aac	ggc	aaa	gca	gtg	gtg	atc	ggt	ggt	ggc	2430
Gln	Pro	Phe	Val	Gln	Pro	Asn	Gly	Lys	Ala	Val	Val	Ile	Gly	Gly	Gly	
	740					745				750						
tat	atc	ggt	ctt	gaa	aca	gcc	gcc	gca	ttg	acc	gag	cag	ggc	atg	cag	2478
Tyr	Ile	Gly	Leu	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Glu	Gln	Gly	Met	Gln	
	755			760					765					770		
gtg	gtg	gtc	ttg	gaa	gcc	gcc	gag	cgg	att	ttg	cag	cgg	gta	act	gca	2526
Val	Val	Val	Leu	Glu	Ala	Ala	Glu	Arg	Ile	Leu	Gln	Arg	Val	Thr	Ala	
				775					780					785		
ccg	gaa	gtg	tcg	gac	ttt	tat	acg	cgg	att	cat	cgc	gaa	cag	ggt	gtg	2574
Pro	Glu	Val	Ser	Asp	Phe	Tyr	Thr	Arg	Ile	His	Arg	Glu	Gln	Gly	Val	
			790					795				800				
acg	att	cat	acc	ggt	gtg	tcg	gtc	acg	gcg	atc	acg	ggt	gag	ggg	cgg	2622
Thr	Ile	His	Thr	Gly	Val	Ser	Val	Thr	Ala	Ile	Thr	Gly	Glu	Gly	Arg	
		805					810					815				
gcg	cag	gcg	gtg	ctg	tgt	gcc	gat	ggt	tcg	atg	ttc	gat	gca	gat	ctg	2670
Ala	Gln	Ala	Val	Leu	Cys	Ala	Asp	Gly	Ser	Met	Phe	Asp	Ala	Asp	Leu	
	820					825					830					
gtg	atc	atc	ggg	gtc	ggg	ggt	gta	ccg	aat	atc	gag	ttg	gcg	ctg	gac	2718
Val	Ile	Ile	Gly	Val	Gly	Val	Val	Pro	Asn	Ile	Glu	Leu	Ala	Leu	Asp	
	835				840					845					850	
gcg	ggc	ttg	cag	gtg	gac	aat	ggt	att	gtg	att	gat	gag	tat	tgc	cga	2766
Ala	Gly	Leu	Gln	Val	Asp	Asn	Gly	Ile	Val	Ile	Asp	Glu	Tyr	Cys	Arg	
				855					860					865		
acc	agt	gcg	cca	gag	att	gtg	gcc	atc	ggg	gat	tgt	gcc	aat	gcg	ttt	2814
Thr	Ser	Ala	Pro	Glu	Ile	Val	Ala	Ile	Gly	Asp	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	
			870					875				880				
aat	ccg	att	tat	cag	cgg	cgg	atg	cgc	ttg	gag	tcg	gta	cca	aac	gcc	2862
Asn	Pro	Ile	Tyr	Gln	Arg	Arg	Met	Arg	Leu	Glu	Ser	Val	Pro	Asn	Ala	
		885					890					895				
aat	gaa	cag	gcc	aaa	att	gcc	tcg	gcg	acc	ttg	tgt	ggc	tta	cag	cgg	2910
Asn	Glu	Gln	Ala	Lys	Ile	Ala	Ser	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Leu	Gln	Arg	
	900					905										
acc	tcg	aag	agt	ttg	cct	tgg	ttt	tgg	tca	gat	cag	tat	gat	cta	aag	2958
Thr	Ser	Lys	Ser	Leu	Pro	Trp	Phe	Trp	Ser	Asp	Gln	Tyr	Asp	Leu	Lys	
	915				920					925				930		
ttg	cag	att	gcg	gga	ctc	agt	cag	ggg	tat	gat	cag	atc	gtg	att	cgg	3006
Leu	Gln	Ile	Ala	Gly	Leu	Ser	Gln	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ile	Val	Ile	Arg	
				935					940					945		
ggt	gat	gtg	cag	caa	agg	cgt	agc	ttt	gca	gcg	ttt	tat	ttg	cag	gcg	3054
Gly	Asp	Val	Gln	Gln	Arg	Arg	Ser	Phe	Ala	Ala	Phe	Tyr	Leu	Gln	Ala	
			950					955					960			
ggt	cgc	ctg	att	gcg	gcg	gat	tgt	gtg	aat	cgt	ccg	cag	gag	ttt	atg	3102
Gly	Arg	Leu	Ile	Ala	Ala	Asp	Cys	Val	Asn	Arg	Pro	Gln	Glu	Phe	Met	
			965				970					975				
cta	agc	aaa	aag	ctg	atc	acg	gct	ggt	acg	gcg	gtc	gat	cca	ctg	cgg	3150
Leu	Ser	Lys	Lys	Leu	Ile	Thr	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Asp	Pro	Leu	Arg	
	980					985					990					
ttg	gcg	gat	gag	tcg	att	gcg	gta	cag	gcg	ttg	atg	ggg	tag			3192
Leu	Ala	Asp	Glu	Ser	Ile	Ala	Val	Gln	Ala	Leu	Met	Gly				
	995				1000					1005						

<210> 4

<212> ADN

5 <213> TM-7 de especie Streptomyces

<220>

ES 2 426 640 T3

<221> CDS
<222> (544)..(1758)
<223> boxA

5 <220>
<221> CDS
<222> (1782)..(1970)
<223> boxB

10 <400> 4

tcgccgggcc	cggcgggtgtg	gaccgttcgc	ggaccagccg	ggcgaattcg	gggtcgtgca	60
tgacctcggg	gagcaggccg	cggagtatgt	ccgccgtgcg	aggcggccaa	cctggcggag	120
agtcgcccgt	gcgcgggtgat	gacatcgggt	cgcaggggcgc	cgggtgtcggg	caggctcggcg	180
tcggacagcc	ggtgggcccgc	gcaggcgtcg	acgacgagtt	cggcacggcc	gggccacctc	240
cggtacaggg	tggccttgcc	ggtaaggggcc	cgtgcggcca	cgcgctccat	cgtcagtecc	300
ggcgtagttc	gacctcggtc	agtttctctcg	agggtcgcgg	ccaggatggc	cctctccagt	360
tcctctctctc	ggccggcgag	ggtttttcga	tggtcgcggg	cgtcgggtcc	ggcgcgtccc	420
cgtgggttgg	aggcatgact	cccagccatt	tgtcagagcac	ccgttgtgag	cgtcgggtgg	480
gtaagcctag	ccttcggta	gagaactgac	cgttcttta	gcgtcagtg	catcgagga	540
ccg atg acc gag acc gtt acg acg ccc aca tca ggc gcc ccc gcc ttc						588
Met Thr Glu Thr Val Thr Thr Pro Thr Ser Gly Ala Pro Ala Phe						
1 5 10 15						
ccc agt gac cgc acc tgc ccc tac cac etc ccc gac cgg tac aac gac						636
Pro Ser Asp Arg Thr Cys Pro Tyr His Leu Pro Asp Arg Tyr Asn Asp						
20 25 30						
ctc cgg gac cgg gag ggt tgc ctg cag cgg gtc acc ctc tac gac ggc						684
Leu Arg Asp Arg Glu Gly Ser Leu Gln Arg Val Thr Leu Tyr Asp Gly						
35 40 45						
cgg cag gca tgg ctg gtg acc ggg tac gac acg gca cgc aag ctg ctg						732
Arg Gln Ala Trp Leu Val Thr Gly Tyr Asp Thr Ala Arg Lys Leu Leu						
50 55 60						
gcc gac ccc cgg ctc tgc tcc gac cgg aca cac gcc gac ttc ccc gcc						780
Ala Asp Pro Arg Leu Ser Ser Asp Arg Thr His Ala Asp Phe Pro Ala						
65 70 75						
acc tcc ggg cgg gtg gag agc tcc cgg gac cgc cgg ccg gcg ttc atc						828
Thr Ser Gly Arg Val Glu Ser Phe Arg Asp Arg Arg Pro Ala Phe Ile						
80 85 90 95						
agc ctg gac ccg ccc gag cac ggg ccg aaa cgg cgc atg acc atc agc						876
Ser Leu Asp Pro Pro Glu His Gly Pro Lys Arg Arg Met Thr Ile ser						
100 105 110						
gag ttc acc gtc cgg cgc atc aag ggc atg cgg gcc gac gtc gag cag						924
Glu Phe Thr Val Arg Arg Ile Lys Gly Met Arg Ala Asp Val Glu Gln						
115 120 125						
atc gtg cac ggc ttc ctg gac gag atg atc gca gcc gcc ccg ccc gcc						972
Ile Val His Gly Phe Leu Asp Glu Met Ile Ala Gly Gly Pro Pro Ala						
130 135 140						
gac ctg gtc agc cag ttc gcg ctg ccc gtc ccg tcc ctg gtg atc tgc						1020
Asp Leu Val Ser Gln Phe Ala Leu Pro Val Pro Ser Leu Val Ile Cys						
145 150 155						
cgt ctg ctc ggt gtg ccc tac gcg gac cac gac ttc ttc cag gac gcc						1068
Arg Leu Leu Gly Val Pro Tyr Ala Asp His Asp Phe Phe Gln Asp Ala						
160 165 170 175						
agc gca cgg ctg atc cag tcc ccg gac gcg ggt gcg cgt gcc gcc						1116
Ser Ala Arg Leu Ile Gln Ser Pro Asp Ala Ala Gly Ala Arg Ala Ala						
180 185 190						
cgg gac gac ctg gag agc tat ctg gcc gct ctg gtg gac agc ctg cga						1164
Arg Asp Asp Leu Glu Ser Tyr Leu Gly Ala Leu Val Asp Ser Leu Arg						
195 200 205						
ggc gag tcc cgg ccg gcc ctg ctg agc acg ctc gtc agg gag cag ctg						1212
Gly Glu Ser Arg Pro Gly Leu Leu Ser Thr Leu Val Arg Glu Gln Leu						
210 215 220						
gag aag gcc gcg atc gac cgg gag gag ctg gtg tgc acg gcg atc ctg						1260
Glu Lys Gly Ala Ile Asp Arg Glu Glu Leu Val Ser Thr Ala Ile Leu						
225 230 235						
ctg ctg gtc gcc gga cac gag acg acg gcg tgc atg acg tgc ctc agc						1308
Leu Leu Val Ala Gly His Glu Thr Thr Ala Ser Met Thr Ser Leu Ser						

```

240          245          250          255
gtc atc acc ctc ctc gaa cat ccc gac cag cac gcc gcg ttg cgc gcc      1356
Val Ile Thr Leu Leu Glu His Pro Asp Gln His Ala Ala Leu Arg Ala
260
gat ccg tcg ctg gtg ccc ggc gcg gtg gag gag ctg ctg cgc tat ctg      1404
Asp Pro Ser Leu Val Pro Gly Ala Val Glu Glu Leu Leu Arg Tyr Leu
275
gcc atc gcc gac atc gcc ggc ggg cgg att gcg acg gcg gac atc gag      1452
Ala Ile Ala Asp Ile Ala Gly Gly Arg Ile Ala Thr Ala Asp Ile Glu
290
atc gac ggg cag cgc atc cgg gcg ggg gag ggg gtc atc gtc acc aac      1500
Ile Asp Gly Gln Arg Ile Arg Ala Gly Glu Gly Val Ile Val Thr Asn
305
tcg atc gcc aac cgc gac ggc tcc gtc ttc gcc gac ccg gac gcc ttc      1548
Ser Ile Ala Asn Arg Asp Gly Ser Val Phe Ala Asp Pro Asp Ala Phe
320
gac gtg cgg cgc gag gcc cgc cac cac ctg gcg ttc ggc tac ggg gtg      1596
Asp Val Arg Arg Glu Ala Arg His His Leu Ala Phe Gly Tyr Gly Val
340
cat cag tgc ctc gcc cag aac ctg gcc cgc ctc gaa ctg gag gtc atc      1644
His Gln Cys Leu Gly Gln Asn Leu Ala Arg Leu Glu Leu Glu Val Ile
355
ctc acg gcg ctg ttc gag cgg ctg ccc ggt ctg cgg ctg gcg gtg ccg      1692
Leu Thr Ala Leu Phe Glu Arg Leu Pro Gly Leu Arg Leu Ala Val Pro
370
gtg gac cgg ctg acc ctg cgc ccg ggc acg acg atc cag ggc gtg aac      1740
Val Asp Arg Leu Thr Leu Arg Pro Gly Thr Thr Ile Gln Gly Val Asn
385
gaa ctc ccg gtc acc tgg tga ccgcggcgaa aggagcagcc atg cgt gtg acg      1793
Glu Leu Pro Val Thr Trp          Met Arg Val Thr
400
gcc gac cgg gag gtc tgc gtg gga gcg ggc ctg tgc gcc ttg acg gcg      1841
Ala Asp Arg Glu Val Cys Val Gly Ala Gly Leu Cys Ala Leu Thr Ala
410
ccg gag gtc ttc gac cag gac gac gac ggt gtg gtg acg gtg ctg gcc      1889
Pro Glu Val Phe Asp Gln Asp Asp Asp Gly Val Val Thr Val Leu Ala
430
gcg gaa ccc ggc gag gcc ggc cgt gcg gca ctc gaa gcc ggc gcg      1937
Ala Glu Pro Gly Glu Ala Gly Arg Ala Ala Ala Leu Glu Ala Gly Ala
445
ctg tgc ccg tcc ggc gcg gta cgc gtc gtc gag tag gggccgtgcg gggccg      1989
Leu Cys Pro Ser Gly Ala Val Arg Val Val Glu
460
tga      1992

```

<210> 5
 <211> 1860
 5 <212> ADN
 <213> 895-3 de Burkholderia cepacia

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (230)..(1327)
 <223> ratA

<400> 5

ES 2 426 640 T3

```

cgggcaacgg atgatcggc tcgctgga cggctggccc gacgtgatcg tgaacccccg      60
aaattcgtgt ggcgcagcgg cgcgcggatg acgctgtggg acgactgcat gtgctttccc      120
cgacctgttc gtgcgtgtcg agcgcacgc gtcggtgagc gtgcagtaca cgacgcttga      180
cggcgagctg catcggcgg acgcgctgtc gcctgatgtg tcggagctg atg cag cac      238
                                     Met Gln His
                                     1
gag atc gac cat ctc gac ggc aag ctg tct ttc gat cgc gcg gcg ggg      286
Glu Ile Asp His Leu Asp Gly Lys Leu Ser Phe Asp Arg Ala Ala Gly
5                                     10                                     15
ccg aat gcg gtc gtg cat cgc agc gtg ttc gac gcc gat cgc gca tcg      334
Pro Asn Ala Val Val His Arg Ser Val Phe Asp Ala Asp Arg Ala Ser
20                                     25                                     30                                     35
ttt gtc gcg cag gtc gac tac gcc ccg cat gtg ccc gac gtg aaa cgt      382
Phe Val Ala Gln Val Asp Tyr Ala Pro His Val Pro Asp Val Lys Arg

```

				40					45					50			
tcc	gca	ccg	gag	atc	att	cag	tct	gcc	gaa	gca	tcc	gca	tat	cca	ccg		430
Ser	Ala	Pro	Glu	Ile	Ile	Gln	Ser	Ala	Glu	Ala	Ser	Ala	Tyr	Pro	Pro		
			55						60				65				
ggc	gcc	gca	tac	atg	aat	gga	cgc	tcc	att	ccg	atc	gcc	gac	gca	gca		478
Gly	Ala	Ala	Tyr	Met	Asn	Gly	Arg	Phe	Ile	Pro	Ile	Ala	Asp	Ala	Arg		
			70						75				80				
gtg	tcc	gtg	ctc	gac	tgg	ggt	ttc	ctg	cat	tcc	gac	gtc	acc	tac	gac		526
Val	Ser	Val	Leu	Asp	Trp	Gly	Phe	Leu	His	Ser	Asp	Val	Thr	Tyr	Asp		
			85						90								
acc	gtg	cac	gtg	tgg	aac	ggc	cgc	tcc	tcc	cgc	ctc	gac	cgg	cac	atc		574
Thr	Val	His	Val	Trp	Asn	Gly	Arg	Phe	Phe	Arg	Leu	Asp	Arg	His	Ile		
100					105				110						115		
gca	gca	ttc	agg	cgc	tcc	ctg	gca	gca	ctg	gca	ctg	gac	gta	ccg	ttg		622
Ala	Arg	Phe	Arg	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Leu	Arg	Leu	Asp	Val	Pro	Leu		
					120				125					130			
ggc	gac	gac	gca	ctg	cgc	gac	atc	ctc	gtc	gaa	tgc	gtg	cgc	cgc	tcc		670
Gly	Asp	Asp	Ala	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	Val	Glu	Cys	Val	Arg	Arg	Ser		
			135						140					145			
ggc	ctg	cgc	aac	gca	tat	gtc	gaa	atg	ctg	tgc	acc	cgc	ggc	gta	tcc		718
Gly	Leu	Arg	Asn	Ala	Tyr	Val	Glu	Met	Leu	Cys	Thr	Arg	Gly	Val	Ser		
			150						155					160			
ccc	acc	ttc	agc	cgc	gac	ccg	cgc	gac	gca	gtg	aac	cag	tcc	atc	gca		766
Pro	Thr	Phe	Ser	Arg	Asp	Pro	Arg	Asp	Ala	Val	Asn	Gln	Phe	Ile	Ala		
					170				175								
tcc	gca	gtg	ccg	tac	ggc	tcc	gtc	gca	aac	gag	cgc	cag	ttg	cgc	gag		814
Phe	Ala	Val	Pro	Tyr	Gly	Ser	Val	Ala	Asn	Glu	Arg	Gln	Leu	Arg	Glu		
180					185				190						195		
ggc	ctg	cac	ctg	cat	ctg	atc	gac	gac	gtt	cga	cgc	att	ccg	ccc	gaa		862
Gly	Leu	His	Leu	His	Leu	Ile	Asp	Asp	Val	Arg	Arg	Ile	Pro	Pro	Glu		
					200				205						210		
tcc	gtc	gat	ccg	cag	atc	aag	aac	tac	cac	tgg	ctc	gac	ctt	gtc	gcc		910
Ser	Val	Asp	Pro	Gln	Ile	Lys	Asn	Tyr	His	Trp	Leu	Asp	Leu	Val	Ala		
					215				220						225		
ggc	ctg	ctg	aag	ggg	tat	gac	gca	ggg	gca	gag	tcc	gtc	gtg	ctg	aag		958
Gly	Leu	Leu	Lys	Gly	Tyr	Asp	Ala	Gly	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Leu	Lys		
					230				235						240		
tgc	acc	gac	ggc	agc	atc	gcc	gaa	ggg	ccc	ggg	tcc	aac	gtc	tcc	atc		1006
Cys	Thr	Asp	Gly	Ser	Ile	Ala	Glu	Gly	Pro	Gly	Phe	Asn	Val	Phe	Ile		
					245				250						255		
gtg	cgc	gac	ggc	cgg	ctt	cgg	acc	ccc	gag	cgc	ggc	gtg	ctg	cac	ggc		1054
Val	Arg	Asp	Gly	Arg	Leu	Arg	Thr	Pro	Glu	Arg	Gly	Val	Leu	His	Gly		
					260				270						275		
atc	acc	cgg	cag	acc	gtg	tcc	gag	ctg	gca	gca	tcc	atg	ggc	atc	gac		1102
Ile	Thr	Arg	Gln	Thr	Val	Phe	Glu	Leu	Ala	Ala	Ser	Met	Gly	Ile	Asp		
					280				285						290		
gca	cag	gcc	ggt	cgt	gtc	gac	gat	gca	caa	ctg	cgc	gaa	gca	gac	gag		1150
Ala	Gln	Ala	Gly	Arg	Val	Asp	Asp	Ala	Gln	Leu	Arg	Glu	Ala	Asp	Glu		
					295				300						305		
gtg	tcc	atc	acc	tcc	acc	gcc	ggc	ggg	atc	atg	ccc	gtc	acc	cgc	ctg		1198
Val	Phe	Ile	Thr	Ser	Thr	Ala	Gly	Gly	Ile	Met	Pro	Val	Thr	Arg	Leu		
					310				315						320		
aac	ggc	gca	ccg	gtc	ggc	gac	ggc	cgc	ccg	ggc	ctg	atg	acc	cgc	cgc		1246
Asn	Gly	Ala	Pro	Val	Gly	Asp	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Met	Thr	Arg	Arg		
					325				330						335		
ctg	tcc	gac	gca	tac	tgg	gca	aag	cac	gag	gat	ccg	gca	tgg	agc	ctg		1294
Leu	Phe	Asp	Ala	Tyr	Trp	Ala	Lys	His	Glu	Asp	Pro	Ala	Trp	Ser	Leu		
					340				350						355		
gca	gtc	gac	tac	gca	gcc	aac	tgc	gca	gcc	ggc	tga	tcc	ggc	ggc			1346
Ala	Val	Asp	Tyr	Ala	Ala	Asn	Cys	Ala	Ala	Gly							
					360				365								
gcaattcctt	acctcgtacg	taatcgaccg	cccgcgcgag	gcccggcgacg	atgacggcac												1406
gcgaatacga	aacacgcaac	gttcgcgacc	tccgtcccctc	gtcgacacaa	ggagcctcgc												1466
catgagcacc	gctcaatccg	cttcgtccgc	ctcgtccatt	cacgcccagacc	tgatcgaccg												1526
ctacttcgac	gcatggaacg	aaccgcagct	cgcgcgcccgc	cgcgcgctga	tccgatgagac												1586
ctacgcgagc	gacgcggcct	atcgcgatcc	gctgatggcc	ggcgacggcc	accgagggcat												1646
cgacgcgatg	atcgcggcgg	tgacggcgcg	cttcccgcgg	ttccgcttcc	gcccgcagac												1706
cgacgctcag	gcgctcggcc	agcacctcgc	gttctcgtgg	ggcctcgtgt	cgcccggcgg												1766
cgccggcagc	gtgaagggtt	cggacttcgg	cacggtcagc	gcattcggcc	gccttgcgac												1826
ggtcaccggt	ttcatcgacg	agatgccggc	cgccg														1860

ES 2 426 640 T3

<210> 6
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador A
 <400> 6
 10 catggatcct gaactgagtg aattgatatg caa 33
 <210> 7
 <211> 31
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador B
 20 <400> 7
 cccaagcttc taccccatca acgcctgtac c 31
 <210> 8
 <211> 53
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador C
 30 <400> 8
 gtaagatcta aataaggagg aataacatat ggcgctgacc accaccggca ccg 53
 <210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador D
 <400> 9
 tcaggatcct cggcacggag tgccgcgta 29
 45 <210> 10
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador E
 <400> 10
 55 taacatatga actcagtcgc agaaatttt ga 32
 <210> 11
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador F
 <400> 11
 65 cgaactagtg gtcacttgac catgcaaaaa ct 32

ES 2 426 640 T3

<210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador BP195F
 <400> 12
 10 ccgactagta ccgaaacgct gtaccccgag 30
 <210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador BP195R
 20 <400> 13
 cctggatcct catgagaacg tcaccggcag 30
 <210> 14
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador vdhF
 30 <400> 14
 accactagtg cgctgaccac caccggcacc g 31
 <210> 15
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador vdhR
 <400> 15
 gggagatctt caggcgctgc gcggcccat c 31
 45 <210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador boxBNCOF
 <400> 16
 55 cagccatggg tgtgacggcc gaccgggagg t 31
 <210> 17
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador boxBBamR
 <400> 17
 65 cacgcatcct actcgacgac gcgtaccgcg ccgga 35

ES 2 426 640 T3

```

5  <210> 18
    <211> 31
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <223> Cebador boxANdeF

10 <400> 18
    ggacatatga ccgagaccgt tacgacgccc a      31

    <210> 19
    <211> 32
    <212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <223> Cebador boxAXhoR

20 <400> 19
    tcgctcgagt caccaggtga ccgggagttc gt     32

    <210> 20
    <211> 30
25 <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
    <223> Cebador ExratF

30 <400> 20
    gcgctgcagg tgcccgcgt gaaacgttcg        30

    <210> 21
    <211> 29
35 <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <223> Cebador ExratR

40 <400> 20

    ttcgaattcg cgtgccgtca tcgtcgccg        29
45 <210> 22
    <211> 1488
    <212> ADN
    <213> K-12 de Escherichia coli

    <220>
50 <221> CDS
    <222> (1)..(1485)
    <223> tolC

    <400> 1

```

atg	caa	atg	aag	aaa	ttg	ctc	ccc	att	ctt	atc	ggc	ctg	agc	ctt	tct	48
Met	Gln	Met	Lys	Lys	Leu	Leu	Pro	Ile	Leu	Ile	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	
1				5				10						15		
ggg	ttc	agt	tcg	ttg	agc	cag	gcc	gag	aac	ctg	atg	caa	gtt	tat	cag	96
Gly	Phe	Ser	Ser	Leu	Ser	Gln	Ala	Glu	Asn	Leu	Met	Gln	Val	Tyr	Gln	
			20					25					30			
caa	gca	cgc	ctt	agt	aac	ccg	gaa	ttg	cgt	aag	tct	gcc	gcc	gat	cgt	144
Gln	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Glu	Leu	Arg	Lys	Ser	Ala	Ala	Asp	Arg	
		35					40					45				
gat	gct	gcc	ttt	gaa	aaa	att	aat	gaa	gcg	cgc	agt	cca	tta	ctg	cca	192
Asp	Ala	Ala	Phe	Glu	Lys	Ile	Asn	Glu	Ala	Arg	Ser	Pro	Leu	Leu	Pro	
	50					55					60					
cag	cta	ggt	tta	ggt	gca	gat	tac	acc	tat	agc	aac	ggc	tac	cgc	gac	240
Gln	Leu	Gly	Leu	Gly	Ala	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Ser	Asn	Gly	Tyr	Arg	Asp	
	65				70					75					80	
gcg	aac	ggc	atc	aac	tct	aac	gcg	acc	agt	gcg	tcc	ttg	cag	tta	act	288
Ala	Asn	Gly	Ile	Asn	Ser	Asn	Ala	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Gln	Leu	Thr	
				85				90						95		
caa	tcc	att	ttt	gat	atg	tcg	aaa	tgg	cgt	gcg	tta	acg	ctg	cag	gaa	336
Gln	Ser	Ile	Phe	Asp	Met	Ser	Lys	Trp	Arg	Ala	Leu	Thr	Leu	Gln	Glu	
			100					105					110			
aaa	gca	gca	ggg	att	cag	gac	gtc	acg	tat	cag	acc	gat	cag	caa	acc	384
Lys	Ala	Ala	Gly	Ile	Gln	Asp	Val	Thr	Tyr	Gln	Thr	Asp	Gln	Gln	Thr	
		115					120					125				
ttg	acc	ctc	aac	acc	gcg	acc	gct	tat	ttc	aac	gtg	ttg	aat	gct	att	432
Leu	Ile	Leu	Asn	Thr	Ala	Thr	Ala	Tyr	Phe	Asn	Val	Leu	Asn	Ala	Ile	
	130					135					140					
gac	ggt	ctt	tcc	tat	aca	cag	gca	caa	aaa	gaa	gcg	atc	tac	cgt	caa	480
Asp	Val	Leu	Ser	Tyr	Thr	Gln	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Tyr	Arg	Gln	
	145				150					155					160	
tta	gat	caa	acc	acc	caa	cgt	ttt	aac	gtg	ggc	ctg	gta	gcg	atc	acc	528
Leu	Asp	Gln	Thr	Thr	Gln	Arg	Phe	Asn	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Ile	Thr	
				165				170						175		
gac	gtg	cag	aac	gcc	cgc	gca	cag	tac	gat	acc	gtg	ctg	gcg	aac	gaa	576
Asp	Val	Gln	Asn	Ala	Arg	Ala	Gln	Tyr	Asp	Thr	Val	Leu	Ala	Asn	Glu	
			180					185					190			
gtg	acc	gca	cgt	aat	aac	ctt	gat	aac	gcg	gta	gag	cag	ctg	cgc	cag	624
Val	Thr	Ala	Arg	Asn	Asn	Leu	Asp	Asn	Ala	Val	Glu	Gln	Leu	Arg	Gln	
		195					200					205				
atc	acc	ggt	aac	tac	tat	ccg	gaa	ctg	gct	gcg	ctg	aat	gtc	gaa	aac	672
Ile	Thr	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Asn	Val	Glu	Asn	
	210					215					220					
ttt	aaa	acc	gac	aaa	cca	cag	ccg	ggt	aac	gcg	ctg	ctg	aaa	gaa	gcc	720
Phe	Lys	Thr	Asp	Lys	Pro	Gln	Pro	Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	
	225				230					235					240	
gaa	aaa	cgc	aac	ctg	tcg	ctg	tta	cag	gca	cgc	ttg	agc	cag	gac	ctg	768
Glu	Lys	Arg	Asn	Leu	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	
				245					250					255		

```

gcg cgc gag caa att cgc cag gcg cag gat ggt cac tta ccg act ctg      816
Ala Arg Glu Gln Ile Arg Gln Ala Gln Asp Gly His Leu Pro Thr Leu
260
gat tta acg gct tct acc ggg att tct gac acc tct tat agc ggt tcg      864
Asp Leu Thr Ala Ser Thr Gly Ile Ser Asp Thr Ser Tyr Ser Gly Ser
275
aaa acc cgt ggt gcc gct ggt acc cag tat gac gat agc aat atg ggc      912
Lys Thr Arg Gly Ala Ala Gly Thr Gln Tyr Asp Asp Ser Asn Met Gly
290
cag aac aaa gtt ggc ctg agc ttc tcg ctg ccg att tat cag ggc gga      960
Gln Asn Lys Val Gly Leu Ser Phe Ser Leu Pro Ile Tyr Gln Gly Gly
305
atg gtt aac tcg cag gtg aaa cag gca cag tac aac ttt gtc ggt gcc      1008
Met Val Asn Ser Gln Val Lys Gln Ala Gln Tyr Asn Phe Val Gly Ala
325
agc gag caa ctg gaa agt gcc cat cgt agc gtc gtg cag acc gtg cgt      1056
Ser Glu Gln Leu Glu Ser Ala His Arg Ser Val Val Gln Thr Val Arg
340
tcc tcc ttc aac aac att aat gca tct atc agt agc att aac gcc tac      1104
Ser Ser Phe Asn Asn Ile Asn Ala Ser Ile Ser Ser Ile Asn Ala Tyr
355
aaa caa gcc gta gtt tcc gct caa agc tca tta gac gcg atg gaa gcg      1152
Lys Gln Ala Val Val Ser Ala Gln Ser Ser Leu Asp Ala Met Glu Ala
370
ggc tac tcg gtc ggt acg cgt acc att gtt gat gtg ttg gat gcg acc      1200
Gly Tyr Ser Val Gly Thr Arg Thr Ile Val Asp Val Leu Asp Ala Thr
385
acc acg ttg tac aac gcc aag caa gag ctg gcg aat gcg cgt tat aac      1248
Thr Thr Leu Tyr Asn Ala Lys Gln Glu Leu Ala Asn Ala Arg Tyr Asn
405
tac ctg att aat cag ctg aat att aag tca gct ctg ggt acg ttg aac      1296
Tyr Leu Ile Asn Gln Leu Asn Ile Lys Ser Ala Leu Gly Thr Leu Asn
420
gag cag gat ctg ctg gca ctg aac aat gcg ctg agc aaa ccg gtt tcc      1344
Glu Gln Asp Leu Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ser Lys Pro Val Ser
435
act aat ccg gaa aac gtt gca ccg caa acg ccg gaa cag aat gct att      1392
Thr Asn Pro Glu Asn Val Ala Pro Gln Thr Pro Glu Gln Asn Ala Ile
450
gct gat ggt tat gcg cct gat agc ccg gca cca gtc gtt cag caa aca      1440
Ala Asp Gly Tyr Ala Pro Asp Ser Pro Ala Pro Val Val Gln Gln Thr
465
tcc gca cgc act acc acc agt aac ggt cat aac cct ttc cgt aac tga      1488
Ser Ala Arg Thr Thr Thr Ser Asn Gly His Asn Pro Phe Arg Asn
485

```

<210> 23

<211> 4878

<212> ADN

5 <213> K-12 de Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (329)..(1519)

10 <223> acrA

<220>

<221> CDS

<222> (1545)..(4691)

15 <223> acrB

<400> 23

ES 2 426 640 T3

```

agatctcact gaacaaatcc gacttgtctt taaaatgcca gtagattgca ccgcgcgtaa    60
cgccagctgc ttttgcaatc tcgccagcg aggtggatga taccccctgc tgtgagaaaa    120
gacgtagagc cacatcgagg atgtgttggc gcgtttcttg cgcttcttgt ttggtttttc    180
gtgccatatg ttcgtgaatt tacagpcgtt agatttacat acatttgtga atgtatgtac    240
catagcacga cgataatata aacgcagcaa tgggtttatt aacttttgac cattgaccaa    300
tttgaatcg gacactcgag gtttacat atg aac aaa aac aga ggg ttt acg    352
                               Met Asn Lys Asn Arg Gly Phe Thr
                               1                               5
cct ctg gcg gtc gtt ctg atg ctc tca ggc agc tta gcc cta aca gga    400

```

Pro	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Met	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	Leu	Thr	Gly	
10						15					20					
tgt	gac	gac	aaa	cag	gcc	caa	caa	ggt	ggc	cag	cag	atg	ccc	gcc	ggt	448
Cys	Asp	Asp	Lys	Gln	Ala	Gln	Gln	Gly	Gly	Gln	Gln	Met	Pro	Ala	Val	
25					30					35				40		
ggc	gta	gta	aca	gtc	aaa	act	gaa	cct	ctg	cag	atc	aca	acc	gag	ctt	496
Gly	Val	Val	Thr	Val	Lys	Thr	Glu	Pro	Leu	Gln	Ile	Thr	Thr	Glu	Leu	
				45					50					55		
ccg	ggt	cgc	acc	agt	gcc	tac	cgg	atc	gca	gaa	ggt	cgt	cct	caa	ggt	544
Pro	Gly	Arg	Thr	Ser	Ala	Tyr	Arg	Ile	Ala	Glu	Val	Arg	Pro	Gln	Val	
				60				65					70			
agc	ggg	att	atc	ctg	aag	cgt	aat	ttc	aaa	gaa	ggt	agc	gac	atc	gaa	592
Ser	Gly	Ile	Ile	Leu	Lys	Arg	Asn	Phe	Lys	Glu	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	
		75					80					85				
gca	ggt	gtc	tct	ctc	tat	cag	att	gat	cct	gcg	acc	tat	cag	gcg	aca	640
Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Tyr	Gln	Ile	Asp	Pro	Ala	Thr	Tyr	Gln	Ala	Thr	
	90					95					100					
tac	gac	agt	gcg	aaa	ggt	gat	ctg	gcg	aaa	gcc	cag	gct	gca	gcc	aat	688
Tyr	Asp	Ser	Ala	Lys	Gly	Asp	Leu	Ala	Lys	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	Asn	
105					110					115					120	
atc	gcg	caa	ttg	acg	gtg	aat	cgt	tat	cag	aaa	ctg	ctc	ggt	act	cag	736
Ile	Ala	Gln	Leu	Thr	Val	Asn	Arg	Tyr	Gln	Lys	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	
				125					130					135		
tac	atc	agt	aag	caa	gag	tac	gat	cag	gct	ctg	gct	gat	gcg	caa	cag	784
Tyr	Ile	Ser	Lys	Gln	Glu	Tyr	Asp	Gln	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Gln	Gln	
				140				145					150			
gcg	aat	gct	gcg	gta	act	gcg	gcg	aaa	gct	gcc	ggt	gaa	act	gcg	cgg	832
Ala	Asn	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Thr	Ala	Arg	
				155			160						165			
atc	aat	ctg	gct	tac	acc	aaa	gtc	acc	tct	ccg	att	agc	ggt	cgc	att	880
Ile	Asn	Leu	Ala	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Ser	Pro	Ile	Ser	Gly	Arg	Ile	
				170			175				180					
ggt	aag	tcg	aac	gtg	acg	gaa	ggc	gca	ttg	gta	cag	aac	ggt	cag	gcg	928
Gly	Lys	Ser	Asn	Val	Thr	Glu	Gly	Ala	Leu	Val	Gln	Asn	Gly	Gln	Ala	
185						190				195					200	
act	gcg	ctg	gca	acc	gtg	cag	caa	ctt	gat	ccg	atc	tac	gtt	gat	gtg	976
Thr	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	Gln	Gln	Leu	Asp	Pro	Ile	Tyr	Val	Asp	Val	
				205					210					215		
acc	cag	tcc	agc	aac	gac	ttc	ctg	cgc	ctg	aaa	cag	gaa	ctg	gcg	aat	1024
Thr	Gln	Ser	Ser	Asn	Asp	Phe	Leu	Arg	Leu	Lys	Gln	Glu	Leu	Ala	Asn	
				220				225					230			
ggc	acg	ctg	aaa	caa	gag	aac	ggc	aaa	gcc	aaa	gtg	tca	ctg	atc	acc	1072
Gly	Thr	Leu	Lys	Gln	Glu	Asn	Gly	Lys	Ala	Lys	Val	Ser	Leu	Ile	Thr	
				235			240						245			
agt	gac	ggc	att	aag	ttc	ccg	cag	gac	ggt	acg	ctg	gaa	ttc	tct	gac	1120
Ser	Asp	Gly	Ile	Lys	Phe	Pro	Gln	Asp	Gly	Thr	Leu	Glu	Phe	Ser	Asp	
				250			255				260					
gtt	acc	ggt	gat	cag	acc	act	ggg	tct	atc	acc	cta	cgc	gct	atc	ttc	1168
Val	Thr	Val	Asp	Gln	Thr	Thr	Gly	Ser	Ile	Thr	Leu	Arg	Ala	Ile	Phe	
				270					275						280	
ccg	aac	ccg	gat	cac	act	ctg	ctg	ccg	ggt	atg	ttc	gtg	cgc	gca	cgt	1216
Pro	Asn	Pro	Asp	His	Thr	Leu	Leu	Pro	Gly	Met	Phe	Val	Arg	Ala	Arg	
				285					290					295		
ctg	gaa	gaa	ggg	ctt	aat	cca	aac	gct	att	tta	gtc	ccg	caa	cag	ggc	1264
Leu	Glu	Glu	Gly	Leu	Asn	Pro	Asn	Ala	Ile	Leu	Val	Pro	Gln	Gln	Gly	
				300				305						310		
gta	acc	cgt	acg	ccg	cgt	ggc	gat	gcc	acc	gta	ctg	gta	ggt	ggc	gcg	1312
Val	Thr	Arg	Thr	Pro	Arg	Gly	Asp	Ala	Thr	Val	Leu	Val	Val	Gly	Ala	
				315			320						325			
gat	gac	aaa	gtg	gaa	acc	cgt	ccg	atc	ggt	gca	agc	cag	gct	att	ggc	1360
Asp	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Arg	Pro	Ile	Val	Ala	Ser	Gln	Ala	Ile	Gly	
				330			335					340				
gat	aag	tgg	ctg	gtg	aca	gaa	ggt	ctg	aaa	gca	ggc	gat	cgc	gta	gta	1408
Asp	Lys	Trp	Leu	Val	Thr	Glu	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Arg	Val	Val	
				345						350					360	
ata	agt	ggg	ctg	cag	aaa	gtg	cgt	cct	ggt	gtc	cag	gta	aaa	gca	caa	1456
Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Lys	Val	Arg	Pro	Gly	Val	Gln	Val	Lys	Ala	Gln	
				365					370					375		

gaa gtt acc gct gat aat aac cag caa gcc gca agc ggt gct cag cct	1504
Glu Val Thr Ala Asp Asn Asn Gln Gln Ala Ala Ser Gly Ala Gln Pro	
380 385 390	
gaa cag tcc aag tct taa cttaaacagg agccggttaag ac atg cct aat ttc	1556
Glu Gln Ser Lys Ser Met Pro Asn Phe	
395 400	
ttt atc gat cgc ccg att ttt gcg tgg gtg atc gcc att atc atc atg	1604
Phe Ile Asp Arg Pro Ile Phe Ala Trp Val Ile Ala Ile Ile Ile Met	
405 410 415	
ttg gca ggg ggg ctg gcg atc ctc aaa ctg ccg gtg gcg caa tat cct	1652
Leu Ala Gly Gly Leu Ala Ile Leu Lys Leu Pro Val Ala Gln Tyr Pro	
420 425 430	
acg att gca ccg ccg gca gta acg atc tcc gcc tcc tac ccc ggc gct	1700
Thr Ile Ala Pro Pro Ala Val Thr Ile Ser Ala Ser Tyr Pro Gly Ala	
435 440 445	
gat gcg aaa aca gtg cag gac acg gtg aca cag gtt atc gaa cag aat	1748
Asp Ala Lys Thr Val Gln Asp Thr Val Thr Gln Val Ile Glu Gln Asn	
450 455 460 465	
atg aac ggt atc gat aac ctg atg tac atg tcc tct aac agt gac tcc	1796
Met Asn Gly Ile Asp Asn Leu Met Tyr Met Ser Ser Asn Ser Asp Ser	
470 475 480 485	
acg ggt acc gtg cag atc acc ctg acc ttt gag tct ggt act gat gcg	1844
Thr Gly Thr Val Gln Ile Thr Leu Thr Phe Glu Ser Gly Thr Asp Ala	
485 490 495	
gat atc gcg cag gtt cag gtg cag aac ctg cag ctg gcg atg ccg	1892
Asp Ile Ala Gln Val Gln Val Gln Asn Lys Leu Gln Leu Ala Met Pro	
500 505 510	
ttg ctg ccg caa gaa gtt cag cag caa ggg gtg agc gtt gag aaa tca	1940
Leu Leu Pro Gln Glu Val Gln Gln Gln Gly Val Ser Val Glu Lys Ser	
515 520 525	
tcc agc agc ttc ctg atg gtt gtc ggc gtt atc aac acc gat ggc acc	1988
Ser Ser Ser Phe Leu Met Val Val Gly Val Ile Asn Thr Asp Gly Thr	
530 535 540 545	
atg acg cag gag gat atc tcc gac tac gtg gcg gcg aat atg aaa gat	2036
Met Thr Gln Glu Asp Ile Ser Asp Tyr Val Ala Ala Asn Met Lys Asp	
550 555 560 565	
gcc atc agc cgt acg tcg ggc gtg ggt gat gtt cag ttg ttc ggt tca	2084
Ala Ile Ser Arg Thr Ser Gly Val Gly Asp Val Gln Leu Phe Gly Ser	
570 575 580	
cag tac gcg atg cgt atc tgg atg aac ccg aat gag ctg aac aaa ttc	2132
Gln Tyr Ala Met Arg Ile Trp Met Asn Pro Asn Glu Leu Asn Lys Phe	
585 590 595	
cag cta acg ccg gtt gat gtc att acc gcc atc aaa gcg cag aac gcc	2180
Gln Leu Thr Pro Val Asp Val Ile Thr Ala Ile Lys Ala Gln Asn Ala	
595 600 605	
cag gtt gcg gcg ggt cag ctc ggt ggt acg ccg ccg gtg aaa ggc caa	2228
Gln Val Ala Ala Gly Gln Leu Gly Gly Thr Pro Pro Val Lys Gly Gln	
610 615 620 625	
cag ctt aac gcc tct att att gct cag acg cgt ctg acc tct act gaa	2276
Gln Leu Asn Ala Ser Ile Ile Ala Gln Thr Arg Leu Thr Ser Thr Glu	
630 635 640 645	
gag ttc ggc aaa atc ctg ctg aaa gtg aat cag gat ggt tcc cgc gtg	2324
Glu Phe Gly Lys Ile Leu Leu Lys Val Asn Gln Asp Gly Ser Arg Val	
645 650 655 660	
ctg ctg cgt gac gtc gcg aag att gag ctg ggt ggt gag aac tac gac	2372
Leu Leu Arg Asp Val Ala Lys Ile Glu Leu Gly Gly Glu Asn Tyr Asp	
660 665 670 675	
atc atc gca gag ttt aac ggc caa ccg gct tcc ggt ctg ggg atc aag	2420
Ile Ile Ala Glu Phe Asn Gly Gln Pro Ala Ser Gly Leu Gly Ile Lys	
675 680 685 690	
ctg gcg acc ggt gca aac gcg ctg gat acc gct gcg gca atc cgt gct	2468
Leu Ala Thr Gly Ala Asn Ala Leu Asp Thr Ala Ala Ala Ile Arg Ala	
690 695 700 705	
gaa ctg gcg aag atg gaa ccg ttc ttc ccg tcg ggt ctg aaa att gtt	2516
Glu Leu Ala Lys Met Glu Pro Phe Phe Pro Ser Gly Leu Lys Ile Val	
710 715 720 725	
tac cca tac gac acc ctg ccg ttc gtg aaa atc tct att cac gaa gtg	2564
Tyr Pro Tyr Asp Thr Thr Pro Phe Val Lys Ile Ser Ile His Glu Val	

ggt	aaa	acg	ctg	gtc	gaa	gcg	atc	atc	ctc	gtg	ttc	ctg	gtt	atg	tat	2612
Val	Lys	Thr	Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Ile	Leu	Val	Phe	Leu	Val	Met	Tyr	
		740					745					750				
ctg	ttc	ctg	cag	aac	ttc	cgc	gcg	acg	ttg	att	ccg	acc	att	gcc	gta	2660
Leu	Phe	Leu	Gln	Asn	Phe	Arg	Ala	Thr	Leu	Ile	Pro	Thr	Ile	Ala	Val	
	755					760					765					
ccg	gtg	gta	ttg	ctc	ggg	acc	ttt	gcc	gtc	ctt	gcc	gcc	ttt	ggc	ttc	2708
Pro	Val	Val	Leu	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Phe	Gly	Phe	
					775					780					785	
tcg	ata	aac	acg	cta	aca	atg	ttc	ggg	atg	gtg	ctc	gcc	atc	ggc	ctg	2756
Ser	Ile	Asn	Thr	Leu	Thr	Met	Phe	Gly	Met	Val	Leu	Ala	Ile	Gly	Leu	
				790				795						800		
ttg	gtg	gat	gac	gcc	atc	ggt	gtg	gta	gaa	aac	ggt	gag	cgt	ggt	atg	2804
Leu	Val	Asp	Asp	Ala	Ile	Val	Val	Val	Glu	Asn	Val	Glu	Arg	Val	Met	
			805					810					815			
gcg	gaa	gaa	ggt	ttg	ccg	cca	aaa	gaa	gct	acc	cgt	aag	tcg	atg	ggg	2852
Ala	Glu	Glu	Gly	Leu	Pro	Pro	Lys	Glu	Ala	Thr	Arg	Lys	Ser	Met	Gly	
		820					825				830					
cag	att	cag	ggc	gct	ctg	gtc	ggt	atc	gcg	atg	gta	ctg	tcg	gcg	gta	2900
Gln	Ile	Gln	Gly	Ala	Leu	Val	Gly	Ile	Ala	Met	Val	Leu	Ser	Ala	Val	
	835					840					845					
ttc	gta	ccg	atg	gcc	ttc	ttt	ggc	ggt	tct	act	ggt	gct	atc	tat	cgt	2948
Phe	Val	Pro	Met	Ala	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Ala	Ile	Tyr	Arg	
				855						860					865	
cag	ttc	tct	att	acc	att	ggt	tca	gca	atg	gcg	ctg	tcg	gta	ctg	gtg	2996
Gln	Phe	Ser	Ile	Thr	Ile	Val	Ser	Ala	Met	Ala	Leu	Ser	Val	Leu	Val	
				870				875					880			
gcg	ttg	atc	ctg	act	cca	gct	ctt	tgt	gcc	acc	atg	ctg	aaa	ccg	att	3044
Ala	Leu	Ile	Leu	Thr	Pro	Ala	Leu	Cys	Ala	Thr	Met	Leu	Lys	Pro	Ile	
			885					890					895			
gcc	aaa	ggc	gat	cac	ggg	gaa	ggt	aaa	aaa	ggc	ttc	ttc	ggc	tgg	ttt	3092
Ala	Lys	Gly	Asp	His	Gly	Glu	Gly	Lys	Lys	Gly	Phe	Phe	Gly	Trp	Phe	
		900					905					910				
aac	cgc	atg	ttc	gag	aag	agc	acg	cac	cac	tac	acc	gac	agc	gta	ggc	3140
Asn	Arg	Met	Phe	Glu	Lys	Ser	Thr	His	His	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	Gly	
		915				920					925					
ggt	att	ctg	cgc	agt	acg	ggg	cgt	tac	ctg	gtg	ctg	tat	ctg	atc	atc	3188
Gly	Ile	Leu	Arg	Ser	Thr	Gly	Arg	Tyr	Leu	Val	Leu	Tyr	Leu	Ile	Ile	
				935						940					945	
gtg	gtc	ggc	atg	gcc	tat	ctg	ttc	gtg	cgt	ctg	cca	agc	tcc	ttc	ttg	3236
Val	Val	Gly	Met	Ala	Tyr	Leu	Phe	Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Ser	Phe	Leu	
				950				955						960		
cca	gat	gag	gac	cag	ggc	gtg	ttt	atg	acc	atg	ggt	cag	ctg	cca	gca	3284
Pro	Asp	Glu	Asp	Gln	Gly	Val	Phe	Met	Thr	Met	Val	Gln	Leu	Pro	Ala	
			965					970				975				
ggt	gca	acg	cag	gaa	cgt	aca	cag	aaa	gtg	ctc	aat	gag	gta	acg	cat	3332
Gly	Ala	Thr	Gln	Glu	Arg	Thr	Gln	Lys	Val	Leu	Asn	Glu	Val	Thr	His	
		980					985					990				
tac	tat	ctg	acc	aaa	gaa	aag	aac	aac	ggt	gag	tcg	gtg	ttc	gcc	gtt	3380
Tyr	Tyr	Leu	Thr	Lys	Glu	Lys	Asn	Asn	Val	Glu	Ser	Val	Phe	Ala	Val	
		995				1000					1005					
aac	ggc	ttc	ggc	ttt	ggc	gga	cgt	ggt	cag	aat	acc	ggt	att	gcg	ttc	3428
Asn	Gly	Phe	Gly	Phe	Ala	Gly	Arg	Gly	Gln	Asn	Thr	Gly	Ile	Ala	Phe	
		1010			1015					1020					1025	
ggt	tcc	ttg	aag	gac	tgg	gcc	gat	cgt	ccg	ggc	gaa	gaa	aac	aaa	ggt	3476
Val	Ser	Leu	Lys	Asp	Trp	Ala	Asp	Arg	Pro	Gly	Glu	Glu	Asn	Lys	Val	
				1030				1035						1040		
gaa	gcg	att	acc	atg	cgt	gca	aca	cgc	gct	ttc	tcg	caa	atc	aaa	gat	3524
Glu	Ala	Ile	Thr	Met	Arg	Ala	Thr	Arg	Ala	Phe	Ser	Gln	Ile	Lys	Asp	
			1045					1050					1055			
gcp	atg	ggt	ttc	gcc	ttt	aac	ctg	ccc	gca	atc	gtg	gaa	ctg	ggt	act	3572
Ala	Met	Val	Phe	Ala	Phe	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Val	Glu	Leu	Gly	Thr	
		1060					1065					1070				
gca	acc	ggc	ttt	gac	ttt	gag	ctg	att	gac	cag	gct	ggc	ctt	ggt	cac	3620
Ala	Thr	Gly	Phe	Asp	Phe	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Ala	Gly	Leu	Gly	His	
		1075				1080					1085					
gaa	aaa	ctg	act	cag	gcg	cgt	aac	cag	ttg	ctt	gca	gaa	gca	gcg	aag	3668

Glu Lys Leu Thr Gln Ala Arg Asn Gln Leu Leu Ala Glu Ala Ala Lys
 1090 1095 1100 1105
 cac cct gat atg ttg acc agc gta cgt cca aac ggt ctg gaa gat acc 3716
 His Pro Asp Met Leu Thr Ser Val Arg Pro Asn Gly Leu Glu Asp Thr
 1110
 ccg cag ttt aag att gat atc gac cag gaa aaa gcg cag gcg ctg ggt 3764
 Pro Gln Phe Lys Ile Asp Ile Asp Gln Glu Lys Ala Gln Ala Leu Gly
 1125
 gtt tct atc aac gac att aac acc act ctg ggc gct gca tgg ggc ggc 3812
 Val Ser Ile Asn Asp Ile Asn Thr Thr Leu Gly Ala Ala Trp Gly Gly
 1140
 agc tat gtg aac gac ttt atc gac cgc ggt cgt gtg aag aaa gtt tat 3860
 Ser Tyr Val Asn Asp Phe Ile Asp Arg Gly Arg Val Lys Lys Val Tyr
 1155
 gtc atg tca gaa gcg aaa tac cgt atg ctg ccg gat gat atc ggc gac 3908
 Val Met Ser Glu Ala Lys Tyr Arg Met Leu Pro Asp Asp Ile Gly Asp
 1170
 tgg tat gtt cgt gct gct gat ggt cag atg gtg cca ttc tcg gcg ttc 3956
 Trp Tyr Val Arg Ala Ala Asp Gly Gln Met Val Pro Phe Ser Ala Phe
 1190
 tcc tct tct cgt tgg gag tac ggt tcg ccg cgt ctg gaa cgt tac aac 4004
 Ser Ser Ser Arg Trp Glu Tyr Gly Ser Pro Arg Leu Glu Arg Tyr Asn
 1205
 ggc ctg cca tcc atg gaa atc tta ggc cag gcg gca ccg ggt aaa agt 4052
 Gly Leu Pro Ser Met Glu Ile Leu Gly Gln Ala Ala Pro Gly Lys Ser
 1220
 acc ggt gaa gca atg gag ctg atg gaa caa ctg gcg agc aaa ctg cct 4100
 Thr Gly Glu Ala Met Glu Leu Met Glu Gln Leu Ala Ser Lys Leu Pro
 1235
 acc ggt gtt ggc tat gac tgg acg ggg atg tcc tat cag gaa cgt ctc 4148
 Thr Gly Val Gly Tyr Asp Trp Thr Gly Met Ser Tyr Gln Glu Arg Leu
 1250
 tcc ggc aac cag gca cct tca ctg tac gcg att tcg ttg att gtc gtg 4196
 Ser Gly Asn Gln Ala Pro Ser Leu Tyr Gln Ile Ser Leu Ile Val Val
 1270
 ttc ctg tgt ctg gcg gcg ctg tac gag agc tgg tcg att ccg ttc tcc 4244
 Phe Leu Cys Leu Ala Ala Leu Tyr Glu Ser Trp Ser Ile Pro Phe Ser
 1285
 gtt atg ctg gtc gtt ccg ctg ggg gtt atc ggt gcg ttg ctg gct gcc 4292
 Val Met Leu Val Val Pro Leu Gly Val Ile Gly Ala Leu Leu Ala Ala
 1300
 acc ttc cgt ggc ctg acc aat gac gtt tac ttc cag gta ggc ctg ctc 4340
 Thr Phe Arg Gly Leu Thr Asn Asp Val Tyr Phe Gln Val Gly Leu Leu
 1315
 aca acc att ggg ttg tcg gcg aag aac gcg atc ctt atc gtc gaa ttc 4388
 Thr Thr Ile Gly Leu Ser Ala Lys Asn Ala Ile Leu Ile Val Glu Phe
 1330
 gcc aaa gac ttg atg gat aaa gaa ggt aaa ggt ctg att gaa gcg acg 4436
 Ala Lys Asp Leu Met Asp Lys Glu Gly Lys Gly Leu Ile Glu Ala Thr
 1350
 ctt gat gcg gtg cgg atg cgt tta cgt ccg atc ctg atg acc tcg ctg 4484
 Leu Asp Ala Val Arg Met Arg Leu Arg Pro Ile Leu Met Thr Ser Leu
 1365
 gcg ttt atc ctc ggc gtt atg ccg ctg gtt atc agt act ggt gct ggt 4532
 Ala Phe Ile Leu Gly Val Met Pro Leu Val Ile Ser Thr Gly Ala Gly
 1380
 tcc ggc gcg cag aac gca gta ggt acc ggt gta atg ggc ggg atg gtg 4580
 Ser Gly Ala Gln Asn Ala Val Gly Thr Gly Val Met Gly Gly Met Val
 1395
 acc gca acg gta ctg gca atc ttc ttc gtt ccg gta ttc ttt gtg gtg 4628
 Thr Ala Thr Val Leu Ala Ile Phe Phe Val Pro Val Phe Phe Val Val
 1410
 gtt cgc cgc cgc ttt agc cgc aag aat gaa gat atc gag cac agc cat 4676
 Val Arg Arg Arg Phe Ser Arg Lys Asn Glu Asp Ile Glu His Ser His
 1430
 act gtc gat cat cat tga tacaacgtgt aatcactaag gccgcgtaag cggcctt 4731
 Thr Val Asp His His
 1445
 tttatgcata acctacgaac attaaggagt aattgaacca ccaactcagg atctcatagc 4791
 aaaaccagta ttaaccacgg ataaaattca taanaaatat tgattgttag ttaatttata 4851
 ttaagtagcg ctaatagatt taataat 4878

ES 2 426 640 T3

<210> 24
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador latSacF
 <400> 24
 10 ttcgagctcg tcccttcttg ccccgctcgc ccc 33
 <210> 25
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador latxhoR
 20 <400> 25
 gggctcagat caggcccggc gtgggccttc gacc 34
 <210> 26
 <211> 50
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ZARXhoF
 30 <400> 26
 cacctcgaga agaaggagat atagatatgc actaccgccg cctcggctct □@50
 35 <210> 27
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador ZARBamF
 <400> 27
 45 atgggatcca ttctcatcta cagatcaaga cttc 34
 <210> 28
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador rocGBamF
 <400> 28
 55 cttggatcca gaaggagata tagatatgac agcaaagcaa gtctcgaaag 50
 <210> 29
 <211> 33
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador rocGXbaR
 65 <400> 29
 ctttctagat tagaccatc cgcgaaacg cga 29

<210> 30
<211> 1482
<212> ADN
5 <213> IFO3084 de Flavobacterium lutescens

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(1479)
<223> lat

<400>
30

atg tcc ctt ctt gcc ccg ctc gcc ccg ctc cgc gcc cat gcc ggc acc Met Ser Leu Leu Ala Pro Leu Ala Pro Leu Arg Ala His Ala Gly Thr 1 5 10 15	48
cgc ctt acc cag gcc ctg tct gac ccg cag gtc gag cag ctg gcc gcc Arg Leu Thr Gln Gly Leu Ser Asp Pro Gln Val Glu Gln Leu Ala Ala 20 25 30	96
aac cac cct gac ctg cgc gcc gcc atc gac gcc gct gcc gac gaa tac Asn His Pro Asp Leu Arg Ala Ala Ile Asp Ala Ala Asp Glu Tyr 35 40 45	144
gcg cgc atc aaa ccg cag gcc gcc gca ttg ctg gac ctg gat gaa agc Ala Arg Ile Lys Pro Gln Ala Ala Ala Leu Leu Asp Leu Asp Glu Ser 50 55 60	192
gcg cag atc gcc gcc gtg cag gat ggc ttc gtc aac ttc tat gcc gat Ala Gln Ile Ala Ala Val Gln Asp Gly Phe Val Asn Phe Tyr Ala Asp 65 70 75 80	240
gat gcg gtg gtg ccc tat atc gcc ctg gcc gcc cgc ggg ccg tgg gtg Asp Ala Val Val Pro Tyr Ile Ala Leu Ala Ala Arg Gly Pro Trp Val 85 90 95	288
gtc agc ctg aag gcc gcg gtg ctg tat gac gcc gcc gcc tac ggc atg Val Ser Leu Lys Gly Ala Val Leu Tyr Asp Ala Gly Gly Tyr Gly Met 100 105 110	336
ctc gcc ttc gcc cat acc ccg gcc gat atc ctg gag gcc gtc gcc aag Leu Gly Phe Gly His Thr Pro Ala Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Lys 115 120 125	384
ccg cag gtg atg gcc aac atc atg act ccc tcg ctg gcc cag gcc cgc Pro Gln Val Met Ala Asn Ile Met Thr Pro Ser Leu Ala Gln Gly Arg 130 135 140	432
ttc att gcc gca atg cgc cgc gaa atc gcc cat acc cgc gcc gcc tgc Phe Ile Ala Ala Met Arg Arg Glu Ile Gly His Thr Arg Gly Gly Cys 145 150 155 160	480
ccg ttc tcg cac ttc atg tgc ctg aac tcc gcc tcc gaa gcc gtc ggg Pro Phe Ser His Phe Met Cys Leu Asn Ser Gly Ser Glu Ala Val Gly 165 170 175	528
ctg gcc gcg cgc atc gcc gac atc aac gcc aag ctg atg acc gac ccg Leu Ala Ala Arg Ile Ala Asp Ile Asn Ala Lys Leu Met Thr Asp Pro 180 185 190	576
ggc gcc cgg cat gcc gcc gcc acg atc aag cgc gtg gtg atc aag gcc Gly Ala Arg His Ala Gly Ala Thr Ile Lys Arg Val Val Ile Lys Gly 195 200 205	624
agt ttc cac gcc cgt acc gac cgt ccg gcc ctg tat tcc gat tcc acc Ser Phe His Gly Arg Thr Asp Arg Pro Ala Leu Tyr Ser Asp Ser Thr 210 215 220	672
cgc aag gcc tac gat gcg cat ctg gcc agc tac cgc gac gag cac agc Arg Lys Ala Tyr Asp Ala His Leu Ala Ser Tyr Arg Asp Glu His Ser 225 230 235 240	720
gtc att gcc atc gcc ccg tat gac cag cag gcc ctg cgc cag gtg ttt Val Ile Ala Ile Ala Pro Tyr Asp Gln Gln Ala Leu Arg Gln Val Phe 245 250 255	768
gcc gat gcc cag gcc aac cac tgg ttc atc gag gcg gtg ttc ctg gag Ala Asp Ala Gln Ala Asn His Trp Phe Ile Glu Ala Val Phe Leu Glu 260 265 270	816

ccg	gtg	atg	ggc	gaa	ggc	gac	ccg	ggc	cgt	gcg	gtg	ccg	gtg	gac	ttc	864
Pro	Val	Met	Gly	Glu	Gly	Asp	Pro	Gly	Arg	Ala	Val	Pro	Val	Asp	Phe	
		275					280					285				
tac	cgc	ctg	gcc	cgt	gag	ctg	acc	cgc	gaa	cac	ggc	agc	ctg	ctg	ctg	912
Tyr	Arg	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Thr	Arg	Glu	His	Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	
	290					295					300					
atc	gat	tcg	atc	cag	gcc	gcg	ctg	cgc	gtg	cac	ggc	acc	ctg	tcc	ttc	960
Ile	Asp	Ser	Ile	Gln	Ala	Ala	Leu	Arg	Val	His	Gly	Thr	Leu	Ser	Phe	
	305				310					315					320	
gtc	gac	tac	ccc	ggc	cac	cag	gag	ctg	gag	gca	ccg	gac	atg	gag	acc	1008
Val	Asp	Tyr	Pro	Gly	His	Gln	Glu	Leu	Glu	Ala	Pro	Asp	Met	Glu	Thr	
				325					330					335		
tac	tcc	aag	gcc	ctg	aac	ggc	gcc	cag	ttc	ccg	ctg	tcg	gta	gtg	gcc	1056
Tyr	Ser	Lys	Ala	Leu	Asn	Gly	Ala	Gln	Phe	Pro	Leu	Ser	Val	Val	Ala	
			340					345					350			
gtg	acc	gag	cac	gcc	gcc	gcg	ctg	tac	cgc	aag	ggc	gtg	tac	ggc	aac	1104
Val	Thr	Glu	His	Ala	Ala	Ala	Leu	Tyr	Arg	Lys	Gly	Val	Tyr	Gly	Asn	
		355					360					365				
acc	atg	acc	acc	aac	ccg	cgg	gcg	ctg	gac	gtg	gcc	tgc	gcc	acc	ctg	1152
Thr	Met	Thr	Thr	Asn	Pro	Arg	Ala	Leu	Asp	Val	Ala	Cys	Ala	Thr	Leu	
	370					375					380					
gca	cgc	ctg	gat	gag	ccg	gtc	cgc	aac	aat	atc	cgc	ctg	cgt	ggc	cag	1200
Ala	Arg	Leu	Asp	Glu	Pro	Val	Arg	Asn	Asn	Ile	Arg	Leu	Arg	Gly	Gln	
					390					395					400	
cag	gcg	atg	cag	aag	ctg	gaa	gca	ttg	aag	gaa	cgg	ctg	ggg	ggc	gcg	1248
Gln	Ala	Met	Gln	Lys	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Arg	Leu	Gly	Gly	Ala	
				405					410					415		
atc	acc	aag	gtg	cag	ggc	acc	ggc	ctg	ctg	ttc	tcc	tgc	gag	ctg	gcc	1296
Ile	Thr	Lys	Val	Gln	Gly	Thr	Gly	Leu	Leu	Phe	Ser	Cys	Glu	Leu	Ala	
			420					425					430			
ccg	cag	tac	aag	tgc	tac	ggg	gcc	ggc	tcc	acc	gag	gag	tgg	ctg	cgc	1344
Pro	Gln	Tyr	Lys	Cys	Tyr	Gly	Ala	Gly	Ser	Thr	Glu	Glu	Trp	Leu	Arg	
		435					440					445				
atg	cac	ggg	gtc	aat	gtg	atc	cac	ggc	ggc	gag	aat	tcg	ctg	cgc	ttc	1392
Met	His	Gly	Val	Asn	Val	Ile	His	Gly	Gly	Glu	Asn	Ser	Leu	Arg	Phe	
		450				455					460					
acc	ccg	cac	ttc	ggc	atg	gac	gag	gcc	gaa	ctg	gac	ctg	ctg	gtg	gag	1440
Thr	Pro	His	Phe	Gly	Met	Asp	Glu	Ala	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Val	Glu	
					470					475					480	
atg	gtc	ggg	cgt	gcg	ctg	gtc	gaa	ggc	cca	cgc	cgg	gcc	tga			1482
Met	Val	Gly	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Gly	Pro	Arg	Arg	Ala				
				485					490							

<210> 31

<211> 969

<212> ADN

5 <213> IF03084 de *Flavobacterium lutescens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(966)

10 <223> zar

<400> 31

atg	cac	tac	cgc	cgc	ctc	ggc	tct	acc	ggc	ctg	cag	ttg	tca	gcc	ctg	48
Met	His	Tyr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ser	Thr	Gly	Leu	Gln	Leu	Ser	Ala	Leu	
1				5					10					15		
tcc	ttt	ggt	gcc	tgg	gtc	acc	ttt	ggc	gcg	cag	atc	ggg	cgc	ggc	gag	96
Ser	Phe	Gly	Ala	Trp	Val	Thr	Phe	Gly	Ala	Gln	Ile	Gly	Arg	Gly	Glu	
			20					25					30			
gcg	cgc	aac	ctg	att	gcc	tgc	gcc	tgg	gac	aac	ggg	atc	aat	ttc	ttt	144
Ala	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Cys	Ala	Trp	Asp	Asn	Gly	Ile	Asn	Phe	Phe	
		35					40					45				
gac	aac	gcc	gaa	ggc	tat	gcg	cgc	ggc	gag	gcc	gaa	gcg	gtg	atg	ggc	192
Asp	Asn	Ala	Glu	Gly	Tyr	Ala	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Ala	Val	Met	Gly	
	50					55					60					
gat	gtg	atc	gct	gaa	ctg	cgc	ctg	cca	cgg	gat	ggt	ttc	tgc	gtt	tcc	240
Asp	Val	Ile	Ala	Glu	Leu	Arg	Leu	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe	Cys	Val	Ser	
					70					75					80	
agc	aag	ggt	ttt	ttc	ggt	tcg	gcc	agc	gag	ccc	ttg	ccg	acc	cag	cgc	288
Ser	Lys	Val	Phe	Phe	Gly	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Leu	Pro	Thr	Gln	Arg	
				85					90					95		
ggg	ctg	tcg	cgc	aag	cat	gta	ctc	gat	gcc	tgc	cat	ggc	gca	ctg	cgc	336
Gly	Leu	Ser	Arg	Lys	His	Val	Leu	Asp	Ala	Cys	His	Gly	Ala	Leu	Arg	
			100					105					110			
cgg	ctg	cgg	gtg	gac	tac	ctg	gac	ctg	tac	ttc	tgc	cat	cgt	ccc	gat	384
Arg	Leu	Arg	Val	Asp	Tyr	Leu	Asp	Leu	Tyr	Phe	Cys	His	Arg	Pro	Asp	
		115					120					125				
ccg	cag	acc	ccg	att	gcc	gag	acc	gtg	cat	gcg	atg	aac	ctg	ttg	gtc	432
Pro	Gln	Thr	Pro	Ile	Ala	Glu	Thr	Val	His	Ala	Met	Asn	Leu	Leu	Val	
	130					135					140					
gag	cag	ggc	aag	gtg	ctg	tat	tgg	ggc	acc	tcg	cag	tgg	tcg	gac	gcg	480
Glu	Gln	Gly	Lys	Val	Leu	Tyr	Trp	Gly	Thr	Ser	Gln	Trp	Ser	Ala	Ala	
					150					155					160	
cag	atc	agc	gaa	gcc	atc	gcc	att	gcc	gat	gcg	cgt	ggc	tgg	cag	cgt	528
Gln	Ile	Ser	Glu	Ala	Ile	Ala	Ile	Ala	Asp	Ala	Arg	Gly	Trp	Gln	Arg	
				165					170					175		
ccg	gcc	atg	gag	cag	ccc	cag	tac	agc	ctg	ctc	gaa	cgt	gac	cgt	gtc	576
Pro	Ala	Met	Glu	Gln	Pro	Gln	Tyr	Ser	Leu	Leu	Glu	Arg	Asp	Arg	Val	
			180					185					190			
gag	cag	gaa	ctg	gcg	ccg	ctg	tgc	gcg	cag	ggg	ctg	ggc	acc	acc	acc	624
Glu	Gln	Glu	Leu	Ala	Pro	Leu	Cys	Ala	Gln	Gly	Leu	Gly	Thr	Thr	Thr	
		195					200					205				
tgg	tca	cca	ctg	gcc	agc	ggc	ctg	ctg	acg	ggc	aag	tac	aac	gat	ggc	672
Trp	Ser	Pro	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Leu	Thr	Gly	Lys	Tyr	Asn	Asp	Gly	
	210					215					220					
gtg	ccc	gcc	ggc	tcg	cgc	ctg	gac	cag	ccc	gag	ttg	ggg	tgg	ctg	cag	720
Val	Pro	Ala	Gly	Ser	Arg	Leu	Asp	Gln	Pro	Glu	Leu	Gly	Trp	Leu	Gln	
	225				230					235					240	
cac	gca	cag	ctg	gaa	gat	ccg	ggc	cgt	ctg	cac	agg	gtc	cgc	gcg	ttc	768
His	Ala	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Gly	Arg	Leu	His	Arg	Val	Arg	Ala	Phe	
				245					250					255		
acg	gcc	ctg	gcc	gaa	gaa	ctg	gcg	gtc	gta	ccg	gcg	cag	ttg	gcc	atc	816
Thr	Ala	Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Ala	Val	Val	Pro	Ala	Gln	Leu	Ala	Ile	
			260					265					270			
gcc	tgg	tgc	ccg	cgc	aac	cgg	cat	gta	tcc	agc	gtg	atc	ctg	ggg	gcc	864
Ala	Trp	Cys	Pro	Arg	Asn	Arg	His	Val	Ser	Ser	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	
		275					280					285				

ES 2 426 640 T3

agc cgg gtg gcc cag ctg gaa cag aac ctg gcc gcg ctg gag gtt gcc 912
 ser Arg Val Ala Gln Leu Glu Gln Asn Leu Ala Ala Leu Glu Val Ala
 290 295 300

gag cgg ctg gac gca tcg gcc tgg aca gcg gtg gag gcg atc ttc ccg 960
 Glu Arg Leu Asp Ala Ser Ala Trp Thr Ala Val Glu Ala Ile Phe Pro
 305 310 315 320

cgc ggg tga 969
 Arg Gly

- <210> 32
- <211> 1275
- 5 <212> ADN
- <213> ATCC23857 de la cepa 168 de Bacillus subtilis

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(1272)
- <223> rocG

<400> 32

atg	tca	gca	aag	caa	gtc	tcg	aaa	gat	gaa	gaa	aaa	gaa	gct	ctt	aac	48
Met	Ser	Ala	Lys	Gln	Val	Ser	Lys	Asp	Glu	Glu	Lys	Glu	Ala	Leu	Asn	
1				5					10					15		
tta	ttt	ctg	tct	acc	caa	aca	atc	att	aag	gaa	gcc	ctt	cgg	aag	ctg	96
Leu	Phe	Leu	Ser	Thr	Gln	Thr	Ile	Ile	Lys	Glu	Ala	Leu	Arg	Lys	Leu	
			20					25					30			
ggt	tat	ccg	gga	gat	atg	tat	gaa	ctc	atg	aaa	gag	ccg	cag	aga	atg	144
Gly	Tyr	Pro	Gly	Asp	Met	Tyr	Glu	Leu	Met	Lys	Glu	Pro	Gln	Arg	Met	
		35					40					45				
ctc	act	gtc	cgc	att	ccg	gtc	aaa	atg	gac	aat	ggg	agc	gtc	aaa	gtg	192
Leu	Thr	Val	Arg	Ile	Pro	Val	Lys	Met	Asp	Asn	Gly	Ser	Val	Lys	Val	
	50					55					60					
ttc	aca	ggc	tac	cgg	tca	cag	cac	aat	gat	gct	gtc	ggt	ccg	aca	aag	240
Phe	Thr	Gly	Tyr	Arg	Ser	Gln	His	Asn	Asp	Ala	Val	Gly	Pro	Thr	Lys	
65					70				75						80	
ggg	ggc	ggt	cgc	ttc	cat	cca	gaa	ggt	aat	gaa	gag	gaa	gta	aag	gca	288
Gly	Gly	Val	Arg	Phe	His	Pro	Glu	Val	Asn	Glu	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	
				85					90					95		
tta	tcc	att	tgg	atg	acg	ctc	aaa	tgc	ggg	att	gcc	aat	ctt	cct	tac	336
Leu	Ser	Ile	Trp	Met	Thr	Leu	Lys	Cys	Gly	Ile	Ala	Asn	Leu	Pro	Tyr	
			100					105					110			
ggc	ggc	ggg	aag	ggc	ggt	att	att	tgt	gat	ccg	cgg	aca	atg	tca	ttt	384
Gly	Gly	Gly	Lys	Gly	Gly	Ile	Ile	Cys	Asp	Pro	Arg	Thr	Met	Ser	Phe	
		115					120					125				
gga	gaa	ctg	gaa	agg	ctg	agc	agg	ggg	tat	gtc	cgt	gcc	atc	agc	cag	432
Gly	Glu	Leu	Glu	Arg	Leu	Ser	Arg	Gly	Tyr	Val	Arg	Ala	Ile	Ser	Gln	
	130					135					140					
atc	gtc	ggt	ccg	aca	aag	gat	att	cca	gct	ccc	gat	gtg	tac	acc	aat	480
Ile	Val	Gly	Pro	Thr	Lys	Asp	Ile	Pro	Ala	Pro	Asp	Val	Tyr	Thr	Asn	
					150				155						160	
tcg	cag	att	atg	ggc	tgg	atg	atg	gat	gag	tac	agc	cgg	ctg	cgg	gaa	528
Ser	Gln	Ile	Met	Ala	Trp	Met	Met	Asp	Glu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Arg	Glu	
				165				170					175			
ttc	gat	tct	ccg	ggc	ttt	att	aca	ggt	aaa	ccg	ctt	ggt	ttg	gga	gga	576
Phe	Asp	Ser	Pro	Gly	Phe	Ile	Thr	Gly	Lys	Pro	Leu	Val	Leu	Gly	Gly	
			180					185					190			

tcg Ser	caa Gln	gga Gly 195	cgg Arg	gaa Glu	aca Thr	gcg Ala	acg Thr 200	gca Ala	cag Gln	ggc Gly	gtc Val	acg Thr 205	att Ile	tgt Cys	att Ile	624
gaa Glu	gag Glu 210	gcg Ala	gtg Val	aag Lys	aaa Lys	aaa Lys 215	ggg Gly	atc Ile	aag Lys	ctg Leu	caa Gln 220	aac Asn	gcg Ala	cgc Arg	atc Ile	672
atc Ile 225	ata Ile	cag Gln	ggc Gly	ttt Phe	gga Gly 230	aac Asn	gcg Ala	ggt Gly	agc Ser	ttc Phe 235	ctg Leu	gcc Ala	aaa Lys	ttc Phe	atg Met 240	720
cac His	gat Asp	gcg Ala	ggc Gly	gcg Ala 245	aag Lys	gtg Val	atc Ile	ggg Gly	att Ile 250	tct Ser	gat Asp	gcc Ala	aat Asn	ggc Gly 255	ggg Gly	768
ctc Leu	tac Tyr	aac Asn	cca Pro 260	gac Asp	ggc Gly	ctt Leu	gat Asp	atc Ile 265	cct Pro	tat Tyr	ttg Leu	ctc Leu	gat Asp 270	aaa Lys	cgg Arg	816
gac Asp	agc Ser	ttt Phe 275	ggt Gly	atg Met	gtc Val	acc Thr	aat Asn 280	tta Leu	ttt Phe	act Thr	gac Asp	gtc Val 285	atc Ile	aca Thr	aat Asn	864
gag Glu	gag Glu 290	ctg Leu	ctt Leu	gaa Glu	aag Lys	gat Asp 295	tgc Cys	gat Asp	att Ile	tta Leu	gtg Val 300	cct Pro	gcc Ala	gcg Ala	atc Ile	912
tcc Ser 305	aat Asn	caa Gln	atc Ile	aca Thr	gcc Ala 310	aaa Lys	aac Asn	gca Ala	cat His	aac Asn 315	att Ile	cag Gln	gcg Ala	tca Ser	atc Ile 320	960
gtc Val	gtt Val	gaa Glu	cgg Arg	gcg Ala 325	aac Asn	ggc Gly	ccg Pro	aca Thr	acc Thr 330	att Ile	gat Asp	gcc Ala	act Thr	aag Lys 335	atc Ile	1008
ctg Leu	aat Asn	gaa Glu	aga Arg 340	ggc Gly	gtg Val	ctg Leu	ctt Leu	gtg Val 345	ccg Pro	gat Asp	atc Ile	cta Leu	gcg Ala 350	agt Ser	gcc Ala	1056
ggc Gly	ggc Gly	gtc Val 355	acg Thr	ggt Val	tct Ser	tat Tyr	ttt Phe 360	gaa Glu	tgg Trp	gtg Val	caa Gln	aac Asn 365	aac Asn	caa Gln	gga Gly	1104
tat Tyr 370	tat Tyr	tgg Trp	tcg Ser	gaa Glu	gaa Glu	gag Glu 375	gtt Val	gca Ala	gaa Glu	aaa Lys	ctg Leu 380	aga Arg	agc Ser	gtc Val	atg Met	1152
gtc Val 385	agc Ser	tcg Ser	ttc Phe	gaa Glu	aca Thr 390	att Ile	tat Tyr	caa Gln	aca Thr	gcg Ala 395	gca Ala	aca Thr	cat His	aaa Lys	gtg Val 400	1200
gat Asp	atg Met	cgt Arg	ttg Leu	gcg Ala 405	gct Ala	tac Tyr	atg Met	acg Thr	ggc Gly 410	atc Ile	aga Arg	aaa Lys	tcg Ser	gca Ala 415	gaa Glu	1248
gca Ala	tcg Ser	cgt Arg	ttc Phe 420	cgc Arg	gga Gly	tgg Trp	gtc Val	taa 425								1275

REIVINDICACIONES

- 5 1. Transformante que se puede obtener por introducción de un gen originado a partir de un organismo xerogénico que codifica cualquier enzima seleccionada del grupo que consiste en oxidorreductasa y transferasa en *E. coli* que es defectuoso en cualquier gen de los genes que codifican la proteína de eflujo multifármaco seleccionado del grupo que consiste en *toIC* y *acrAB*.
- 10 2. Transformante según la reivindicación 1, donde el gen originado a partir de un organismo xerogénico es un gen que codifica una enzima de citocromo P-450 o una aminotransferasa.
3. Transformante según la reivindicación 1, donde el gen originado a partir de un organismo xerogénico es un gen que codifica una enzima de citocromo P-450.
- 15 4. Método de conversión microbiana que utiliza el transformante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Método de conversión microbiana según la reivindicación 4, **caracterizado por el hecho de que** realiza monooxigenación a un compuesto de sustrato.
- 20 6. Método según la reivindicación 5, donde el compuesto de sustrato se selecciona del grupo que consiste en vitamina D₃, 4-colesten-3-ona y compactina.