

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 014**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2013 PCT/DE2013/000683**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14090208**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2013 E 13821429 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2931918**

54 Título: **Procedimiento para la identificación de una célula con una concentración intracelular, aumentada en comparación con la de su tipo salvaje, de un determinado metabolito, consiguiéndose por recombinación la modificación de la célula, así como un procedimiento para la producción de una célula productora modificada genéticamente con respecto a su tipo salvaje, con producción optimizada de un determinado metabolito, un procedimiento para la preparación de este metabolito, así como ácidos nucleicos apropiados para ello**

30 Prioridad:
14.12.2012 DE 102012024435

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2017

73 Titular/es:
**FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH (100.0%)
52425 Jülich, DE**

72 Inventor/es:
**BINDER, STEPHAN;
EGGELING, LOTHAR y
BOTT, MICHAEL**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 643 014 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

Procedimiento para la identificación de una célula con una concentración intracelular, aumentada en comparación con la de su tipo salvaje, de un determinado metabolito, consiguiéndose por recombinación la modificación de la célula, así como un procedimiento para la producción de una célula productora modificada genéticamente con respecto a su tipo salvaje, con producción optimizada de un determinado metabolito, un procedimiento para la preparación de este metabolito, así como ácidos nucleicos apropiados para ello

El invento se refiere a un procedimiento para la identificación de una célula con una concentración intracelular, aumentada con respecto a la de su tipo salvaje, de un determinado metabolito, consiguiéndose por recombinación la modificación de la célula, así como a un procedimiento para la producción de una célula productora modificada genéticamente con respecto a su tipo salvaje, con producción optimizada de un determinado metabolito, a un procedimiento para la preparación de este metabolito, así como a ácidos nucleicos apropiados para ello.

Se usan microorganismos desde varias décadas a gran escala técnica para la producción de moléculas de bajo peso molecular. Son moléculas de bajo peso molecular por ejemplo unos metabolitos bacterianos naturales tales como aminoácidos (documentos de patente europea EP 1070132 B1 y de solicitud de patente internacional WO 2008/006680 A8), nucleósidos y nucleótidos (documentos EP 2097512 C1 y de patente canadiense CA 2297613 C1), ácidos grasos (documentos WO 2009/071878 C1 y WO 2011/064393 C1), vitaminas (documento EP 0668359 C1), ácidos orgánicos (documentos EP 0450491 B1 y EP 0366922 B1) o azúcares (documentos EP 0861902 C1 y de patente los EE.UU. US 3642575 A). Son moléculas de bajo peso molecular producidas por bacterias también aquellas moléculas, que se forman por expresión de genes heterólogos, que proceden por ejemplo de plantas. Son de este tipo ciertas sustancias activas vegetales. A ellas pertenecen por ejemplo taxol (documentos WO 1996/032490 C1 y WO 1993/021338 C1), artemisinina (documento WO 2009/088404 C1), y otras moléculas, que pertenecen a las clases de los isoprenoides, fenilpropanoides o alcaloides (Marienhagen J, Bott M, 2012, J Biotechnol., doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.001). Generalmente se pueden obtener, junto a moléculas, o compuestos precursores de moléculas de origen vegetal, también aquellas moléculas con microorganismos que tienen interés económico. A ellas pertenecen por ejemplo el ácido hidroxibutírico para la preparación de metacrilatos (documento de solicitud de patente PCT/EP2007/055394), diaminas para la preparación de materiales sintéticos (documento de patente japonesa JP 2009-284905 A), o también alcoholes para la utilización como agente de expansión (documentos WO 2011/069105 C2 y WO 2008/137406 C1).

Como microorganismos para la producción de moléculas de bajo peso molecular son apropiadas bacterias gram-negativas, bacterias gram-positivas y levaduras. Apropriadas bacterias son por ejemplo especies de *Escherichia* pertenecientes al género *Enterobacterias* tales como *Escherichia coli*, o especies de *Bacillus* pertenecientes al género *Firmicutes* tales como *Bacillus subtilis*, o especies de *Lactococcus* pertenecientes al género *Firmicutes* tales como *Lactococcus lactis* o especies de *Lactobacillus* tales como *Lactobacillus casei*, o especies de *Saccharomyces* pertenecientes al género *Ascomycetes* tales como *Saccharomyces cerevisiae*, o especies de *Yarrowia* tales como *Yarrowia lipolytica*, o especies de *Corynebacterium* pertenecientes al género *Corynebacterium*.

Entre las *Corinebacterias* se prefieren *Corynebacterium efficiens* (DSM44549), *Corynebacterium thermoaminogenes* (FERM BP-1539) y *Corynebacterium ammoniagenes* (ATCC6871), pero especialmente *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032). Algunas especies de *Corynebacterium glutamicum* son conocidas también por otro nombre correspondientemente al estado de la técnica. Así, por ejemplo, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870, *Corynebacterium lilium* DSM20137, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020 y *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC15354.

Con el fin de conseguir la formación y la producción de las moléculas de bajo peso molecular, se expresan o expresan de un modo intensificado genes propios del microorganismo, o genes homólogos o genes heterólogos de la ruta de síntesis de las moléculas de bajo peso molecular, o se aumenta la estabilidad de su ARNm. Para esto se pueden introducir los genes en plásmidos o vectores existentes en la célula, o ellos se pueden presentar en episomas, o se pueden integrar en el cromosoma. También los genes codificados cromosomalmente propios de la célula se pueden aumentar en su expresión. Esto se consigue por ejemplo mediante apropiadas mutaciones en el cromosoma en la zona del promotor. Se pueden introducir en el cromosoma también otras mutaciones, que conducen al aumento del producto, que influyen por ejemplo sobre la estabilidad del ARNm, o la estabilidad osmótica, sobre la resistencia frente a fluctuaciones del pH, o también genes, cuya función no es conocida, pero que repercuten favorablemente sobre la formación del producto. También se incorporan en el cromosoma genes homólogos o genes heterólogos o ellos se incorporan de tal manera que se presentan en el cromosoma en múltiples copias.

La deliberada incorporación de las mutaciones o de los genes en el genoma exige la construcción un plásmido, que se produce mediante recombinación in vitro de secuencias de ADN mediando aprovechamiento de endonucleasas de restricción y ligasas de ADN. Todo el proceso de introducir deliberadamente mutaciones cromosomales comprende además las siguientes etapas, de conseguir in vivo el intercambio, llevar el ensayo a un intercambio

exitoso, y finalmente llevar el ensayo a una aumentada formación del producto. Esto exige una pluralidad de etapas, A1 - A8, que se citan esquemáticamente en la Figura 1 (a la izquierda). Esta metodología se aplica a muchas bacterias, que se usan para la producción de pequeñas moléculas. Son ejemplos de ellas *Corynebacterium glutamicum* (Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Gene. 22 de Julio de 1994;145(1):69-73), o *Pseudomonas aeruginosa* (Allelic exchange in *Pseudomonas aeruginosa* using novel ColE1-type vectors and a family of cassettes containing a portable oriT and the counter-selectable *Bacillus subtilis* sacB marker. Schweizer HP. Mol Microbiol. May 1992;6(9):1195-204), o *Bacillus subtilis* (Construction of a modular plasmid family for chromosomal integration in *Bacillus subtilis*. Gimpel M, Brantl S. J Microbiol. Methods. Nov 2012;91(2):312-7), o Clostridios (Novel system for efficient isolation of clostridium double-crossover allelic exchange mutants enabling markerless chromosomal gene deletions and DNA integration. Al-Hinai MA, Fast AG, Papoutsakis ET. Appl. Environ Microbiol. Nov. de 2012;78(22):8112-21).

La deliberada introducción de mutaciones y genes en el cromosoma exige la recombinación de secuencias de ADN mediando uso de endonucleasas de restricción y ligasas de ADN para la preparación de un plásmido (Figura 1, A1). En el caso de los plásmidos necesarios para esto se trata de unos plásmidos que no se replican en la deseada productora en apropiadas condiciones. Después de la incorporación del plásmido en el microorganismo mediante electroporación, transformación química o balística (Figura 1, A2), se efectúa la integración en el cromosoma. Se selecciona en cuanto a integración mediante la resistencia mediada por un vector (Figura 1, A3). Apropriados plásmidos son por ejemplo pBRH1 (WO2003076452C2) o pWV01(US6025190), que ya no se pueden replicar in *Azotobacter* o respectivamente *Bacillus* después de una transformación (Figura 1, A2) mediante elevación de la temperatura en la célula, de tal manera que se efectúa en células resistentes la incorporación del vector en el cromosoma. El plásmido pK19mobsacB no puede replicarse de antemano en *Corinebacterias*, tales como *C. glutamicum*, de tal manera que en presencia de kanamicina se seleccionan solamente unos clones, en los que la integración del vector en el cromosoma se efectúa mediante recombinación homóloga (Schäfer y colaboradores, Gene 145, 69-73 (1994) (Figura 1, A3). Estos plásmidos que no se replican sirven como un vector, para mutar genes de manera dirigida en el cromosoma, mutar secuencias de promotores, suprimir secuencias, o intercambiar secuencias, o introducir nuevos genes en el cromosoma. Este procedimiento es costoso, puesto que los plásmidos se deben de construir individualmente in vitro. Él es además costoso, puesto que a través de apropiados procedimientos de selección, tales como selección en cuanto a resistencia a antibióticos o la reseñada elevación de la temperatura, se da lugar en primer término a la incorporación del plásmido, conjuntamente con las secuencias a intercambiar, en el cromosoma, y en una siguiente etapa se consigue de nuevo la pérdida del plásmido desde el cromosoma (Figura 1, A4). Mediante subsiguientes ensayos, usualmente amplificaciones por PCR, se puede comprobar entonces por primera vez si las secuencias a intercambiar han permanecido realmente en el cromosoma tal como se desea (Figura 1, A5). De esta manera se construye un clon individual, que seguidamente se cultiva (Figura 1, A6), cuyo producto se cuantifica (Figura 1, A7), y de esta manera eventualmente se obtiene una mejorada productora (Figura 1, A8). Esta técnica de la construcción de plásmidos y de la recombinación homóloga para la obtención de una productora microbiana se usa muchas veces, tal como por ejemplo para conseguir intercambios de alelos o supresiones en *C. glutamicum* o *E. coli* (documentos US 8.293.514; US 8.257.943; US8.216.820; WO 2008/006680 A8; EP 2386650 C1).

En los últimos tiempos se ha introducido, como otra metodología de mutación deliberada del genoma, la denominada "recombinación". El proceso de introducir las mutaciones exige muchas menos etapas que la incorporación de mutaciones con ayuda de plásmidos (Figura 1, a la derecha, B1 - B2). La recombinación usa genes de fagos o profagos que dan lugar a la recombinación homóloga entre el ADN cromosomal y el ADN aportado desde fuera. Este ADN se emplea en el caso más sencillo como ADN monocatenario sintetizado comercialmente. También se puede utilizar un ADN bicatenario amplificado mediante unas PCR. Cuando se presentan los apropiados genes de fagos o profagos, esta metodología exige solamente pocas etapas. La desventaja reside no obstante, en que esta metodología está restringida esencialmente a la introducción de mutaciones, que permiten el crecimiento en un medio selectivo, tal como por ejemplo la introducción de resistencias a antibióticos, puesto que no se pueden reconocer otras mutaciones. El uso directo para la rápida generación en microorganismos formadores de productos está por lo tanto extremadamente restringido, y se ha descrito hasta ahora solamente para *E. coli* y el producto licopeno (Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM. Nature. 2009;460(7257):894-8). En este caso especial se pudo sacar la conclusión en virtud del licopeno coloreado, con ayuda del color de la colonia, de que se ha formado el producto. Para otros organismos y otros productos, tales como por ejemplo aminoácidos u otros ácidos orgánicos, hasta ahora no es posible un reconocimiento directo de una formación aumentada del producto. Otra desventaja reside en que la recombinación está restringida a *E. coli* y a un número muy limitado de otros microorganismos, tales como *Salmonella enterica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium*.

Otro problema consiste en que hasta ahora no hay ningún sistema general, para identificar microorganismos que forman productos inmediatamente después de la recombinación en grandes poblaciones de células y aislarlos a partir de tales poblaciones de células. La metodología de la selección en placas de Petri, que se usaba hasta ahora en el caso de la recombinación, se limita, tal como se ha mencionado, a unos usos muy especiales y está limitada,

además de ello, en el número de los recombinantes, que se obtienen en placas de Petri, lo cual hace inapropiado al procedimiento para el escrutinio de grandes bibliotecas de recombinantes.

Una recombinación se basa en la recombinación homóloga, que es mediada por unas proteínas, que proceden de fagos o profagos. Dos sistemas homólogos son conocidos para *Escherichia coli*. El RecE/RecT del profago λ y el operón *red*, que se compone de Red-Gamma, Red-Beta y Red-Alfa del bacteriófago Lambda. Ambos sistemas permiten el intercambio de segmentos de ADN libremente escogibles entre dos diferentes moléculas de ADN. El intercambio de ADN se efectúa a lo largo de dos zonas homólogas (similares o idénticas) que flanquean al fragmento diana, con una longitud de 30-100 pares de bases. Para la introducción de mutaciones cromosomales, la molécula de ADN, que lleva la mutación, se sintetiza comercialmente en forma monocatenaria (Figura 1, B1), y se incorpora en *E. coli*, que expresa la proteína Red-Beta. En virtud de la homología entre la molécula de ADN incorporada y el cromosoma se favorecen mediante la proteína Red-Beta la recombinación y el intercambio de las secuencias. De esta manera se han corregido mutaciones en el gen *galK* del cromosoma de *E. coli*. Puesto que solamente el gen *galK* intacto permite el aprovechamiento de galactosa, se seleccionan en cuanto al crecimiento clones recombinantes como colonias en placas de Petri (Figura 1, B2) (Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. *Methods Enzymol.* 2007;421:171-99). Asimismo se pueden introducir genes de resistencia, o se pueden corregir correspondientes mutaciones, de tal manera que de nuevo después de una exitosa recombinación se pueden seleccionar en cuanto al crecimiento. Esto es realizable también con unos genes, que codifican una resistencia frente a cloramfenicol, higromicina, estreptomycin, ampicilina o espectinomycin (Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. *Methods Enzymol.* 2007;421:171-99). También otros genes con un fenotipo fácilmente seleccionable se pueden incorporar de esta manera por recombinación en el cromosoma de *E. coli* o mutar en el cromosoma. Caso de que no exista ninguna posibilidad de selección, esto se puede evitar mediante diferentes técnicas, tales como coselección o hibridación de colonias (Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. *Methods Enzymol.* 2007;421:171-99), o también mediante análisis por PCR de clones, lo cual no obstante exige adicionales etapas y desbarata de nuevo la ventaja de la mutagénesis rápida y deliberada del cromosoma por recombinación. Además de ello, esto presupone una frecuencia de recombinación extraordinariamente alta, puesto que en otro caso se deberían ensayar cientos de clones individualmente. Por lo tanto, todavía no es generalmente utilizable la recombinación del cromosoma sin cultivaciones clonales para el aislamiento de una mejorada productora microbiana de metabolitos. Un caso especial es el producto microbiano licopeno, que conduce a colonias llamativamente coloreadas de rojo. De esta manera, mediante recombinación iterativa, que se efectúa consecutivamente múltiples veces con *E. coli*, y evaluación visual cualitativa de la intensidad de color de colonias se mutaron en placas de Petri 20 sitios génicos cromosomales, con el fin de conseguir una formación aumentada de licopeno (Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM. *Nature.* 2009;460(7257):894-8). La restricción del uso de la recombinación para el desarrollo de organismos productores microbianos se debe al hecho de que la mayoría de las moléculas de bajo peso molecular producidas microbianamente no poseen ningún fenotipo, en cuanto al que se pueda seleccionar.

Pertenecen al estado de la técnica de la detección de productos también unos sensores de metabolitos - también conocidos bajo la denominación de nanosensores - con los cuales se puede detectar una formación aumentada del producto en bacterias individuales. Tales sensores de metabolitos aprovechan factores de transcripción o aptámeros de ARN para la detección de metabolitos de bajo peso molecular en bacterias o levaduras. Unos conocidos sensores de metabolitos, que se basan en factores de transcripción, son por ejemplo pSenLys, pSenArg, pSenSer, pSenOAS o pJC1-lrp-brnF-eyfp (documentos WO2011138006; DPA 102012 016 716.4). El sensor de metabolitos comprende en este caso una secuencia génica que codifica una proteína autofluorescente, siendo la expresión de la proteína autofluorescente dependiente de la concentración intracelular de un determinado metabolito. En este caso el control de la expresión de la secuencia génica que codifica la proteína autofluorescente en dependencia de la concentración intracelular del determinado metabolito se efectúa en el plano de la transcripción. En dependencia de la concentración intracelular del respectivo metabolito, se forma por lo tanto más o menos cantidad de ARNm, que se puede traducir en los ribosomas mediando formación de la proteína autofluorescente. El microorganismo, que contiene el sensor de metabolitos, puede ser cualquier microorganismo arbitrario. A modo de ejemplo se pueden mencionar bacterias, levaduras o enterobacterias, tales como *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* o *Saccharomyces cerevisiae*.

El uso de sensores de metabolitos, para emplear células con elevada formación de un producto, se basa en que, en el caso de una elevada formación de un metabolito, no solamente se produce de manera aumentada y se acumula extracelularmente un metabolito, sino que también se presenta una concentración intracelular del metabolito elevada con respecto a la del tipo salvaje (A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level. Binder S, Schendzielorz G, Stähler N, Krumbach K, Hoffmann K, Bott M, Eggeling L. *Genome Biol.* May. 2012 28;13(5):R40; Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. Dunlop MJ, Dossani ZY, Szmidt HL, Chu HC, Lee TS, Keasling JD, Hadi MZ, Mukhopadhyay A. *Mol Syst Biol.* May 2011 10;7:487).

Se describen unos sensores de metabolitos, con el fin de reconocer en bibliotecas de mutantes de microorganismos

a unos mutantes con formación elevada del producto, y de seleccionar estos mutantes mediante una citometría de flujo y una disposición clasificadora automática WO2011138006; DPA 102012 016 716.4. La biblioteca de mutantes se había producido en este caso con una mutagénesis química omnidireccional del cromosoma, o respectivamente mediante introducción de mutaciones en un gen codificado por un plásmido mediante una errónea reacción en cadena de la polimerasa. El presente invento no se refiere a una mutagénesis química omnidireccional ni a una mutagénesis mediante una errónea reacción en cadena de la polimerasa.

La publicación de Elizabeth E. Regulski y colaboradores "A widespread riboswitch candidate that controls bacterial genes involved in molybdenum cofactor and tungsten cofactor metabolism" en *Molecular Microbiology*, tomo 68, N° 4, 1. Mayo de 2008 (2008-05-01), páginas 918 - 932, divulga una célula modificada genéticamente con respecto a la del tipo salvaje, que contiene una secuencia génica que codifica una recombinasa que no está presente en el tipo salvaje.

La publicación de Stefanie Hampel y colaboradores "Drosophila Brainbow: a recombinasebased fluorescence labeling technique to subdivide neural expression patterns" en *Nature Methods*, tomo 8, N° 3, 1. Marzo de 2011 (2011-03-01), páginas 253 - 259 divulga una célula modificada genéticamente con respecto a la del tipo salvaje, que contiene una secuencia génica que codifica una recombinasa que no está presente en el tipo salvaje, y adicionalmente una secuencia génica que codifica un sensor de metabolitos.

El documento US2012/165387 A1 divulga una bacteria modificada genéticamente con respecto a su tipo salvaje, que comprende una secuencia génica que codifica una recombinasa que no está presente en el tipo salvaje, y adicionalmente una secuencia génica que codifica un sensor de metabolitos.

La desventaja de las actuales técnicas para el desarrollo de cepas consiste en que hasta ahora no está a disposición ninguna técnica para introducir deliberadamente mutaciones en un gen celular o en el cromosoma, y al mismo tiempo, sin cultivaciones clonales (en placas de Petri) después de la introducción de la mutación, identificar a una mejorada productora de metabolitos directamente como célula individual en suspensiones de células y aislarla a partir de las suspensiones de células.

Es por lo tanto una misión del invento poner a disposición un tal procedimiento para el desarrollo acelerado de organismos microbianos productores de pequeñas moléculas y solventar las desventajas del estado de la técnica.

El problema planteado por esta misión se resuelve conforme al invento mediante una célula según la reivindicación 1 y procedimientos según las reivindicaciones 4, 5 relacionadas.

Unos perfeccionamientos ventajosos del invento se indican en las reivindicaciones secundarias.

Con la célula y con el procedimiento es posible ahora proporcionar, por una vía especialmente rápida, unas células para la producción aumentada de metabolitos, con las que sea posible una producción de metabolitos aumentada con respecto a la de la célula de partida.

En lo sucesivo el invento debe de ser descrito en su forma general.

Conforme al invento se pone a disposición una célula modificada genéticamente con respecto a su tipo salvaje según la reivindicación 1, que contiene una secuencia génica que codifica una recombinasa y adicionalmente una secuencia génica que codifica un sensor de metabolitos.

En el caso de la célula se trata de un microorganismo, preferiblemente una bacteria, particularmente del género *Corynebakterium*, *Enterobakterium* o del género *Escherichia*, de manera especialmente preferible *Corynebakterium glutamicum* o *Escherichia coli*.

En el caso de la secuencia génica que codifica una recombinasa puede tratarse de una secuencia, que tiene una funcionalidad mejorada con respecto a una recombinasa conocida en un deseado microorganismo. Se trata de una secuencia génica codificadora de una recombinasa, que codifica una proteína, que recombina un ADN añadido extracelularmente con un ADN propio de la célula. Para el ensayo en cuanto a funcionalidad se puede llevar a cabo, tal como se representa esquemáticamente en la Figura 2. Se ha manifestado como especialmente apropiada una secuencia génica según la SEQ. ID. N° 1 o las SEQ. ID N°s 7 y 9.

La secuencia génica que codifica una recombinasa puede ser transformada y expresada en la célula mediante un vector, por ejemplo un plásmido, formándose la recombinasa.

La recombinasa empleada en el procedimiento está caracterizada por que ella recombina un ADN añadido extracelularmente con el ADN propio de la célula. La recombinasa puede proceder por ejemplo de una agrupación más grande de genes, tal como un metagenoma, donde se identifican posibles recombinasas mediante comparaciones de secuencias con las de unas conocidas recombinasas. Mediante tales comparaciones de secuencias se pueden identificar además unas posibles recombinasas también en bancos de datos ya existentes.

Además de ello, unas proteínas, a las que se les atribuye actividad de recombinasas, o de las que se supone tal actividad, pueden ser reconocidas como recombinasas también mediante caracterización funcional. Preferiblemente se pueden aislar recombinasas a partir de fagos o profagos. De esta manera se pueden aislar y emplear recombinasas a partir de profagos de las bacterias relevantes biotecnológicamente *Leuconostoc*, *Clostridios*, *Thiobacillus*, *Alcanivorax*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantosa*, *Acinetobacter*, *Shewanella* o *Corynebacterium* y en cada caso la especie emparentada. Se prefieren unas recombinasas, que son homólogas con la recombinasa RecT del profago Rac, o la recombinasa Bet del fago Lambda. Se prefieren especialmente la recombinasa RecT del profago Rac de *E. coli*, la recombinasa Bet del fago Lambda de *E. coli*, y la recombinasa rCau (cauri_1962) de *Corynebacterium aurimucosum*.

En el caso de la secuencia génica empleada, que codifica el sensor de metabolitos, se trata de la secuencia de unos vectores, por ejemplo plásmidos, que codifican unas proteínas, que reconocen y hacen visibles mediante fluorescencia a metabolitos, tales como aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, vitaminas o sustancias activas vegetales. Cuanto más fuerte es la fluorescencia, tanto más alta es la concentración intracelular del metabolito. De esta manera se puede identificar una célula con fluorescencia elevada y por consiguiente con una formación del producto elevada con respecto a las de la forma no modificada genéticamente.

La célula modificada de tal manera es apropiada para incorporar en su ADN propio de la célula las moléculas de ADN aportadas desde fuera, que llevan las mutaciones M1 hasta Mm o los genes mutados G1-Gn, y hacer reconocible mediante fluorescencia una producción elevada de un determinado metabolito que es debida a la incorporación del ADN. El sensor de metabolitos se escoge en este caso de tal manera, que él corresponda a la detección del metabolito, que se debe formar en cantidad aumentada.

Por lo demás, el invento comprende un procedimiento según la reivindicación 4 para la identificación de una célula con una concentración intracelular de un determinado metabolito, elevada con respecto a la de su tipo salvaje, en una suspensión de células, que incluye las etapas de procedimiento de:

- i) poner a disposición una suspensión de células que contiene células del tipo antes descrito
- ii) modificar genéticamente las células por recombinación mediando adición de un ADN, que contiene por lo menos un gen modificado G1 hasta Gn o por lo menos una mutación M1 hasta Mm mediando obtención una suspensión de células, en la que las células se diferencian en lo que se refiere a la concentración intracelular de un determinado metabolito,
- iii) identificar células individuales en la suspensión de células con elevada concentración intracelular de un determinado metabolito por detección de la fluorescencia mediante un sensor de metabolitos.

Como células se emplean unos microorganismos del género *Corynebacterium*, Enterobacterias, o del género *Escherichia*, de manera especialmente preferida *Corynebacterium glutamicum*, o *Escherichia coli*.

En el caso de la recombinación se trata de los métodos conocidos según el estado de la técnica y de los procedimientos divulgados en la parte descriptiva especial a modo de ejemplo, pero no limitativamente. De manera preferida el gen de recombinasa se introduce sobre un plásmido en la célula. De manera especialmente preferida se introduce en la célula un gen para una recombinasa según SEQ. ID1 N°1.

Para esto, las células transforman de manera preferida con vectores, de manera especialmente preferida con plásmidos, según las secuencias SEQ.ID. N° 3 hasta N° 9.

En el caso de los metabolitos que aparecen en una concentración intracelular elevada con respecto a la del tipo salvaje, puede tratarse por ejemplo de aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, vitaminas o sustancias activas vegetales. Se trata en este caso de los deseados productos, cuya producción se debe de mejorar.

En el caso de la suspensión de células puede tratarse de unas células, que se presentan por ejemplo en una solución acuosa que contiene sales y que contiene eventualmente sustancias nutritivas.

En el caso de la modificación genética de la célula por recombinación puede usarse un ADN monocatenario o un ADN bicatenario, así como un ADN sintético o también un ADN aislado a partir de células. El ADN puede comprender desde 50 pb hasta 3 Mb, preferiblemente un ADN con la longitud de 50-150 pb. El ADN puede codificar proteínas o partes de proteínas de la productora que se ha de modificar por tecnología genética. También puede emplearse un ADN, que es homólogo con zonas promotoras o con zonas con función desconocida de la productora que se ha de modificar por tecnología genética. Además de ello, el ADN puede codificar también genes o elementos reguladores de otros organismos, como productores que se han de modificar por tecnología genética. Junto a moléculas definidas de ADN pueden emplearse también mezclas de moléculas de ADN, lo cual es ventajoso por ejemplo para la producción de una gran diversidad genética.

La inserción puede efectuarse en este caso en el cromosoma o en un plásmido.

Los métodos de detección de fluorescencia mediante un sensor de metabolitos son conocidos por un experto.

El invento se refiere en una forma de realización también a un procedimiento para la producción de una célula productora modificada genéticamente con respecto a su tipo salvaje con una optimizada producción de un determinado metabolito según la reivindicación 5, que incluye las siguientes etapas:

- i) poner a disposición una suspensión de células que contiene células del tipo antes descrito;
- ii) modificar genéticamente de las células por recombinación mediando adición de un ADN, que contiene por lo menos un gen modificado G1 hasta Gn o por lo menos una mutación M1 hasta Mm. Se obtiene una suspensión de células, en la que las células se diferencian en lo que se refiere a la concentración intracelular de un determinado metabolito;
- iii) identificar células individuales en la suspensión de células con una concentración intracelular elevada de un determinado metabolito por detección de la fluorescencia mediante un sensor de metabolitos;
- iv) separar las células identificadas desde la suspensión de células;
- v) identificar aquellos genes modificados genéticamente G1 hasta Gn o aquellas mutaciones M1 hasta Mm en las células identificadas y separadas, que son responsables de la elevada concentración intracelular del determinado metabolito;
- vi) producir una célula productora modificada genéticamente con respecto a su tipo salvaje con producción optimizada del determinado metabolito, cuyo genoma comprende por lo menos uno de los genes G1 hasta Gn y/o por lo menos una mutación M1 hasta Mm.

Para las células, la recombinación, los metabolitos, la suspensión de células y los métodos de detección de fluorescencia, los vectores, los ADN que se han de introducir en la célula de las etapas i), ii) y iii) son válidas las mismas relaciones que para el procedimiento para la identificación de una célula con una concentración intracelular elevada con respecto a su tipo salvaje de un determinado metabolito en una suspensión de células.

La separación de las células identificadas puede efectuarse con métodos conocidos.

Para producir una célula productora modificada con respecto al tipo salvaje, se aíslan las células, que se habían utilizado para la identificación de la producción aumentada y que indican una producción aumentada de metabolitos mediante una elevada fluorescencia.

En estas células se identifican la mutación M1-Mm y/o en el gen G1-Gn, o las mutaciones M1-Mm en los genes G1-Gn. Esto puede efectuarse mediante una amplificación por PCR de los genes dianas en los genes G1 hasta Gn y/o los sitios de mutación M1 hasta Mm, con una subsiguiente secuenciación. Asimismo puede efectuarse la secuenciación del genoma.

Las identificadas mutaciones M1-Mm que aumentan la cantidad de producto y/o los genes G1-Gn se transfieren a continuación a la célula productora. Esto puede efectuarse con métodos conocidos por un experto según el estado de la técnica.

La denominación G1 hasta Gn se orienta a por lo menos uno de los genes G1, G2, G3 hasta Gn, que se habían añadido a la célula en el marco de la recombinación y que ahora se hacen responsables de un aumento especialmente bueno de la producción del metabolito.

La denominación M1 hasta Mm se orienta a unas mutaciones M1, M2 M3.. Mm, que están contenidas en los genes G1 hasta Gn, que se habían añadido a la célula en el marco de la recombinación y que ahora se hacen responsables de un aumento especialmente bueno de la producción del metabolito.

Estos genes o estas mutaciones se aislaron a partir de la célula y se incorporan en el genoma de la célula productora según conocidos procedimientos. En este caso el gen o la mutación, o respectivamente los genes o mutaciones se puede(n), incorporar en el ADN cromosomal o en un plásmido de la célula productora.

En el caso de estos genes o estas mutaciones se trata de unos segmentos de ADN, que codifican de manera preferida proteínas de las etapas de una ruta de biosíntesis del deseado metabolito o eventualmente de un proceso de metabolismo que está en conexión con ella. También puede tratarse de un ADN, con el que se influye de un modo suficientemente favorable sobre la actividad promotora de unos genes o sobre la estabilidad del ARNm de unos genes para la formación del producto.

Particularmente se encontraron los genes según las secuencias SEQ. ID. N° 33 hasta SEQ. ID. 44, que son apropiados para aumentar la producción de L-lisina.

El invento se refiere por lo demás a un procedimiento para la preparación de metabolitos, que incluye las etapas de procedimiento de:

- a) producir una célula productora modificada genéticamente con respecto a su tipo salvaje con optimizada producción de un determinado metabolito mediante un procedimiento del tipo más arriba mencionado
- b) cultivar la célula en un medio de cultivo que contiene sustancias nutritivas en unas condiciones, en las que la célula productora produce el determinado metabolito a partir de las sustancias nutritivas.

5 El metabolito producido de esta manera se secreta en el medio de cultivo y puede aislarse a partir del medio de cultivo.

10 El medio de cultivo o respectivamente el medio de fermentación que se ha de utilizar debe satisfacer de manera apropiada las exigencias de las respectivas cepas. Unos apropiados medios de cultivo son conocidos por un experto. Unas descripciones de medios de cultivo de diferentes microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for general Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU., 1981). Los conceptos de medio de cultivo y de medio de fermentación, o respectivamente de medio, son recíprocamente intercambiables.

15 Como fuente de carbono se pueden utilizar azúcares e hidratos de carbono, tales como p.ej. glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, soluciones que contienen sacarosa procedentes del tratamiento de remolacha azucarera o de caña de azúcar, un almidón, un material hidrolizado de almidón y una celulosa, aceites y grasas, tales como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos, tales como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como por ejemplo glicerol, metanol y etanol y ácidos orgánicos, tales como por ejemplo ácido acético o ácido láctico.

25 Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar compuestos orgánicos que contienen nitrógeno tales como peptonas, un extracto de levadura, un extracto de carne, un extracto de malta, un agua de maceración de maíz, harina de haba de soja y urea o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. La fuente de nitrógeno se puede utilizar individualmente o como una mezcla.

30 Como fuente de fósforo se pueden utilizar ácido fosfórico, dihidrógenofosfato de potasio, hidrógenofosfato de dipotasio o las correspondientes sales que contienen sodio.

35 El medio de cultivo debe contener por lo demás sales, por ejemplo en forma de cloruros o sulfatos de metales, tales como por ejemplo sodio, potasio, magnesio, calcio y hierro, tales como por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente pueden emplearse sustancias u hormonas de crecimiento esenciales tales como aminoácidos por ejemplo homoserina y vitaminas, por ejemplo tiamina, biotina o ácido pantoténico, adicionalmente a las sustancias más arriba mencionadas.

Las mencionadas sustancias empleadas se pueden añadir al cultivo en forma de una única tanda o se pueden alimentar de manera apropiada durante la cultivación.

40 Para el control del pH del cultivo se emplean compuestos orgánicos de carácter básico tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco, o respectivamente agua amoniacal o compuestos orgánicos de carácter ácido tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico de una manera apropiada. El valor del pH se ajusta por lo general a un valor de 6,0 hasta 8,5, de manera preferida de 6,5 hasta 8. Para el control del desarrollo de espuma pueden se pueden emplear agentes antiespumantes, tales como por ejemplo ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para el mantenimiento de la estabilidad de plásmidos se pueden añadir al medio apropiadas sustancias que actúan selectivamente, tales como por ejemplo antibióticos. La fermentación se realiza preferiblemente en condiciones aerobias. Con el fin de mantener a ésta, se incorporan en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como por ejemplo aire. La utilización de unos líquidos, que están enriquecidos con peróxido de hidrógeno, es asimismo posible. Eventualmente la fermentación se realiza con sobrepresión, por ejemplo con una sobrepresión de 0,03 hasta 0,2 MPa. La temperatura del cultivo se sitúa normalmente en 20°C hasta 45°C y de manera preferida en 25°C hasta 40°C, de manera especialmente preferida en 30° hasta 37°C. En el caso de procedimientos discontinuos, la cultivación se prosigue preferiblemente durante tanto tiempo hasta que se haya formado, en cantidad suficiente para la medida técnica de la obtención del deseado metabolito, p.ej. un aminoácido, un ácido orgánico, una vitamina, o una sustancia activa vegetal. Esta meta se alcanza normalmente en el transcurso de 10 hasta 160 horas. En el caso de procedimientos continuos son posibles unos períodos de tiempo de cultivación más largos. Mediante la actividad de los microorganismos se llega a un enriquecimiento (una acumulación) del metabolito en el medio de fermentación y/o en las células de los microorganismos.

60 Ejemplos de apropiados medios de fermentación se encuentran, entre otros en los documentos de patentes 5.770.409, US 5.990.350, US 5.275.940, WO 2007/012078, US 5.827.698, WO 2009/043803, US 5.756.345 o US 7.138.266.

Con el procedimiento conforme al invento para la preparación de metabolitos se pueden preparar de una manera

especialmente efectiva, por ejemplo, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, hidratos de carbono o sustancias activas vegetales.

De manera preferida se preparan con este procedimiento L-aminoácidos, nucleótidos y sustancias activas vegetales, de manera especialmente preferida L-lisina. Se describe también un gen de recombinasa según la SEQ. ID. N° 1 y sus alelos, con una homología de por lo menos 70%, de manera preferida 80%, de manera especialmente preferida 85%, y/o 90%, de manera particularmente preferible, con una homología que es de 91%, 92, %, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Se describe también una recombinasa según la SEQ. ID. N°2 y sus proteínas homólogas, con una homología de 95%, 96%, 97%, de manera preferida de 98% o 99%. Por lo demás se describen ácidos nucleicos según las secuencias de SEQ. ID. N° 33 - SEQ. ID. N° 44, que codifican unos genes, con los que se pueden obtener unas cepas productoras especialmente productivas y que originalmente proceden de células para la identificación de mutaciones.

En lo sucesivo el invento se expone en la parte descriptiva especial con mayor precisión, pero no limitativamente.

Una contribución a la solución del problema planteado la presta un procedimiento en el que se identifica y usa una recombinasa. Con el fin de identificar recombinasas para bacterias biotecnológicamente relevantes tales como *Leuconostoc*, *Clostridios*, *Thiobacillus*, *Alcanivorax*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantosa*, *Acinetobacter*, *Shewanella* y especies de *Corynebacterium*, particularmente *Corynebacterium glutamicum*, se analizan bancos de datos de genomas según unos conocidos procedimientos en cuanto a proteínas que son homólogas a conocidas recombinasas, y de las que se espera o confía una función en el deseado organismo, que sea mejor que la de las conocidas recombinasas. Los bancos de datos de genomas son libremente accesibles. Así, por ejemplo, el banco de datos de los European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemania y Cambridge, Reino Unido), el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Md., EE.UU.), el banco de datos del Swiss Institute of Bioinformatics (Swissprot, Ginebra, Suiza), o la Protein Information Resource Database (PIR, Washington, D.C., EE.UU.) y el DNA Data Bank of Japan (DDBJ, 1111 Yata, Mishima, 411-8540, Japón).

Los mencionados bancos de datos se usan, con el fin de rastrear unas proteínas, que sean homólogas a recombinasas ya conocidas (Figura 2, c1), tales como por ejemplo la RecT procedente del profago Rac (Genetic and molecular analyses of the C-terminal region of the recE genes from the Rac prophage of *Escherichia coli* K-12 reveal the recT genes. Clark, A.J., Sharma, V., Brenowitz, S., Chu, C.C., Sandler, S., Satin, L., Templin, A., Berger, I., Cohen, A. J. *Bacteriol.* (1993)), la Beta procedente del fago Lambda (Hendrix, R.W. (1999). All the world's a phage. *Proc Nat Acad Sc USA* 96: 2192-2197), la gp61 procedente del fago de *Mycobacteria* Che9c o la gp43 procedente del fago Halo de *Mycobacteria* (Recombineering mycobacteria and their phages. van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. *Nat Rev Microbiol.* Nov de 2008;6(11):851-857). El rastreo de las proteínas homólogas se efectúa con conocidos algoritmos y programas de análisis de secuencias según conocidos procedimientos, que son accesibles públicamente, tal como se describe por ejemplo en las referencias de Staden (*Nucleic Acids Research* 14, 217-232 (1986)), o de Marck (*Nucleic Acids Research* 16, 1829-1836 (1988)) o mediante uso del programa GCG de Butler (*Methods of Biochemical Analysis* 39, 74-97 (1998)).

Las secuencias descritas abarcan también aquellas secuencias, que tienen una homología (en el plano de los aminoácidos) o respectivamente identidad (en el plano de los ácidos nucleicos, exclusive la degeneración natural) mayor que 70%, de manera preferida 80%, más preferiblemente 85% (en relación con la secuencia de ácido nucleico) o respectivamente 90% (también en relación con los polipéptidos), preferiblemente mayor que 91%, 92%, 93% o 94%, más preferiblemente mayor que 95% o 96% y de manera especialmente preferida mayor que 97%, 98% o 99% (en relación con ambos tipos de secuencias) a una de estas secuencias, siempre y cuando que se conserven el modo de acción o respectivamente la función y la finalidad de una tal secuencia. La expresión "homología" (o identidad) tal como se utiliza en el presente caso, puede definirse mediante la ecuación $H (\%) = [1 - V/X] \times 100$, en donde H significa homología, X es el número total de nucleobases/aminoácidos de la secuencia comparativa y V es el número de diferentes nucleobases/aminoácidos de la secuencia que se ha de considerar, referido a la secuencia comparativa. En cualquier caso, con el concepto de secuencias de ácidos nucleicos, que codifican polipéptidos, se abarcan todas las secuencias, que aparecen como posibles teniendo en cuenta la degeneración del código genético.

La identidad porcentual con las secuencias de aminoácidos, que se indican en el protocolo de secuencias, se puede determinar sin dificultades con el procedimiento conocido en el estado de la técnica por un experto. Un apropiado programa, que se puede emplear conforme al invento, es el BLASTP (Altschul y colaboradores. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402).

Las secuencias indicadas en el protocolo de secuencias abarcan también las secuencias de ácidos nucleicos, que se hibridan con las indicadas. Unas instrucciones acerca de la hibridación las encuentra un experto, entre otras referencias, en el manual "The diG System Users Guide for Filter Hybridization" de la entidad Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en la referencia de Liebl y colaboradores (*International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar en condiciones rigurosas, es decir que se forman solamente unos híbridos, en los cuales las sondas, por ejemplo la secuencia de nucleótidos complementaria con el gen, y la secuencia, es decir los polinucleótidos tratados con la sonda, son idénticas/os por lo menos en un 70%. Es

conocido que la rigurosidad de la hibridación, inclusive de las etapas de lavado, se influencia o respectivamente determina mediante variación de la composición tamponadora, de la temperatura y de la concentración de las sales. La reacción de hibridación se lleva a cabo por lo general con una rigurosidad relativamente baja en comparación con la de las etapas de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, Reino Unido, 1996). Para la reacción de hibridación puede emplearse por ejemplo un tampón correspondiente al tampón 5xSSC a una temperatura de aprox. 50°C - 68°C. En este caso las sondas pueden hibridarse también con unos polinucleótidos que tienen una identidad menor que 70% con la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables y se eliminan mediante lavado en condiciones rigurosas. Esto se puede conseguir por ejemplo mediante disminución de la concentración de sales hasta 2xSSC y eventualmente a continuación hasta 0,5xSSC (The diG sistema User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura de aprox. 50°C - 68°C, aprox. 52°C - 68°C, aprox. 54°C - 68°C, aprox. 56°C - 68°C, aprox. 58°C - 68°C, aprox. 60°C - 68°C, aprox. 62°C - 68°C, aprox. 64°C - 68°C, aprox. 66°C - 68°C. De manera preferida las etapas de lavado se llevan a cabo a unas temperaturas de aprox. 62°C - 68°C, preferiblemente de 64°C - 68°C o aprox. 66°C - 68°C, de manera especialmente preferida de aprox. 66°C - 68°C. Es eventualmente posible disminuir la concentración de sales hasta una concentración correspondiente a 0,2xSSC o 0,1xSSC. Mediante elevación escalonada de la temperatura de hibridación en escalones de aprox. 1 - 2°C desde 50°C hasta 68°C se pueden aislar unos fragmentos de polinucleótidos, que codifican secuencias de aminoácidos, que poseen por ejemplo una identidad de por lo menos 70% o por lo menos 80% o por lo menos 90% hasta 95% o por lo menos 96% hasta 98% o por lo menos 99% con la secuencia de la sonda empleada. Otras instrucciones acerca de la hibridación son obtenibles en el mercado en forma de los denominados estuches (p.ej. DiG Easy Hyb de la entidad Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de catálogo 1603558).

La nueva secuencia de ADN de *Corynebacterium aurimucosum* determinada de esta manera, que contiene el gen de recombinasa recT (SEQ ID No. 1) y codifica la recombinasa funcional rCau (SEQ ID No. 2), es parte componente del presente invento.

Las recombinasas identificadas son clonadas en un vector, por ejemplo un plásmido, que permite la expresión inducible del gen de recombinasa en el anfitrión, en el que se debe llevar a cabo la recombinación (Figura 2, c2.1). Los vectores de expresión son estado de la técnica. Así puede usarse por ejemplo para *Leuconostoc* o *Lactobacillus* el vector pCB42 (Construction of theta-type shuttle vector for *Leuconostoc* and other lactic acid bacteria using pCB42 isolated from kimchi. Eom HJ, Moon JS, Cho SK, Kim JH, Han NS. Plasmid. Ene de 2012;67(1):35-43), para *Clostridium* el pTHyda (Girbal L, von Abendroth G, Winkler M, Benton PM, Meynial-Salles I, Croux C, Peters JW, Happe T, Soucaille P (2005) Homologous and heterologous over-expression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. Appl. Environ. Microbiol. 71:2777-2781) para *Thiobacillus* el pTF-FC2 (Plasmid evolution and interaction between the plasmid addition stability systems of two related broad-host-range IncQ-like plásmidos. Deane SM, Rawlings DE. J Bacteriol. Abr. 2004;186(7):2123-33.), para *Alcanivorax* el pRED (Appl Microbiol Biotechnol. Jul de 2006;71(4):455-62. Functional expression system for cytochrome P450 genes using the reductase domain of self-sufficient P450RhF from *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784. Nodate M, Kubota M, Misawa N.), para *Bacillus* el pMG (Construction of a modular plasmid family for chromosomal integration in *Bacillus subtilis*. Gimpel M, Brantl S. J Microbiol Methods. 2012;91 (2):312-7), para *Pseudomonas* el pWW0 (Increasing Signal Specificity of the TOL Network of *Pseudomonas putida* mt-2 by Rewiring the Connectivity of the Master Regulator XylR. De Las Heras A, Fraile S, de Lorenzo V. PLoS Genet. Oct de 2012;8(10):e1002963), para *Pantosa* el pAGA (Characterization of a small cryptic plasmid from endophytic *Pantosa agglomerans* and its use in the construction of an expression vector. De Lima Procópio RE, Araújo WL, Andreote FD, Azevedo JL. Genet Mol Biol. Ene de 2011; 34(1): 103-9), para *Acinetobacter* el pRIO-5 (Complete sequence of broad-host-range plasmid pRIO-5 harboring the extended-spectrum- β -lactamase gene blaBES. Bonnin RA, Poirer L, Sampaio JL, Nordmann P. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Feb; 56(2):1116-9), para *Shewanella* el pBBR1-MCS (*Shewanella oneidensis*: a new and efficient system for expression and maturation of heterologous [Fe-Fe] hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*.

Sybirna K, Antoine T, Lindberg P, Fourmond V, Rousset M, Mejean V, Bottin H. BMC Biotechnol. 18 de Sep de 2008;8:73), o para especies de *Corynebacterium*, particularmente *C. glutamicum* el pZ1 (Menkel y colaboradores, Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554) o el pCLTON (A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. Plasmid. 2012 68(2):142-7). Un artículo recopilativo acerca de plásmidos de expresión en *Corynebacterium glutamicum* ha sido descrito por Tauch y colaboradores (Journal of Biotechnology 104, 27-40 (2003)).

Según una forma de realización preferible de los vectores conformes al invento se trata de los vectores pCLTON2-bet (SEQ ID No. 3), pCLTON2-recT (SEQ ID No. 4), pCLTON2-gp43 (SEQ ID No. 5), pCLTON2-gp61 (SEQ ID No. 6), pCLTON2-rCau (SEQ ID No. 7), pEKEx3-recT (SEQ ID No. 8) y pEKEx3-bet (SEQ ID No. 9).

Los vectores producidos de esta manera se ensayan en cuanto a la actividad de la recombinasa en el respectivo anfitrión (Figura 2, c2). El ensayo de actividad comprende la producción de una cepa de ensayo del anfitrión, en el que se debe de producir por recombinación un fenotipo sencillo de comprobar (Figura 2, c2.1). Las otras etapas contienen la transformación de la cepa de ensayo (Figura 2, c2.2), la inducción de la expresión del gen de

recombinasa (Figura 2, c2.3), la producción de células competentes para la recepción de un ADN lineal (Figura 2, c2.4), la transformación de las células competentes con un ADN lineal (Figura 2, c2.5), y el ensayo en cuanto a la producción del fenotipo (Figura 2, c2.6). Si se puede producir el esperado fenotipo, entonces se efectúa una recombinación. Las etapas individuales, c2.1 - c2.6, son conocidas por un experto. Así, se incorpora en la cepa de ensayo como fenotipo sencillo de comprobar (Figura 2, c2.1), por ejemplo, un defectuoso gen de resistencia a antibióticos en el cromosoma, cuya función se restablece mediante una exitosa recombinación. Como genes de resistencia a antibióticos están a disposición unos genes, que confieren resistencia frente a kanamicina, cloranfenicol, higromicina, estreptomycin, ampicilina o espectinomycin. También se pueden utilizar unos genes, que permiten el crecimiento sobre un determinado sustrato como marcador de selección, tal como por ejemplo el gen *galK* que codifica galactocinasa. La transformación de la cepa de ensayo con el plásmido de ensayo que expresa una recombinasa (Figura 2, c2.2) se efectúa según procedimientos conocidos, tales como por ejemplo una electroporación, una transformación química o transformación balística. Para la inducción del gen de recombinasa (Figura 2, c2.3) en el vector de expresión se añade al medio un inductor preestablecido por el vector. Este modo de proceder es conocido por un experto, y en el caso del inductor se trata por ejemplo de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido, anhidrotetraciclina, sakacina, o acetamida. Las otras etapas, tales como la producción de células competentes (Figura 2, c2.4), la transformación de las células (Figura 2, c2.5) así como el ensayo en cuanto a la producción del fenotipo mediante siembra en placas de Petri (Figura 2, c2.6), son procedimientos microbiológicos clásicos y asimismo conocidos por un experto. Si el deseado fenotipo se produce según el procedimiento descrito, se efectúa a continuación de manera preferida la optimización de la recombinación (Figura 2, c3). Ésta incluye la variación del tiempo de inducción en el intervalo de treinta minutos hasta seis horas, la variación del ADN empleado para la recombinación, y la variación del tiempo de regeneración y de segregación, así como eventualmente otros parámetros, que son conocidos por un experto.

En el caso del ADN empleado para la recombinación se trata del DANN monocatenario, que se sintetiza por proveedores comerciales, y puede tener una longitud hasta de 300 pares de bases. En este caso se presenta en el centro del ADN la deseada mutación que se ha de introducir en el cromosoma, y flanqueando a ésta contiene las secuencias de ADN, que son homólogas a la secuencia cromosomal del anfitrión (documento US 7.144.734). La optimización incluye el ensayo de ADN de diversa longitud. Como ADN se emplea un ADN con la longitud de 20-300 pares de bases, preferiblemente 100 pares de bases. La optimización incluye el ensayo de ADN en diversa cantidad, empleándose 0,2 - 30 microgramos para la transformación, preferiblemente 10 microgramos. La optimización incluye además el ensayo de un ADN es homólogo o bien con la cadena del mismo sentido o con la cadena de sentido opuesto, empleándose preferiblemente el ADN homólogo con la cadena de sentido opuesto (US 7.674.621). Las etapas individuales de optimización son conocidas por un experto, y se han descrito por ejemplo para *E. coli* (Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. Enterica*, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. *Methods Enzymol.* 2007; 421:171-99), *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis* genome editing using ssDNA with short homology regions. Wang Y, Weng J, Waseem R, Yin X, Zhang R, Shen Q. *Nucleic Acids Res.* Jul de 2012;40(12):e91), o *Lactococcus* (High efficiency recombination in lactic acid bacteria. van Pijkeren JP, Britton RA. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40(10):e76).

Para la realización de la recombinación con el fin de obtener una productora microbiana (Figura 2, C1-C4), el sitio génico que se ha de mutar se escoge en el cromosoma. Pueden ser de esta índole genes conocidos, genes de función desconocida o zonas intergénicas. En el caso del productor se trata por ejemplo de genes o zonas promotoras de genes, que participan en el anabolismo o catabolismo o en procesos de regulación, o de los/las que influyen sobre el tiempo de semidesintegración del ARNm o de las proteínas.

El ADN usado para la recombinación se sintetiza o produce mediante amplificación por PCR. Él tiene una longitud de 30-3.000 pares de bases, y tiene la estructura organizada A-B-C. En este caso, B es la mutación deseada situada en el centro. Ésta puede ser, en el caso de una inserción, una secuencia de 1-3.000 pares de bases, preferiblemente una de 1-1.000, más preferiblemente una de 1-100, de manera especialmente preferida una de 1 par de bases. Las secuencias A y C son homólogas a secuencias cromosomales. Ellas tienen en el ADN sintetizado en cada caso una longitud de 20-100 pares de bases. En el caso de una supresión deseada en el cromosoma B tiene una longitud de cero pares de bases, y A y C son homólogas a unas secuencias en el cromosoma, que están directamente contiguas a la zona que se ha de suprimir. Las secuencias A y C tienen en el ADN sintetizado una longitud de 20-100 pares de bases. La supresión en el cromosoma puede ser de 1 par de bases o hasta de 10 kb. Para el intercambio de bases en el cromosoma, B constituye la zona que se ha de intercambiar, que puede abarcar 1-50 pares de bases. Las secuencias A y C son homólogas a secuencias cromosomales, que se sitúan contiguamente a la zona que se ha de intercambiar. Ellas tienen en el ADN sintetizado una longitud de 20-100 pares de bases. Las síntesis de ADN las realizan por ejemplo Genescript (GenScript USA Inc., 860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, EE.UU.), o Eurofins (Eurofins MWG Operon, Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Alemania), o ADN 2.0 (DNC2.0 Headquarters, 1140 O'Brien Drive, Suite A, Menlo Park, CA 94025, EE.UU.).

El ADN sintetizado o producido mediante amplificación por PCR se incorpora mediante transformación en el microorganismo, que expresa la recombinasa y que contiene un sensor de metabolitos (Figura 3, C1). Tales microorganismos que contienen sensores de metabolitos se han descrito (WO2011138006, DPA 102012 016 716.4, DPA 10 2012 017 026.2). El ADN usado para la transformación y recombinación es una secuencia de ADN definida tal como se ha descrito antes.

Para la transformación y recombinación pueden emplearse sin embargo también unas mezclas definidas de diferentes secuencias de ADN. Estas mezclas se emplean preferiblemente en el caso del intercambio de bases en el cromosoma en la zona "B", donde "B" en el caso de la estructura organizada A-B-C de la secuencia de ADN la zona que se ha de intercambiar. Así, pueden intercambiarse por ejemplo en un gen al mismo tiempo en una población de microorganismos diferentes aminoácidos en una posición en el polipéptido. Pueden intercambiarse al mismo tiempo diferentes aminoácidos en diferentes posiciones en el polipéptido. Pueden intercambiarse también al mismo tiempo en una zona promotora diferentes nucleótidos. Las correspondientes mezclas de ADN propiamente dichas se pueden producir mediante mezcladura secuencias de ADN definidas individuales, o sintetizarse como mezclas en las instalaciones del fabricante, con lo que se presentan en una tanda hasta varios millares de diferentes moléculas de ADN, que también se usan entonces en una tanda para la transformación y recombinación (Figura 3, C1). Tales mezclas de ADN con las más diferentes secuencias pueden adquirirse comercialmente. Así, se ofrecen por ejemplo "Combinatorial Libraries" o "Controlled Randomized Libraries" o "Truncated libraries" [= bibliotecas combinatorias, bibliotecas aleatorizadas controladas o bibliotecas truncadas] por Life Technologies GmbH, Frankfurter Straße 129B, 64293 Darmstadt, que se pueden emplear directamente para la recombinación.

Para la transformación y recombinación pueden emplearse además también secuencias de ADN indefinidas. Por ejemplo ADN genómicos procedentes de organismos productores existentes. De esta manera pueden identificarse segmentos de ADN y/o mutaciones y/o genes que son provechosos para la formación del producto.

A continuación de la transformación de los microorganismos que contienen recombinasas y nanosensores se efectúa una regeneración en un medio complejo, tal como es conocido por un experto y se ha descrito por ejemplo para *E. coli* (Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983; 166(4):557-80), o *Corynebacterium* (Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Götter S, Pühler A, Kalinowski J. Efficient electrotransformation of *corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGC1. *Curr Microbiol.* 2002; 45(5):362-7). Después de la regeneración las células eventualmente se transfieren a un medio mínimo para la segregación, tras de lo cual, correspondientemente al procedimiento conforme al invento, se efectúa directamente el análisis de los productos en células individuales mediante una citometría de flujo y una selección de la productora (Figura 3, C2). Las células individuales seleccionadas se depositan sobre el medio en placas de Petri, o también se depositan inmediatamente en placas de microtitulación con un medio líquido para la ulterior cultivación. Detalles acerca del análisis de suspensiones de células mediante una citometría de flujo pueden tomarse por ejemplo de la referencia de Sack U, Tarnok A, Rothe G (coordinadores de edición): *Zelluläre diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Basel, Karger, 2007, páginas 27 - 70. Apropriados citómetros de flujo, que analizan hasta 100.000 células por segundo y poseen una posibilidad de clasificación, son por ejemplo el aparato Aria-III (BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, California, EE.UU., 95131, 877.232.8995) o el aparato MoFlo- XDP (Beckman Coulter GmbH, Europark Fichtenhain B 13, 47807 Krefeld, Alemania).

A continuación del aislamiento de la productora (Figura 3, C3) se efectúa la verificación de las propiedades de formación del producto en matraces con sacudimiento o placas de microtitulación. Se escoge la productora especialmente apropiada. Ella produce más cantidad del producto producido microbianamente que la cepa de partida que se había empleado en la etapa C1 (Figura 3) para la transferencia de ADN. Mediante secuenciación del genoma en unas zonas, que son definidas mediante el ADN añadido en la etapa, o también de todo el cromosoma, o también de un ADN codificado por un plásmido, puede identificarse la mutación aumentadora del producto que se ha efectuado (Figura 3, C3.A). Las/los correspondientes mutaciones M1 hasta Mm y/o genes G1 hasta Gn se transfieren eventualmente según conocidos procedimientos a otras cepas productoras (Figura 3, C3.B), para mejorar aún más a la productora de metabolitos ya existente (Figura 3, C3.C).

El invento se explicará seguidamente con más detalle con ayuda de figuras y ejemplos no limitativos.

Figura 1: (a la izquierda) La figura muestra, para la comprensión del invento, una representación del transcurso del procedimiento según el estado de la técnica, a saber el principio de la producción de una mutación cromosomal mediante las etapas A1 - A8, partiendo de la construcción de un plásmido específico (A1) pasando por dos etapas de selección en placas de Petri (A3 - A4), y cultivación clonal (A6) hasta realizar el ensayo en cuanto a una producción mejorada (A7 - A8), así como (a la derecha) el principio de la producción de una mutación cromosomal por recombinación, partiendo de un ADN sintético (B1) y una selección de clones resistentes en placas de Petri o de clones coloreados en placas de Petri (B2).

Figura 2: La figura muestra el desarrollo conforme al invento de la recombinación para un microorganismo relevante para la producción biotecnológica de moléculas de bajo peso molecular. Mediante unos análisis de secuencias se identifican recombinasas (c1), que se incorporan en apropiados vectores de expresión (c2.1). Después de unas etapas que dan lugar en el anfitrión a una alta expresión de recombinasas y capacitan al anfitrión para la recepción del ADN (c2.2 - c2.4), se añade el ADN monocatenario o ADN bicatenario (c2.5) y se selecciona en cuanto a un apropiado fenotipo de la cepa de ensayo (c2.6). Finalmente, en todo el ensayo en cuanto a recombinación (c2) se efectúa todavía su optimización (c3).

Figura 3: La recombinación conforme al invento acoplada con un análisis citométrico de los productos mediante sensores de metabolitos para el aislamiento de organismos productores de metabolitos microbianos y el ulterior uso de las mutaciones así identificadas para el mejoramiento de organismos productores de metabolitos ya existentes. El ADN se añadirá a las células (C1), expresará la recombinasa y contendrá el plásmido sensor con el sensor de metabolitos. En las células se efectúa mediante una recombinasa una incorporación del ADN añadido junto con los genes mutados G1 - Gn con las mutaciones M1-Mm. Unas células con una elevada formación del producto y una fluorescencia elevada con ello se aíslan (C2) mediante una citometría de flujo de alto caudal de paso y selección (FACS), y se proporciona de esta manera una célula para la identificación de las mutaciones, que conduce a una mejorada formación de metabolitos (C3). Eventualmente esta célula constituye también ya una mejorada productora de metabolitos. Con conocidos procedimientos se somete a secuenciación el genoma o plásmido de la célula resultante a partir de la etapa C3 para la identificación de las mutaciones M1-Mm en los genes G1-Gn (C3.A), con el fin de introducir éstas según conocidos procedimientos (C3.B) en organismos productores de metabolitos ya existentes para su mejoramiento ulterior (C3.C).

Ejemplo 1: Identificación de una recombinasa

Con la secuencia de RecT procedente del profago Rac de *Escherichia coli*, depositada bajo el número de acceso CAD61789.1 en el Banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Md., EE.UU.) se llevó a cabo un rastreo de homología con el programa Blast, BLAST 2.2.27+ (Wheeler, David; Bhagwat, Medha (2007). "Chapter 9, BLAST QuickStart". In Bergman, Nicholas H. Comparative genomics Volumes 1 and 2. Methods in Molecular Biology. 395-396. Totowa, NJ: Humana Press). El rastreo de homología se efectuó frente a todas las proteínas, que se codifican en los genomas de las siguientes especies de *Corynebacterias*: *C. accolens*, *C. ammoniagenes*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. bovis*, *C. Diphtheriae*, *C. Efficiens*, *C. Genitalium*, *C. Glucuronolyticum*, *C. glutamicum*, *C. jeikeium*, *C. kroppenstedtii*, *C. lipophiloflavum*, *C. Matruchotii*, *C. nuruki*, *C. pseudogenitalium*, *C. pseudotuberculosis*, *C. resistens*, *C. striatum*, *C. Tuberculoostearicum*, *C. ulcerans*, *C. urealyticum* y *C. variabile*.

Como resultado se obtuvo la secuencia cauri_1962, que codifica una proteína con una longitud de 272 aminoácidos, de la que un 41% era idéntica y un 61% era similar a la secuencia de RecT. La secuencia de ADN procedente de *C. aurimucosum*, determinada de esta manera, que contiene el gen de recombinasa recT, es como se indica en SEQ ID No. 1 y la secuencia de proteínas es como se indica en SEQ ID No. 2.

Ejemplo 2: Clonación de recombinasas

La clonación de recombinasas se efectuó en el vector de expresión pCLTON2 (A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. Plasmid. 2012 68(2):142-7), así como en el vector pEKEx3 (The E2 domain of OdhA of *Corynebacterium glutamicum* has succinyltransferase activity dependent on lipoyl residues of the acetyltransferase AceF. Hoffelder M, Rasch K, van Ooyen J, Eggeling L. J Bacteriol. 2010; 192(19):5203-11).

Ejemplo 2a: Producción de pCLTON2-bet

Para la clonación de Bet se aisló el vector pSIM8 (Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. Enterica*, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. Methods Enzymol. 2007;421:171-99) con el plásmido de QIAGEN Plus Maxi Kit (Nº de encargo 12963) procedente de *E. coli*. Este plásmido sirvió como molde para la amplificación por PCR con los pares de cebadores bet-F y bet-R.

```
bet-F      aaggagatatagatATGAGTACTGCACTCGCAAC
bet-R      TCATGCTGCCACCTTCTGCTC
```

El resultante fragmento de 0,8 kb se aisló mediante aislamiento en gel con el Minielute Extraktions Kit (Nº de encargo 28704) de Quiagen, se completó con el fragmento de Klenow, y a continuación se fosforiló con la T4 polinucleótidoquinasas de Fermentas (Nº de encargo EK0031). El vector pCLTON2 (A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. Plasmid. 2012 68(2):142-7) se cortó con SmaI y se desfosforiló con la fosfatasa alcalina de camarón de Fermentas (Nº de encargo EF0511). El fragmento y el vector se ligaron con el estuche Rapid DNA Ligation Kit de Roche (Nº de encargo 11 635 379 001), y con ellos se transformaron las *E. coli* DH5. Las células transformadas se sembraron en placas sobre 100 ng/ml de un medio complejo que contenía espectinomicina.

Para el ensayo en cuanto a deseados productos de ligación se llevó a cabo una PCR de colonias con los pares de cebadores Pcl_fw y Pcl_rv-pEKEx2_fw.

se describe en el Ejemplo 2a, se ligó con pCLTON2, y se transformaron con ellos E. coli DH5. Las células transformadas se sembraron en placas sobre 100 ng/ml de un medio complejo que contenía espectinomicina.

- 5 Para el ensayo en cuanto a deseados productos de ligación se llevó a cabo una PCR de colonias tal como se describe en el Ejemplo 2a. A partir de un clon que proporcionó un producto de PCR con el tamaño de 1,22 kb, se preparó a gran escala un plásmido. El plásmido se designó como pCLTON2-rCau, cuya secuencia se designó como SEQ ID No. 7.

Ejemplo 2f: Producción de pEKEx3-recT

- 10 Para la clonación de recT en pEKEx3 se empleó como molde para la amplificación por PCR el pCLTON2-recT procedente del Ejemplo 2b. El gen se amplificó con los pares de cebadores BgIII-RBS-RecT-F y EcoRI-RecT-R.

BgIII-RBS-RecT-F	gcgagatctaaggagatatacatATGACTAAGCAACCAATCG
EcoRI-RecT-R	gcgcgaattccaggCTGAATTATTCCTC

- 15 El resultante fragmento de 0,84 kb se aisló por medio de un aislamiento en gel con el estuche Minielute Extraktions KIT (Nº de encargo 28704) de Quiagen, se trató con el fragmento de Klenow, y a continuación se fosforiló con T4 polinucleótidoquinasa de Fermentas (Nº de encargo EK003). El vector pEKEx3 se cortó con EcoRI y BamHI, y el resultante fragmento de 8.298 pb se desfosforiló con la fosfatasa alcalina de camarón de Fermentas (Nº de encargo EF0511). El fragmento y el vector se ligaron con el estuche Rapid ADN Ligation Kit de Roche (Nº de encargo 11 635 379 001), y se transformaron con ellos E. coli DH5. Las células transformadas se sembraron en placas sobre 100 ng/ml de un medio complejo que contenía espectinomicina.

- 20 Para el ensayo en cuanto a deseados productos de ligación se llevó a cabo una PCR de colonias con los pares de cebadores col-pEKEx3-F y col-pEKEx3-R.

col-pEKEx3-F	CGCCGACATCATACGGTTCTG
col-pEKEx3-R	TTATCAGACCGCTTCTGCGTTC

- 25 A partir de un clon, que proporcionó un producto de PCR con el tamaño de 1,71 kb, se preparó a gran escala un plásmido con el estuche QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (Nº de encargo 12963). El plásmido se designó como pEKEx3-recT, cuya secuencia se designó como SEQ ID No. 8.

Ejemplo 2g: Producción de pEKEx3-bet

- 30 Para la clonación de la recombinasa Bet se empleó como molde para la amplificación por PCR el pCLTON2-rCau procedente del Ejemplo 2e. El gen se amplificó con los pares de cebadores BgIII-RBS-bet-F y EcoRI-bet-R.

BgIII-RBS-bet-F	cggcagatctaaggagatatacatATGAGTACTGCACTCGCAAC
EcoRI-bet-R	gcgcggaattCATGCTGCCACCTTCTGC

- 35 El resultante fragmento de 0,81 kb se aisló por medio de un aislamiento en gel con el estuche Minielute Extraktions Kit (Nº de encargo 28704) de Quiagen, se trató con el fragmento de Klenow, y a continuación se fosforiló con la T4 polinucleótidoquinasa de Fermentas (Nº de encargo EK0031). El vector pEKEx3 se cortó con EcoRI y BamHI, y el resultante fragmento de 8.298 pb se desfosforiló con la fosfatasa alcalina de camarón de Fermentas (Nº de encargo EF0511). El fragmento y el vector se ligaron con el estuche Rapid ADN Ligation Kit de Roche (Nº de encargo 11 635 379 001), y se transformaron con ellos E. coli DH5. Las células transformadas se sembraron en placas sobre 100 ng/ml de un medio complejo que contenía espectinomicina.

- 40 Para el ensayo en cuanto a deseados productos de ligación se llevó a cabo, tal como en el Ejemplo 2e, una PCR de colonias con los pares de cebadores col-pEKEx3-F y col-pEKEx3-r. A partir de un clon, que proporcionó un producto de PCR con el tamaño de 1,08 kb, se preparó a gran escala un plásmido con el estuche QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (Nº de encargo 12963). El plásmido se designó como pEKEx3-bet, cuya secuencia se designó como SEQ ID No. 9.
- 45

Ejemplo 3: Producción de una cepa de ensayo

Con el fin de incorporar una copia no funcional de un gen que confiere resistencia a kanamicina en el cromosoma de *C. glutamicum* ATCC13032, se produjeron en primer lugar con los pares de cebadores Scal-KanR-F / Kan(-)-L-R y Muni-R-R / Kan(-)-R-F dos fragmentos de PCR que se habían de fusionar con el vector pJC1 (Cremer J, Treptow C, Eggeling L, Sahm H. Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium*. J Gen Microbiol. 1988;134(12):3221-9) como molde.

Scal-KanR-F	CGAGTACTACAAACGCGGCCATAAC
Kan(-)-L-R	GTCGGAAGAGGCATAGAATTCCGTCAGCCAGTTTAG
Kan(-)-R-F	GCTGACGGAATTCTATGCCTCTTCCGACCATC
Muni-R-R	ATACAATTGAACAAAGCCGCGTCC

Ambos fragmentos de PCR resultantes se purificaron con el estuche Minielute Extraktions Kit (Nº de encargo 28704) de Quiagen y se fusionaron en una PCR de fusión con los pares de cebadores Scal-KanR-F / Muni-R-R para dar el defectuoso gen de resistencia a kanamicina. Éste contiene en posición 234 como nucleótido adicional una citosina, con lo que presenta un desplazamiento de marco y el gen no se lee completamente. El resultante producto se restringió con Scal y MuniI y a continuación se clonó en el pK18mobsacB-lysOP7 cortado con EcoRI y Scal (Acetohydroxyacid synthase, a novel target for improvement of L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Blombach B, Hans S, Bathe B, Eikmanns BJ. Appl Environ Microbiol. Ene 2009;75(2):419-427). En este vector el defectuoso gen de resistencia a kanamicina está flanqueado por dos zonas no codificadas del genoma de *C. glutamicum*, a través de las cuales se efectúa la integración homóloga en el genoma. A continuación se integró toda la casete en el genoma de *C. glutamicum* entre las posiciones 1.045.503 hasta 1.045.596 según procedimientos conocidos a través de una selección doblemente positiva (Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Gene. 22 Jul 1994;145(1):69-73). La correcta integración del defectuoso gen de resistencia a kanamicina en el cromosoma se comprobó con los pares de cebadores colNCR-L2 y colNCR-R2. El tamaño del fragmento de PCR fue de 3937 pb.

colNCR-L2:	CATTGGTCACCTTTGGCGTGTGG
colNCR-R2:	AATCAATGAGCGCCGTGAAGAAGG

Ejemplo 4: Ensayo en cuanto a actividad de recombinasa

La transformación de la cepa de ensayo se efectuó tal como se describe en la referencia de Tauch y colaboradores para *Corynebacterium diphtheriae* y *C. glutamicum* (Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGC1. Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Götter S, Pühler A, Kalinowski J. Curr Microbiol. Nov de 2002;45(5):362-367). La cepa se hizo competente y en cada caso se emplearon 0,5 microgramos del vector que codificaba la recombinasa para la electroporación. Unos clones resistentes a espectinomicina se seleccionaron sobre el medio complejo de infusión de corazón - cerebro - sorbitol, BHIS, (High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. Liebl W, Bayerl A, Schein B, Stillner U, Schleifer KH. FEMS Microbiol Lett. Dic 1989;53(3):299-303), que contenía 100 microgramos de espectinomicina (BHIS-Spec100).

En cada caso un clon de la cepa de ensayo, que contenía el vector pCLTON2-bet, pCLTON2-recT, pCLTON2-gp43, pCLTON2-gp61, pCLTON2-rCau, pEKEx3-recT, o respectivamente pEKEx3-bet, se inoculó en 50 ml de BHIS-Spec100 y se cultivó durante una noche a 130 rpm y 30 °C en el matraz de Erlenmeyer. A la mañana siguiente se inocularon 500 ml de BHIS-Spec100 + IPTG (0,5 mM en el caso de utilizarse pEKEx3-recT, pEKEx3-bet) o de tetraciclina (250 ng / ml en el caso de utilizarse pCLTON2-bet, pCLTON2-recT, pCLTON2-gp43, pCLTON2-gp61, pCLTON2-rCau) con 10 ml del medio incubado durante una noche y se cultivaron durante 4 hasta 6 h para conseguir una OD (densidad óptica) de 1,5 hasta 2. A continuación, el cultivo se enfrió durante 30 min sobre hielo, se lavó dos veces con 50 ml de glicerol al 10 %, con Tris 1 mM de pH 8 y a continuación dos veces con glicerol al 10 %. El sedimento celular se llevó a reflujo y se resuspendió en 1 ml adicional de glicerol al 10 %, se repartió en partes alícuotas cada una de 150 µl, se congeló bruscamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -75 °C hasta el consumo. Para el consumo, las células, en el transcurso de 20 min, se descongelaron moderadamente sobre hielo, y se mezclaron con 1 µg de ADN.

Como ADN se empleó el oligo Kan100*, con la secuencia
 ATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAAATTCGTC
 AGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGC. Este ADN se sintetizó en el operón MWG de Eurofin (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Alemania).

La suspensión de células y 1 microgramo de ADN se transfirieron a cubetas de electroporación y se cubrieron

cuidadosamente con 800 µl de glicerol al 10 % enfriado con hielo y a continuación se sometieron a electroporación. Para la regeneración, las células se transfirieron inmediatamente a 4 ml de BHIS atemperado previamente a 46 °C y se incubaron durante 6 min a 46 °C. A continuación se efectuó una cultivación durante 1 hasta 6 horas a 30 °C y 170 rpm en 15 ml de Falcon. Después de ello las células se transfirieron a BHIS, que contenía 50 microgramos por mililitro de kanamicina. El resultado se representa en la Tabla 1. Se pone de manifiesto que, por cada tanda, como máximo 57 células son resistentes espontáneamente a kanamicina, la más alta frecuencia de recombinación de 20.054 clones se obtuvo con pEKEx3-recT, y una actividad de recombinasa decreciente se obtuvo con pCLTON2-recT, pEKEx3-bet, pCLTON2-rCau, y pCLTON2-gp61. La actividad de recombinasa con pCLTON2-gp43 se sitúa apenas sobre la de fondo, y el pCLTON2-bet no es activo.

10 Ejemplo 5: Optimización de la actividad de recombinasa

La cepa de ensayo con pEKEx3-recT se inoculó en 50 ml de BHIS-Spec100 y se cultivó durante una noche a 130 rpm y 30 °C en el matraz de Erlenmeyer. A la mañana siguiente se inocularon 500 ml de BHIS-Spec100 + 0,5 mM de IPTG con 10 ml del medio incubado durante una noche y se cultivaron durante 0, 1 o 4 horas. La cepa de ensayo con pCLTON2-recT se inoculó en 50 ml de BHIS-Spec100 y durante una noche a 130 rpm y 30 °C en el matraz de Erlenmeyer. A la mañana siguiente se inocularon 500 ml de BHIS-Spec100 + 250 nanogramos de tetraciclina con 10 ml del medio incubado durante una noche y se cultivaron durante 0, 1 o 4 horas. A continuación, el cultivo se enfrió sobre hielo durante 30 min, se lavó dos veces con 50 ml de glicerol al 10 %, con Tris 1 mM de pH 8 y a continuación dos veces con glicerol al 10 %. El sedimento celular se llevó a reflujó y se resuspendió en 1 ml adicional de glicerol al 10 %, se repartió en partes alícuotas cada una de 150 µl, se congeló bruscamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -75 °C hasta el consumo. Para el consumo, las células, en el transcurso de 20 min, se descongelaron moderadamente sobre hielo, y se mezclaron con 1 microgramo de ADN.

La electroporación y la regeneración se efectuaron tal como se describe en el Ejemplo 4. La Tabla 2 pone de manifiesto que, después de una inducción durante 4 horas en el caso del uso de la recombinasa recT, en el vector pEKEx3-recT se presenta una máxima frecuencia de recombinación.

Para la ulterior optimización se usaron células de la cepa de ensayo con pEKEx3-recT tal como antes, pero se añadieron cantidades crecientes de ADN. La Tabla 3 pone de manifiesto que en el caso del uso de la recombinasa recT, en el vector pEKEx3-recT con una concentración de 10 microgramos de ADN se presenta una máxima frecuencia de recombinación.

Ejemplo 6: Obtención de una productora de lisina por recombinación en el gen lysC con una molécula de ADN

Para el aislamiento directo de una cepa productora de lisina de modo aumentado, partiendo de una cepa de partida, se transformó *C. glutamicum* ATCC13032 con el nanosensor pSenLys. El nanosensor pSenLys se describe en el documento WO2011138006. Unas células de la resultante cepa se transformaron con pEKEx3-recT y la recombinasa se indujo tal como se describe en el Ejemplo 4. El ADN lysC-100* se sintetizó en el operón MWG de Eurofin (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Alemania). Él se ha depositado como SEQ ID No. 32. lysC-100*:

TCTTCAAGATCTCCATCGCGCGGCGGCCGTGCGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATATC
GGTGGTGCCGTCTTCTACAGAAGAGACGTTCTGCAGAACCAT

10 microgramos del ADN lysC-100* se transfirieron mediante electroporación, tal como se describe en el Ejemplo 4, a la cepa (Figura 1, C1). A continuación se efectuó una regeneración de la cepa durante 4 horas en BHIS 100 microgramos por mililitro de espectinomicina. A continuación las células se separaron por centrifugación y se resuspendieron en 700 microlitros de CGXII-glucosa. Este medio mínimo se describe en la referencia de Keilhauer y colaboradores (Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the ilvB-ilvN-ilvC operon. Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H. J Bacteriol. Sep de 1993;175(17):5595-603). Las células se incubaron hasta alcanzar la fase estacionaria durante 40 horas a 30 grados Celsius. Después de ello se sobreinoculó a 1:10 en un nuevo medio de CGXII-glucosa, se incubó durante 4 horas, y la suspensión de células se aportó al análisis citométrico de los productos y a la selección de células individuales (Figura 2, C2).

Para el análisis por citometría de flujo y la clasificación de las células con una alta fluorescencia, la suspensión de células se ajustó en un medio de CGXII-glucosa a una densidad óptica por debajo de 0,1, e inmediatamente se aportó al clasificador de células ARIA II high-speed cell sorter (Becton Dickinson GmbH, Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg). El análisis se efectuó con las longitudes de onda de excitación de 488 y 633 nm y la detección se efectuó con las longitudes de onda de emisión de 530 ± 15 nm y de 660 ± 10 nm a una presión de las muestras de 70 psi. Los datos se analizaron con el programa lógico Software-Version BD diVA 6.1.3 perteneciente al aparato. La "gating" (puesta a puerta) electrónica se ajustó con ayuda del "forward and backward scatter" (difusor hacia adelante y hacia atrás), con el fin de excluir las partículas no bacterianas. Con el fin de clasificar células positivas para EYFP,

el siguiente escalón de la “gating” electrónica se escogió con el fin de excluir células no fluorescentes. De esta manera se clasificaron y separaron 51 células fluorescentes en unas placas de Petri que contenían el medio BHIS.

La placa de Petri se incubó durante 30 horas a 30 grados Celsius, y a continuación se incubó en cada caso con un clon uno de los 46 recipientes de reacción de la placa de microtitulación Flowerplate (de 48 pocillos) del sistema de cultivación BioLector (m2plabs GmbH, Aachen, Alemania). Cada recipiente de reacción contenía 0,7 microlitros de CGXII-glucosa. Uno de los recipientes de reacción se inoculó con un testigo negativo, y otro de ellos se inoculó con un testigo positivo. A continuación, la placa de microtitulación se incubó a 30°C, con 1.200 rpm (revoluciones por minuto), radio de sacudimiento 3 mm durante 2 días. En el sistema de cultivación BioLector se registró “online” el crecimiento como luz dispersada a 620 nm, así como se registró continuamente la fluorescencia del cultivo con una longitud de onda de excitación de 485 nm y con una longitud de onda de emisión de 520 nm.

Después de 2 días se determinó la fluorescencia específica de los cultivos a partir de los datos registrados. Ella se había aumentado, en 33 cultivos clonales, hasta por lo menos el cuádruplo con respecto al testigo negativo. De 12 de estos cultivos se determinó la secuencia de lysC en el genoma. En todos los casos, la citosina en la posición 932 del gen se había intercambiado por una timidina. La secuencia correspondía por consiguiente a la región de secuencias que se presentaba en el oligo lysC-100* sintetizado y conduce a la formación de lisina en el caso de *C. glutamicum* (Binder y colaboradores Genome Biology 2012, 13:R40).

Ejemplo 7: Obtención de una productora de lisina por recombinación en el gen murE con varias moléculas de ADN al mismo tiempo

Para el aislamiento directo de una cepa que produce lisina de modo aumentado, partiendo de una cepa de partida mediante mutaciones murE, se usó la cepa de partida *C. glutamicum* ATCC13032 descrita en el Ejemplo 6 con pSenLys y pEKEx3-recT. Los oligos de ADN murE individuales se sintetizaron mediante el operón MWG de Eurofin (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Alemania). Se usaron las siguientes secuencias murE: murEG81amb*, SEQ ID No. 12; murEG81A*, SEQ ID No. 13; murEG81C*, SEQ ID No. 14; murEG81D*, SEQ ID No. 15; murEG81E*, SEQ ID No. 16; murEG81F*, SEQ ID No. 17; murEG81H*, SEQ ID No. 18; murEG81I*, SEQ ID No. 19; murEG81K*, SEQ ID No. 20; murEG81L*, SEQ ID No. 21; murEG81M*, SEQ ID No. 22; murEG81N*, SEQ ID No. 23; murEG81P*, SEQ ID No. 24; murEG81Q*, SEQ ID No. 25; murEG81R*, SEQ ID No. 26; murEG81S*, SEQ ID No. 27; murEG81T*, SEQ ID No. 28; murEG81V*, SEQ ID No. 29; murEG81W*, SEQ ID No. 30; murEG81Y*, SEQ ID No. 31.

En cada caso se sacó 1 microgramo de estos oligos de ADN, y los resultantes 20 microgramos se mezclaron con una parte alícuota de células y se transfirieron mediante electroporación a la cepa tal como se describe en el Ejemplo 4 (Figura 2, C1). A continuación se efectuó la regeneración de las células con las subsiguientes cultivaciones y el análisis por citometría de flujo y la clasificación de las células (Figura 2, C2) tal como se describe en el Ejemplo 5.

De esta manera se clasificaron y separaron 62 células fluorescentes en placas de Petri, que contenían el medio BHIS. La placa de Petri se incubó durante 30 horas a 30 grados Celsius, y a continuación se incubó en cada caso con un clon uno de los 46 recipientes de reacción de la placa de microtitulación Flowerplate (de 48 pocillos) del sistema de cultivación BioLector (m2plabs GmbH, Aachen, Alemania). Cada recipiente de reacción contenía 0,7 microlitros de CGXII-glucosa. Uno de los recipientes de reacción se inoculó con un testigo negativo, y otro de ellos se inoculó con un testigo positivo. A continuación la placa de microtitulación se incubó a 30°C, con 1.200 rpm, un radio de sacudimiento de 3 mm durante 2 días. En el sistema de cultivación BioLector se registró “online” el crecimiento como luz dispersada a 620 nm, así como se registró continuamente la fluorescencia del cultivo con una longitud de onda de excitación de 485 nm y con una longitud de onda de emisión de 520 nm.

Después de 2 días se determinó la fluorescencia específica de los cultivos a partir de los datos registrados. Ella se había aumentado en 33 cultivos clonales hasta por lo menos el cuádruplo con respecto al testigo negativo. De 21 cultivos se efectuó para la verificación de la formación del producto (Figura 2, C3) todavía una determinación de L-lisina en el medio. La determinación de lisina se efectuó como un derivado de o-ftaldialdehído mediante una cromatografía de fase líquida de alto rendimiento con un sistema uHPLC 1290 Infinity (Agilent) en una columna de fase inversa Zorbax Eclipse AA C18 3.5 micron 4.6 x 75 mm y un detector de fluorescencia. Como eluyente se usó un gradiente de borato de Na 0,01 M de pH 8.2 con una concentración creciente de metanol, y la detección de los derivados de isoindol fluorescentes se efectuó con una longitud de onda de excitación de 230 nm y con una longitud de onda de emisión de 450 nm. Se determinaron los valores de L-lisina mostrados en la Tabla 4, que ponen de manifiesto una mejoría de la formación de L-lisina con respecto a los de la cepa de partida.

De estos 21 clones se determinó la secuencia de murE en el genoma. La secuenciación se efectuó después de la amplificación por PCR en el operón MWG de la empresa Eurofin (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Alemania). Las mutaciones obtenidas se recopilan en la Tabla 4. Se pone de manifiesto que de esta manera se obtuvieron 10 diferentes mutaciones murE partiendo de la cepa de partida, de las cuales nueve condujeron a una formación de lisina aumentada con respecto a la de la cepa de partida. Las secuencias de los alelos murE obtenidos son SEQ ID

No. 33, murEG81W; SEQ ID No. 34, murEG81Y; SEQ ID No. 35, murEG81N; SEQ ID No. 36, murEG81C; SEQ ID No. 37, murEG81S; SEQ ID No. 38, murEG81F; SEQ ID No. 39, murEG81V; SEQ ID No. 40, murEG81L; SEQ ID No. 41, murEG81H; SEQ ID No. 42, murEG81I; SEQ ID No. 43, murEG81T; y SEQ ID No. 44, murEG81 R.

5 Tabla 1. Comparación de las actividades de recombinasa en *Corynebacterium glutamicum*

Vector	cfu ^a (rec)	cfu (spont)
pCLTON2-bet	8	0
pCLTON2-recT	12513	31
pCLTON2-gp43	97	57
pCLTON2-gp61	306	1
pCLTON2-rCau	2475	7
pEKEx3-recT	20054	44
pEKEx3-bet	6491	12

^a cfu (rec) indica el número de clones resistentes a kanamicina que han resultado por recombinación con el oligo Kan*; cfu (spont) es el número de clones espontáneamente resistentes a kanamicina que han procedido de una tanda testigo, que contenía agua en vez del oligo Kan. Se puede reconocer manifiestamente que con la recombinasa recT se consigue en pEKEx3-recT o también en pCLTON2-recT una alta eficiencia de recombinación. También con la recombinasa rCau procedente de *Corynebacterium aurimucosum* se consigue una muy alta eficiencia de recombinación, que está situada manifiestamente por encima de la de los clones espontáneamente resistentes.

Tabla 2. Comparación de actividades de recombinasa después de diferentes tiempos de inducción

Vector	Tiempo de inducción (h)	cfu ^a (rec)	cfu (spont)
pCLTON2-recT	0	101	2
pCLTON2-recT	1	816	1
pCLTON2-recT	4	8831	6
pEKEx3-recT	0	1238	6
pEKEx3-recT	1	53460	7
pEKEx3-recT	4	33165	7

^a cfu (rec) y cfu (spont) son como en la Tabla 1. La influencia del tiempo de inducción para la expresión de la recombinasa sobre la eficiencia de recombinación se puede reconocer manifiestamente.

10

Tabla 3. Comparación de actividades de recombinasa en el caso de emplearse una diversa cantidad de ADN

Vector	Cantidad (µg)	Cfu (rec)
pEKEx3-recT	0	13
pEKEx3-recT	0,05	1139
pEKEx3-recT	0,1	2673
pEKEx3-recT	0,5	25080
pEKEx3-recT	1	15840
pEKEx3-recT	5	301950
pEKEx3-recT	10	950400
pEKEx3-recT	25	940500
pEKEx3-recT	50	871200
pEKEx3-recT	100	831600

^a cfu (rec) y cfu (spont) son como en la Tabla 1. Se puede reconocer manifiestamente cómo la cantidad de ADN añadida a la tanda de recombinación aumenta la frecuencia de recombinación. En el caso de 10 microgramos de ADN se consigue la máxima frecuencia de recombinación.

Tabla 4. Resultado de la secuenciación de alelos de murE en unos clones, que se habían obtenido por recombinación y análisis citométrico directo de los productos mediante el nanosensor (Figura 3) y después de la verificación (Figura 3, C3.B), así como la formación de lisina y la fluorescencia en cultivos de éstos.

Cepa	Codón 241-243 de murE	Aminoácido 81 de murE	Fluorescencia (AU)	Lisina (mM)
Cepa de partida	GGA	(G) Glicina	0,07	0
I.4	TGG	(W) Triptófano	1,80	11
I.6	TAC	(Y) Tirosina	1,17	9
I.7	AC	(N) Asparagina	0,73	5
I.24	TTC	(F) Fenilalanina	1,36	8
I.25	TGC	(C) Cisteína	1,08	7
I.34	CTG	(L) Leucina	1,83	12
II.1	CAC	(H) Histidina	0,46	1
II.4	GTG	(V) Valina	1,47	9
II.5	ACC	(T) Treonina	0,47	1
II.24	ATC	(I) Isoleucina	1,85	10
II.23	CGC	(R) Arginina	2,05	10

5

Secuencias según el protocolo de secuencias:

SEQ ID	Nombre
SEQ ID No. 1	Gen de recombinasa
SEQ ID No. 2	Recombinasa
SEQ ID No. 3	pCLTON2-bet
SEQ ID No. 4	pCLTON2-recT
SEQ ID No. 5	pCLTON2-gp43
SEQ ID No. 6	pCLTON2-gp61
SEQ ID No. 7	pCLTON2-rCau
SEQ ID No. 8	pEKEx3-recT
SEQ ID No. 9	pEKEx3-bet
SEQ ID No. 10	gp43 adaptado
SEQ ID No. 11	gp61 adaptado
SEQ ID No. 12	murEG81amb*
SEQ ID No. 13	murEG81A*
SEQ ID No. 14	murEG81C*
SEQ ID No. 15	murEG81D*
SEQ ID No. 16	murEG81E*
SEQ ID No. 17	murEG81F*
SEQ ID No. 18	murEG81H*
SEQ ID No. 19	murEG81I*
SEQ ID No. 20	murEG81K*
SEQ ID No. 21	murEG81L*
SEQ ID No. 22	murEG81M*
SEQ ID No. 23	murEG81N*
SEQ ID No. 24	murEG81P*
SEQ ID No. 25	murEG81Q*
SEQ ID No. 26	murEG81R*

SEQ ID	Nombre
SEQ ID No. 27	murEG81S*
SEQ ID No. 28	murEG81T*
SEQ ID No. 29	murEG81V*
SEQ ID No. 30	murEG81W*
SEQ ID No. 31	murEG81Y*
SEQ ID No. 32	lyse-100*
SEQ ID No. 33	murEG81W
SEQ ID No. 34	murEG81Y
SEQ ID No. 35	murEG81N
SEQ ID No. 36	murEG81C
SEQ ID No. 37	murEG81S
SEQ ID No. 38	murEG81F
SEQ ID No. 39	murEG81V
SEQ ID No. 40	murEG81L
SEQ ID No. 41	murEG81H
SEQ ID No. 42	murEG81I
SEQ ID No. 43	murEG81T
SEQ ID No. 44	murEG81R

LISTA DE SECUENCIAS

110> Forschungszentrum Jülich GmbH

- 5 <120> Procedimiento para la identificación de una célula con una concentración intracelular, aumentada en comparación con la de su tipo salvaje, de un determinado metabolito, consiguiéndose por recombinación la modificación de la célula, así como un procedimiento para la producción de una célula productora modificada genéticamente con respecto a su tipo salvaje, con producción optimizada de un determinado metabolito, un procedimiento para la preparación de este metabolito, así como ácidos nucleicos apropiados para ello

<130> PT1.2597

<160> 44

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

5 < 211> 819

< 212> ADN

< 213> Corynebacterium aurimucosum

<400> 1

ctaggcggct tcgccctcag cgggcttact atccaccact tccccatcca cgtgctgcgg	60
atagtcaagg gcggattcgg ataggtctac acgcactggt tcgtccgctg cgataccccg	120
atctaggctg gtagatgacg gcatccactt cgcgagctgg cgtacacagg tcttggtggc	180
catagcgtca aaattgtcag cccacgggcc aaacacttca ccttgcttgt tcttagcctt	240
ggcgaattca tcacggtagg ccagcatttc gtccttactc atgacgatga agctgtgtcc	300
cccgtgtgtg aacttagcta ccgcgtagta ggcgattggg ttgcccttcg gaccgttcat	360
gcatggcttg tggacaagct tgtcatccag cccatagtca acgtcaaagt ggtcgttggc	420
gtacacggtg cgggcgataa gcgactgaat ctgcccagag cgggtgagcca gctcaactaa	480
gccacggtaa ccaaccacaa gttgagccac catgccgccc tgcttcctat cccagaatgg	540
cagcaggtaa gcatggccta gtacgccggg acgcaaacca agctgggagc acgtcatgag	600
tccaccaggt acggactgtg ggggtgattc tgcaagcttc ggggtttggc gcaggcaggt	660
aagcgcatca cgtactagct gctgtgcctc catgcccttt ggcattgcga gctggaattg	720
tgattccatg cttcggattt ggtctgccag ggtgacgggg cgattctgct tagccggggc	780
gttggttagcg gccatacgct gctctagatt gtttcccat	819

10 <210> 2

< 211> 272

< 212> PRT

< 213> Corynebacterium aurimucosum

<400> 2

Met Gly Asn Asn Leu Glu Gln Arg Met Ala Ala Asn Asn Ala Pro Ala
1 5 10 15

15

Lys Gln Asn Arg Pro Val Thr Leu Ala Asp Gln Ile Arg Ser Met Glu
20 25 30

ES 2 643 014 T3

Ser Gln Phe Gln Leu Ala Met Pro Lys Gly Met Glu Ala Gln Gln Leu
35 40 45
Val Arg Asp Ala Leu Thr Cys Leu Arg Gln Thr Pro Lys Leu Ala Glu
50 55 60
Cys Thr Pro Gln Ser Val Leu Gly Gly Leu Met Thr Cys Ser Gln Leu
65 70 75 80
Gly Leu Arg Pro Gly Val Leu Gly His Ala Tyr Leu Leu Pro Phe Trp
85 90 95
Asp Arg Lys Gln Gly Gly Met Val Ala Gln Leu Val Val Gly Tyr Arg
100 105 110
Gly Leu Val Glu Leu Ala His Arg Ser Gly Gln Ile Gln Ser Leu Ile
115 120 125
Ala Arg Thr Val Tyr Ala Asn Asp His Phe Asp Val Asp Tyr Gly Leu
130 135 140
Asp Asp Lys Leu Val His Lys Pro Cys Met Asn Gly Pro Lys Gly Asn
145 150 155 160
Pro Ile Ala Tyr Tyr Ala Val Ala Lys Phe Thr Thr Gly Gly His Ser
165 170 175
Phe Ile Val Met Ser Lys Asp Glu Met Leu Ala Tyr Arg Asp Glu Phe
180 185 190
Ala Lys Ala Lys Asn Lys Gln Gly Glu Val Phe Gly Pro Trp Ala Asp
195 200 205
Asn Phe Asp Ala Met Ala His Lys Thr Cys Val Arg Gln Leu Ala Lys
210 215 220
Trp Met Pro Ser Ser Thr Asp Leu Asp Arg Gly Ile Ala Ala Asp Glu
225 230 235 240
Thr Val Arg Val Asp Leu Ser Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Pro Gln His
245 250 255
Val Asp Gly Glu Val Val Asp Ser Lys Pro Ala Glu Gly Glu Ala Ala
260 265 270

<210> 3
< 211> 4100
5 < 212> ADN
< 213> Escherichia coli

<400> 3
ggctcgactct agaggatccc caaggagata tagatatgag tactgcactc gcaacgctgg

60

ES 2 643 014 T3

ctgggaagct	ggctgaacgt	gtcggcatgg	attctgtcga	cccacaggaa	ctgataacca	120
ctcttcgcca	gacggcattt	aaaggtgatg	ccagcgatgc	gcagttcatc	gcattactga	180
tcgttgccaa	ccagtagcgc	cttaatccgt	ggacgaaaga	aattttacgcc	tttcctgata	240
agcagaatgg	catcgttccg	gtggtgggcg	ttgatggctg	gtcccgcatc	atcaatgaaa	300
accagcagtt	tgatggcatg	gactttgagc	aggacaatga	atcctgtaca	tgccggattt	360
accgcaagga	ccgtaatcat	ccgatctgcg	ttaccgaatg	gatggatgaa	tgccgccgcg	420
aaccattcaa	aactcgcgaa	ggcagagaaa	tcacggggcc	gtggcagtcg	catcccaaac	480
ggatgttacg	tcataaagcc	atgattcagt	gtgcccgtct	ggccttcgga	tttgctggta	540
tctatgacaa	ggatgaagcc	gagcgcattg	tcgaaaatac	tgcatatact	gcagaacgtc	600
agccggaacg	cgacatcact	ccggttaacg	atgaaaccat	gcaggagatt	aacactctgc	660
tgatcgccct	ggataaaaaca	tggtgatgacg	acttattgcc	gctctgttcc	cagatatttc	720
gccgcgacat	tcgtgcatcg	tcagaactga	cacaggccga	agcagtaaaa	gctcttgat	780
tcctgaaaca	gaaagccgca	gagcagaagg	tggcagcatg	ataccgagct	cgaattcact	840
ggccgtcggt	ttacagccaa	gcttggtgtg	tttggcggtg	gagagaagat	tttcagcctg	900
atacagatta	aatcagaacg	cagaagcggg	ctgataaaac	agaatttgcc	tggcggcagc	960
agcgcgggtg	tccacactga	ccccatgccg	aactcagaag	tgaaacgccg	tagcgccgat	1020
ggtagtgtgg	ggtctcccca	tgcgagagta	gggaactgcc	aggcatcaaa	taaaacgaaa	1080
ggctcagtcg	aaagactggg	cttttcgttt	tatctgttgt	ttgtcggtag	acgctctcct	1140
gagtaggaca	aatccgccgg	gagcggattt	gaacgttgcg	aagcaacggc	ccggagggtg	1200
gcgggcagga	cgcccgccat	aaactgccag	gcatcaaatt	aagcagaagg	ccatcctgac	1260
ggatggccct	tttgcgtttc	tacaaaactct	tttgtttatt	tttctaaata	cattcaaata	1320
tgtatccgct	catgagacaa	taaccctgat	aatgcttca	ataatattga	aaaaggaaga	1380
gtatgagtat	tcaacatttc	cgtgtcgccc	ttattccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	1440
ctgtttttgc	tcaccagaa	acgctggtga	aagtaaaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	1500
cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	gatccttgag	agttttcgcc	1560
ccgaagaacg	ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagtctt	gctatgtggc	gcggtattat	1620
cccgtgttga	cgccgggcaa	gagcaactcg	gtcgccgcat	acactattct	cagaatgact	1680
tggttgagta	attcgtaatc	atgtcatagc	tgtttcctgt	gtgaaattgt	tatccgctca	1740
caattccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	agcctggggg	gcctaagag	1800
tgagctaact	cacattaatt	gcgttgcgct	cactgcccgc	tttccagtcg	ggaaacctgt	1860
cgtgccagct	gcattaatga	atcgccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	cgtattgggc	1920
gctcttcgcg	ttcctcgctc	actgactcgc	tgcgctcggt	cgttcggctg	cggcgagcgg	1980
tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	2040
agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	2100

ES 2 643 014 T3

```

cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga 2160
ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg 2220
tgcgctctcc tgttcgacc ctgccgtta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg 2280
gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc 2340
gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 2400
gtaactatcg tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca 2460
ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc tacagagttc ttgaagtggg 2520
ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag 2580
ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg 2640
gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc 2700
ctttgatctt tctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt 2760
tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttggggggg gggggaaagc 2820
cacgttgtgt ctcaaaatct ctgatgttac attgcacaag ataaaaatat atcatcatga 2880
acaataaaac tgtctgctta cataaacagt aatacaaggg gtgttatgag ccatattcaa 2940
cgggaaacgt ctgctcgag atctatcgat tttcgttcgt gaatacatgt tataataact 3000
ataactaata acgtaacgtg actggcaaga gatattttta aaacaatgaa taggtttaca 3060
cttactttag ttttatggaa atgaaagatc atatcatata taatctagaa taaaattaac 3120
taaaataatt attatctaga taaaaaattt agaagccaat gaaatctata aataaactaa 3180
attaagttta ttaattaac aactatggat ataaaatagg tactaatcaa aatagtgagg 3240
aggatatatt tgaatacata cgaacaaatt aataaagtga aaaaaatact tcggaaacat 3300
ttaaaaaata accttatttg tacttacatg tttggatcag gagttagag tggactaaaa 3360
ccaaatagtg atcttgactt tttagtcgct gtatctgaac cattgacaga tcaaagtaaa 3420
gaaatactta tacaaaaaat tagacctatt tcaaaaaaaa taggagataa aagcaactta 3480
cgatatattg aattaacaat tattattcag caagaaatgg taccgtggaa tcatectccc 3540
aaacaagaat ttttttatgg agaattggta caagagcttt atgaacaagg atacattcct 3600
cagaagggaat taaattcaga ttaaccata atgctttacc aagcaaacg aaaaaataaa 3660
agaatatacg gaaattatga cttagaggaa ttactacctg atattccatt ttctgatgtg 3720
agaagagcca ttatggattc gtcagaggaa ttaatagata attatcagga tgatgaaacc 3780
aactctatat taactttatg ccgtatgatt ttaactatgg acacgggtaa aatcatacca 3840
aaagatatgg cgggaaatgc agtggctgaa tcttctccat tagaacatag ggagagaatt 3900
ttgttagcag ttcgtagtta tcttgagag aatattgaat ggactaatga aaatgtaaat 3960
ttaactataa actattttaa taacagatta aaaaaattat aaaaaattg aaaaaatggt 4020
ggaaacactt ttttcaattt tttgtttta ttatttaata tttgggaaat attcattcta 4080
attggtaatc agattttaga 4100

```

<210> 4

<211> 3700

<212> ADN

<213> Escherichia coli

ES 2 643 014 T3

<400> 4
 ggtcgaactct agaggatccc caaggagata tacatatgac taagcaacca ccaatcgcaa 60
 aagccgatctt gcaaaaaact cagggaaacc gtgcaccagc agcagttaaa aatagcgacg 120
 tgattagttt tattaaccag ccatcaatga aagagcaact ggcagcagct cttccacgcc 180
 atatgacggc tgaacgtatg atccgtatcg ccaccacaga aattcgtaaa gttccggcgt 240
 taggaaactg tgacactatg agttttgtca gtgcgatcgt acagtgttca cagctcggac 300
 ttgagccagg tagcgccctc ggtcatgcat atttactgcc ttttggaat aaaaacgaaa 360
 agagcggtaa aaagaacggt cagctaataca ttggctatcg cggcatgatt gatctggctc 420
 gccgttctgg tcaaatcgcc agcctgtcag cccgtgttgt ccgtgaagggt gacgagttta 480
 gcttcgaatt tggtcttgat gaaaagttaa tacaccgccc gggagaaaac gaagatgccc 540
 cggttaccca cgtctatgct gtcgcaagac tgaagacgg aggtactcag tttgaagtta 600
 tgacgcgcaa acagattgag ctgggtgcga gcctgagtaa agctggtaat aacgggccgt 660
 gggtaactca ctgggaagaa atggcaaaga aaacggctat tcgtcgccctg ttcaaatatt 720
 tgcccgatc aattgagatc cagcgtgcag tatcaatgga tgaaaaggaa ccactgacaa 780
 tcgatcctgc agattcctct gtattaaccg gggaaatacag tgtaatcgat aattcagagg 840
 aataagggtta ccgagctcga attcactggc cgtcgtttta cagccaagct tggctgtttt 900
 ggcggatgag agaagatttt cagcctgata cagattaaat cagaacgcag aagcggctctg 960
 ataaaacaga atttgccctg cggcagtagc gcggtgggtcc cacctgaccc catgccgaac 1020
 tcagaagtga aacgccgtag cgccgatggt agtgtggggt ctcccatgc gagagtaggg 1080
 aactgccagg catcaaataa aacgaaaggc tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat 1140
 ctgtgttttg tcggtgaacg ctctcctgag taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa 1200
 cgttcgaag caacggcccg gaggggtggc ggcaggacgc ccgccataaa ctgccaggca 1260
 tcaaattaag cagaaggcca tcctgacgga tggccttttt gcgtttctac aaactctttt 1320
 gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa 1380
 tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttcctg gtcgccctta 1440
 ttcccttttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag 1500
 taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca 1560
 gcggtgaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta 1620
 aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtgttgacgc cgggcaagag caactcggtc 1680
 gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtaatt cgtaatcatg tcatagctgt 1740
 ttctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa 1800

ES 2 643 014 T3

```

agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac 1860
tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg 1920
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctgcctcact gactcgctgc 1980
gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtat atacggttat 2040
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 2100
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt tttccatag gctccgcccc cctgacgagc 2160
atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc 2220
aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg 2280
gatacctgtc cgcttttctc ctttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 2340
ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg 2400
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggtat actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc 2460
acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 2520
gcggtgctac agagttcttg aagtgtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat 2580
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ctttcgaaa aagagttggt agctcttgat 2640
ccggcaaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 2700
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt 2760
ggaacgaaaa ctcacgtaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 2820
agatcctttt gggggggggg ggaaagccac gttgtgtctc aaaatctctg atgttacatt 2880
gcacaagata aaaatatatc atcatgaaca ataaaactgt ctgcttacat aaacagtaat 2940
acaaggggtg ttatgagcca tattcaacgg gaaacgtctt gctcgagatc tatcgatttt 3000
cgttcgtgaa tacatgttat aataactata actaataacg taacgtgact ggcaagagat 3060
atttttaaaa caatgaatag gtttacctt actttagttt tatggaaatg aaagatcata 3120
tcatatataa tctagaataa aattaactaa aataattatt atctagataa aaaatttaga 3180
agccaatgaa atctataaat aaactaaatt aagtttattt aattaacaac tatggatata 3240
aaataggtac taatcaaat agtgaggagg atatatttga atacatacga acaaattaat 3300
aaagtgaaaa aaatacttcg gaaacattta aaaaataacc ttattggtac ttacatgttt 3360
ggatcaggag ttgagagtgg actaaaacca aatagtgatc ttgacttttt agtcgtcgtat 3420
tctgaaccat tgacagatca aagtaaagaa atacttatac aaaaaattag acctatttca 3480
aaaaaaatag gagataaaag caacttacga tatattgaat taacaattat tattcagcaa 3540
gaaatggtac cgtggaatca tcctcccaa caagaattta tttatggaga atgggtacaa 3600
gagctttatg aacaaggata cattcctcag aaggaattaa attcagattt aaccataatg 3660
ctttaccaag caaacgaaa aaataaaaga atatacgga 3700

```

<210> 5

<211> 3650

<212> ADN

<213> Mycobakterium

5

ES 2 643 014 T3

<400> 5	
ggtcgactct agaggatccc gatctaagga gatatacata tgacctctc ggagatcgac	60
aagatcgatc cggacgcagg cactcttgag tggcttctg cggcacaggc gccttccgca	120
gtctcacgcg cgatgttgcg agaacacgct cagatgatgg cggacgctta ccaactcgcg	180
aagggtatct gcggagatgg acggaatggc actgggtctga tggttccaca gcgctttcgc	240
ggtaaaccgg aagaagcggc agctgcaatg atttacggct ctgagctcgg tctgaaccca	300
cttcaggctg tgcaacgagt agtaccatc catggcatgc caacctgga agctcggacc	360
atggtgggac tgcttaaagc tcgcggttac aagatccgca ccgtcgaaca gtcggacact	420
tccgtcacag tcgaaggcgt cgcaccagac ggcgaaacgg ctagtcaac ctggaccatc	480
gaacgcgcac aacgcgccg ctacgttcca accccatcat caccggactc caagcgtcga	540
cccgcgctcg acgatgactg gggttaccgtg tcgaaaacat gggatggaaa ggtcaagaag	600
tccgttggtg ggaacatgaa gtacatcacc gaccacagg cgatgctgaa agctaaagcc	660
cagtctgagg tgtgtcgcga tctggcgccc gacgttctga tgggcatctc ctatacccg	720
gaggatctgg aatctgaacg ccaggatcag ttcgaggatc gtcgtcccgc agcagcccca	780
gcacgcactc agcgtgtaac cgttgacgaa atcttcgccg aggaagtgcc gttgtcctcc	840
gatggctttg ccggtgataa cctccgacg gcagctcaag ctgcaccgga gcctgccccg	900
gaacctgaca cgcaccaagc tcctgccggg gatgtgatcg aggaccaagg cgatggtgcg	960
ccggatcccc gtgaaccttc ccagcggaa cagagcgaga cagttgtcga accagcccca	1020
gagccccccc ctgcaccgga taccgctgcc gctgctaagt ccacgtccaa gaaagtgaac	1080
gctaaacgct ctaccgcgcc agcagctaac cctgacaaac caaagaccg catgctcaa	1140
gctctggaga agcgttggtt cgcactcttg ggcgatgccg gacttagcgg agcggccgac	1200
cgcgacggtc ggattgccgt gtaccgttcc gtgctcgaac acgaggcaat tggctccact	1260
gacgatctgg atgacctgc gattgggaag gtggcagatc agctctatgc atggcagcag	1320
cagaatgaac tggatgacaa gattgccggg atcctcagcg atgctgcccc tgctgagtct	1380
gagtcgggtc cccagcagc agatccgact tctgagggca atgagtgaat tcgtaccgag	1440
ctcgaattca ctggccgtcg ttttacagcc aagcttggct gttttggcgg atgagagaag	1500
attttcagcc tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg	1560
cctggcgcca gtagcgcggt ggtccacct gacccatgc cgaactcaga agtgaacgc	1620
cgtagcgccg atggtagtgt ggggtctccc catgagagag tagggaactg ccaggcatca	1680
aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gtttgcggt	1740
gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgtg cgaagcaacg	1800
gcccggaggg tggcgggcag gacgccgcc ataaactgcc aggcataaaa ttaagcagaa	1860
ggccatcctg acggatggcc tttttgcgtt tctacaaact cttttgttta tttttctaaa	1920
tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt	1980

ES 2 643 014 T3

gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ctttattccc ttttttgagg 2040
 ctttttgccct tccgtgtttt gctcaccag aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag 2100
 atcagttggg tgcacgagt gggtacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg 2160
 agagttttcg ccccgaaaga cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg 2220
 gcgcggtatt atcccggtgt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt 2280
 ctcaaatga cttgggtgag taattcgtaa tcatgtcata gctgtttcct gtgtgaaatt 2340
 gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg 2400
 gtgcctaata agtgagctaa ctacatttaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt 2460
 cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt 2520
 tgcgtattgg gcgctcttcc gcttctctgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc 2580
 tgcgcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggaataac gttatccaca gaatcagggg 2640
 ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaaac cgtaaaaagg 2700
 ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 2760
 gctcaagtca gaggtggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 2820
 gaagctccct cgtgcgtctt cctgttccga ccctgccgt taccggatac ctgtccgctt 2880
 ttctcccttc ggaagcgtg gcgctttctc atagctcac ctgtaggtat ctgagttcgg 2940
 tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgtt 3000
 gcgccttatt cggttaactat cgtcttgagt ccaacccggg aagacacgac ttatcgccac 3060
 tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt 3120
 tcttgaagtg gtgcctaac tacggctaca ctagaagaac agtatttggg atctgcgctc 3180
 tgctgaagcc agttacctt ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 3240
 ccgctggtag cgggtgtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat 3300
 ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac 3360
 gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttggggg 3420
 gggggggaaa gccacgttgt gtctcaaat ctctgatgtt acattgcaca agataaaaat 3480
 atatcatcat gaacaataaa actgtctgct tacataaaca gtaatacaag ggggtttatg 3540
 agccatattc aacgggaaac gtcttgctcg agatctatcg attttcgttc gtgaatacat 3600
 gttataataa ctataactaa taacgtaacg tgactggcaa gagatatttt 3650

<210> 6

< 211> 3706

< 212> ADN

5 < 213> Mycobakterium

<400> 6

taggaggggc gactctagag gatccccgat ctaggagata tacatatggc tgagaatgcg 60
 gtaacaaagc aggacagccc gaaagcaccg gaaaccatct ctcaggttct ccaagtcctg 120

ES 2 643 014 T3

gttcctcagt	tggctcgcgc	agtgccataa	ggcatggacc	cagatcgcat	tgcacgcatc	180
gtacagaccg	aaattcgcga	gtcacgcaac	gcgaaagcgg	caggcattgc	caagcagtcc	240
ttggacgatt	gcacccaaga	gagctttgcg	ggagctctcc	tcacttcggc	cgcactcggg	300
ttggaacctg	gagtgaacgg	cgaatgctac	ctggtgccct	atcgcgatac	tcgacgcggc	360
gtggtagagt	gtcagctgat	catcggttat	cagggtatcg	tcaagctggt	ttggcaacat	420
ccgcgcgcat	cgcgcattga	tgcgcagtgg	gttggcgcaa	acgatgaatt	ccactacacc	480
atgggcctga	atccccacgt	caaacacgtc	aaggcaaagg	gagatcgggg	caatccagtc	540
tactttctacg	cgatcgtgga	agttaccggg	gccgagcctc	tgtgggacgt	tttcaccgcc	600
gacgagatcc	gtgaactgcg	tcgtgggaag	gttggttcct	ccggcgatat	caaggatcca	660
cagcggtgga	tggaacgtaa	gactgccttg	aaacagggtc	tgaagcttgc	tccaagacg	720
acacgccttg	acgctgctat	ccgagctgat	gaccgcctcg	gtaccgacct	ctctcagtcc	780
caagcacttg	ctcttccttc	cacggtgaaa	ccgaccgctg	actacatcga	tggcgagatt	840
gccgaaccac	acgaagtcca	tacccaccgc	aagtcattccc	gtgccaacg	agcacaacgc	900
gcaactgccc	cagcaccaga	cgttcagatg	gcaaaccag	accagctgaa	acggcttggt	960
gagattcaga	aggcggagaa	gtacaacgat	gctgactggg	tcaagtttct	ggccgattct	1020
gcgggagtga	aggcaaccgc	tgctgccgat	ctgaccttcg	atgaggctaa	agctgtcatc	1080
gacatgttcg	acggctcctaa	cgcgtaacaa	tttaccgagc	tcgaattcac	tggccgtcgt	1140
tttacagcca	agcttggtcg	ttttggcgga	tgagagaaga	ttttcagcct	gatacagatt	1200
aaatcagaac	gcagaagcgg	tctgataaaa	cagaatttgc	ctggcggcag	tagcgcgggtg	1260
gtcccacctg	accccatgcc	gaactcagaa	gtgaaacgcc	gtagcgcgga	tggtagtgtg	1320
gggtctcccc	atgcgagagt	agggaactgc	caggcatcaa	ataaaacgaa	aggctcagtc	1380
gaaagactgg	gcctttcgtt	ttatctgttg	tttgtcggtg	aacgctctcc	tgagtaggac	1440
aaatccgccg	ggagcggatt	tgaacgttgc	gaagcaacgg	cccggagggt	ggcgggcagg	1500
acgcccgcga	taaactgcc	ggcatcaa	taagcagaag	gccatcctga	cggatggcct	1560
ttttgcgttt	ctacaaactc	ttttgtttat	ttttctaaat	acattcaa	atgtatccgc	1620
tcattgagaca	ataaccctga	taaatgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	1680
ttcaacattt	ccgtgtcgcc	cttattccct	tttttgccgc	attttgccct	cctgtttttg	1740
ctcaccacga	aacgctgggt	aaagtaaaag	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	1800
gttacatcga	actggatctc	aacagcggta	agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	1860
gttttccaat	gatgagcact	tttaaagtgc	tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccgtgttg	1920
acgcccggga	agagcaactc	ggtcgccgca	tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	1980
aattcgtaat	catgtcatag	ctgtttcctg	tgtgaaattg	ttatccgctc	acaattccac	2040
acaacatacg	agccggaagc	ataaagtgtg	aagcctgggg	tgccaatga	gtgagctaac	2100
tcacattaat	tgcgttgcgc	tcactgcccg	ctttccagtc	gggaaacctg	tcgtgccagc	2160

tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgctcttccg	2220
cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc	2280
actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt	2340
gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc	2400
ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa	2460
acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc	2520
ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg	2580
cgcttttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt cgctccaagc	2640
tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgcttatcc ggtaactatc	2700
gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca	2760
ggattagcag agcgaggat gtaggcgggt ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact	2820
acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg	2880
gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt	2940
ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct	3000
tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga	3060
gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttgggggg ggggggaaag ccacgttggtg	3120
tctcaaaatc tctgatgtta cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg aacaataaaa	3180
ctgtctgctt acataaacag taatacaagg ggtgttatga gccatattca acgggaaacg	3240
tcttgctcga gatctatcga ttttcgttcg tgaatacatg ttataataac tataactaat	3300
aacgtaacgt gactggcaag agatattttt aaaacaatga atagggtttac acttacttta	3360
gttttatgga aatgaaagat catatcatat ataacttaga ataaaattaa ctaaaataat	3420
tattatctag ataaaaaatt tagaagccaa tgaaatctat aaataaacta aattaagttt	3480
atttaattaa caactatgga tataaaatag gtactaatca aaatagtgag gaggatatat	3540
ttgaatacat acgaacaaat taataaagtg aaaaaaatac ttcggaaaca tttaaaaaat	3600
aaccttattg gtacttacat gtttgatca ggagttgaga gtggactaaa accaaatagt	3660
gatcttgact ttttagtcgt cgtatctgaa ccattgacag atcaaa	3706

<210> 7

< 211> 3950

< 212> ADN

5 < 213> Corynebacterium aurimucosum

<400> 7

ggtcgactct agaggatccc gatccaagga gatatacata tgggaaacaa tctagagcag	60
cgtatggccg ctaacaacgc cccggctaag cagaatcgcc ccgtcaccct ggcagaccaa	120
atccgaagca tggaaacaca attccagctc gcaatgccaa agggcatgga ggcacagcag	180
ctagtacgtg atgcgcttac ctgcctgcgc caaaccccgga agcttgacaga atgcacccca	240
cagtccgtac tgggtggact catgacgtgc tcccagcttg gtttgcgtcc cggcgacta	300

ES 2 643 014 T3

ggccatgctt	acctgctgcc	attctgggat	aggaagcagg	gcggcatggt	ggctcaactt	360
gtggttgggt	accgtggctt	agttgagctg	gctcaccgct	ctgggcagat	tcagtcgctt	420
atcgcccga	ccgtgtacgc	caacgaccac	tttgacgttg	actatgggct	ggatgacaag	480
cttgtccaca	agccatgcat	gaacggtccg	aagggcaacc	caatcgcta	ctacgcggtg	540
gctaagtcca	ccaccggggg	acacagcttc	atcgatcatg	gtaaggacga	aatgctggcc	600
taccgtgatg	aattcgccaa	ggctaagaac	aagcaagggtg	aagtgtttgg	cccgtgggct	660
gacaattttt	acgctatggc	ccacaagacc	tgtgtacgcc	agctcgcgaa	gtggatgccg	720
tcctctaccg	acctagatcg	gggtatcgca	gcggacgaaa	cagtgcgtgt	agacctatcc	780
gaatccgccc	ttgactatcc	gcagcacgtg	gatggggaag	tggtagtag	taagcccgt	840
gagggcgaag	ccgcctagca	attggtaccg	agctcgaatt	cactggccgt	cgttttacag	900
ccaagcttgg	ctgttttggc	ggatgagaga	agattttcag	cctgatacag	attaaatcag	960
aacgcagaag	cggtctgata	aaacagaatt	tgcctggcgg	cagtagcgcg	gtgggtccac	1020
ctgaccccat	gccgaactca	gaagtgaaac	gccgtagcgc	cgatggtagt	gtggggcttc	1080
cccatgcgag	agtagggaac	tgccaggcat	caaataaaac	gaaaggctca	gtcgaaagac	1140
tgggcctttc	gttttatctg	ttgtttgtcg	gtgaacgctc	tcctgagtag	gacaaatccg	1200
ccgggagcgg	atttgaacgt	tgcgaagcaa	cggcccggag	ggtggcgggc	aggacgcccg	1260
ccataaactg	ccaggcatca	aattaagcag	aaggccatcc	tgacggatgg	cctttttgcg	1320
tttctacaaa	ctcttttgtt	tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	cgctcatgag	1380
acaataaccc	tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	aagagtatga	gtattcaaca	1440
tttccgtgtc	gcccttattc	ccttttttgc	ggcattttgc	cttctctgtt	ttgctcacc	1500
agaaacgctg	gtgaaagtaa	aagatgctga	agatcagttg	ggtgcacgag	tgggttacat	1560
cgaactggat	ctcaacagcg	gtaagatcct	tgagagtttt	cggcccgaa	aacgttttcc	1620
aatgatgagc	acttttaag	ttctgctatg	tggcgcggtg	ttatcccgtg	ttgacgccgg	1680
gcaagagcaa	ctcggtcgcc	gcatacacta	ttctcagaat	gacttggttg	agtaattcgt	1740
aatcatgtca	tagctgtttc	ctgtgtgaaa	ttgttatccg	ctcacaattc	cacacaacat	1800
acgagccgga	agcataaagt	gtaaagcctg	gggtgcctaa	tgagttagct	aactcacatt	1860
aattgctgtg	cgctcactgc	ccgctttcca	gtcgggaaac	ctgtcgtgcc	agctgcatta	1920
atgaatcggc	caacgcgcgg	ggagaggcgg	tttgctgatt	gggcgctctt	ccgcttcctc	1980
gctcactgac	tcgctgcgct	cggtcggtcg	gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	2040
ggcggtaata	cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	2100
aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	ctggcgtttt	tccataggct	2160
ccgccccctt	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagagggtggc	gaaacccgac	2220
aggactataa	agataaccag	cgtttcccc	tggaaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	2280
gaccctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	2340

ES 2 643 014 T3

tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgcctca agctgggctg	2400
tgtgcacgaa cccccggttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga	2460
gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag	2520
cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta	2580
cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag	2640
agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcgggtggt tttttgttg	2700
caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac	2760
gggggtctgac gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc	2820
aaaaaggatc ttcacctaga tccttttggg ggggggggga aagccacgtt gtgtctcaaa	2880
atctctgatg ttacattgca caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg	2940
cttacataaa cagtaataca aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcttgct	3000
cgagatctat cgattttcgt tcgtgaatac atgttataat aactataact aataacgtaa	3060
cgtgactggc aagagatatt tttaaaacaa tgaatagggt tacacttact ttagttttat	3120
ggaaatgaaa gatcatatca tatataatct agaataaaat taactaaaat aattattatc	3180
tagataaaaa atttagaagc caatgaaatc tataataaaa cttaaattaag tttatttaat	3240
taacaactat ggatataaaa taggtactaa tcaaaatagt gaggaggata tatttgaata	3300
catacgaaca aattaataaa gtgaaaaaaa tacttcggaa acatttataaa aataacctta	3360
ttggtactta catgtttgga tcaggagttg agagtggact aaaaccaaata agtgatcttg	3420
actttttagt cgtcgtatct gaaccattga cagatcaaag taaagaaata cttatacaaa	3480
aaattagacc tatttcataaa aaaataggag ataaaagcaa cttacgatat attgaattaa	3540
caattattat tcagcaagaa atgggtaccgt ggaatcatcc tcccaaacaa gaatttattt	3600
atggagaatg gttacaagag ctttatgaac aaggatacat tcctcagaag gaattaaatt	3660
cagatttaac cataatgctt taccaagcaa aacgaaaaaa taaaagaata tacggaaatt	3720
atgacttaga ggaattacta cctgatattc cattttctga tgtgagaaga gccattatgg	3780
attcgtcaga ggaattaata gataattatc aggatgatga aaccaactct atattaactt	3840
tatgccgtat gattttaact atggacacgg gtaaaatcat accaaaagat attgcgggaa	3900
atgcagtggc tgaatcttct ccattagaac atagggagag aattttgtta	3950

<210> 8

<211> 9137

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 8

aagcttgcat gcctgcaggt cgactctaga ggatctaagg agatatacat atgactaagc	60
aaccaccaat cgcaaaagcc gatctgcaaa aaactcaggg aaaccgtgca ccagcagcag	120
ttaaaaaatag cgacgtgatt agttttatta accagccatc aatgaaagag caactggcag	180

ES 2 643 014 T3

cagctcttcc	acgccatatg	acggctgaac	gtatgatccg	tatcgccacc	acagaaattc	240
gtaaagtccc	ggcgttagga	aactgtgaca	ctatgagttt	tgtcagtgcg	atcgtacagt	300
gttcacagct	cggacttgag	ccaggtagcg	ccctcggcca	tgcatattta	ctgccttttg	360
gtaataaaaa	cgaaaagagc	ggtaaaaaga	acgttcagct	aatcattggc	tatcgcgcca	420
tgattgatct	ggctcgccgt	tctggcca	tcgccagcct	gtcagcccgt	gttgtccgtg	480
aaggtagcga	gtttagcttc	gaatttgccc	ttgatgaaaa	gttaatacac	cgcccgggag	540
aaaacgaaga	tgccccggtt	acccacgtct	atgctgtcgc	aagactgaaa	gacggaggta	600
ctcagtttga	agttatgacg	cgcaaacaga	ttgagctggg	gcgcagcctg	agtaaagctg	660
gtaataacgg	gccgtgggta	actcactggg	aagaaatggc	aaagaaaacg	gctattcgtc	720
gcctgttcaa	atatctgccc	gtatcaattg	agatccagcg	tgcagtatca	atggatgaaa	780
aggaaccact	gacaatcgat	cctgcagatt	cctctgtatt	aaccggggaa	tacagtgtaa	840
tcgataattc	agaggaataa	ttcagcctgg	aattcactgg	ccgtcgtttt	acagccaagc	900
ttggctgttt	tggcggatga	gagaagattt	tcagcctgat	acagattaaa	tcagaacgca	960
gaagcggctc	gataaaacag	aatttgccctg	gcggcagtag	cgcggtgggc	ccacctgacc	1020
ccatgccgaa	ctcagaagtg	aaacgccgta	gcgccgatgg	tagtgtgggg	tctccccatg	1080
cgagagtagg	gaactgccag	gcatcaaata	aaacgaaaag	ctcagtcgaa	agactggggc	1140
tttcgtttta	tctgttgttt	gtcggatga	gctctcctga	gtaggacaaa	tccgccggga	1200
gcggatttga	acgttgcgaa	gcaacggccc	ggagggtggc	gggcaggacg	cccgccataa	1260
actgccaggc	atcaaattaa	gcagaaggcc	atcctgacgg	atggcctttt	tgcgtttcta	1320
caaactcttt	tgtttatttt	tctaaataca	ttcaaataatg	tatccgctca	tgagacaata	1380
accctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	1440
tgtcgccctt	attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttcct	gtttttgctc	accagaaac	1500
gctgtgtgaa	gtaaaagatg	ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	1560
ggatctcaac	agcggtaaga	tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacggt	ttccaatgat	1620
gagcactttt	aaagtctctg	tatgtggcgc	ggatattatcc	cgtgttgacg	ccgggcaaga	1680
gcaactcggg	cgccgcatac	actattctca	gaatgacttg	gttgagtaat	tcgtaatcat	1740
gtcatagctg	tttcctgtgt	gaaattgtta	tccgctcaca	attccacaca	acatacgagc	1800
cggaaacata	aagtgtaaa	cctgggggtgc	ctaattgagt	agctaactca	cattaattgc	1860
gttgcgctca	ctgcccgtt	tccagtcggg	aaacctgtcg	tgccagctgc	attaatgaat	1920
cggccaacgc	gcggggagag	gcggtttgcg	tattgggcgc	tcttcgctt	cctcgctcac	1980
tgactcgctg	cgctcggctg	ttcggtgcg	gcgagcggtg	tcagctcact	caaaggcggt	2040
aatacgggta	tccacagaat	caggggataa	gcgaggaaag	aacatgtgag	caaaaggcca	2100
gcaaaaggcc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgctggcg	ttttccata	ggctccgccc	2160
ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	cgacaggact	2220

ES 2 643 014 T3

ataaagatac caggcggtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct	2280
gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccctcggga agcgtggcgc tttctcatag	2340
ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca	2400
cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa	2460
cccggtaaga cagcacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc	2520
gaggtatgta ggcggtgcta cagagtctct gaagtgggtg cctaactacg gctacactag	2580
aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg	2640
tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca	2700
gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc	2760
tgacgctcag tggaaacgaa actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag	2820
gatcttcacc tagatccttt tggggggggg gggaaagcca cgttgtgtct caaaatctct	2880
gatgttacat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac aataaaactg tctgcttaca	2940
taaacagtaa tacaaggggt gttatgagcc atattcaacg ggaaacgtct tgctcgagat	3000
ctatcgattt tcgttcgtga atacatgtta taataactat aactaataac gtaacgtgac	3060
tggcaagaga tatttttaaa acaatgaata ggtttacact tacttttagtt ttatggaaat	3120
gaaagatcat atcatatata atctagaata aaattaacta aaataattat tatctagata	3180
aaaaatttag aagccaatga aatctataaa taaactaaat taagtttatt taattaacaa	3240
ctatggatat aaaataggta ctaatcaaaa tagtgaggag gatataattg aatacatacg	3300
aacaaattaa taaagtgaag aaaatacttc ggaaacattt aaaaaataac cttatttgta	3360
cttacatgtt tggatcagga gttgagagtg gactaaaacc aaatagtgat cttgactttt	3420
tagtcgtcgt atctgaacca ttgacagatc aaagtaaaga aatacttata caaaaaatta	3480
gacctatttc aaaaaaata ggagataaaa gcaacttacg atatattgaa ttaacaatta	3540
ttatttcagca agaaatggta ccgtggaatc atcctcccaa acaagaattt atttatggag	3600
aatggttaca agagctttat gaacaaggat acattcctca gaaggaatta aattcagatt	3660
taaccataat gctttaccaa gcaaaacgaa aaaataaaaag aatatacggg aattatgact	3720
tagaggaatt actacctgat attccatttt ctgatgtgag aagagccatt atggattcgt	3780
cagaggaatt aatagataat tatcaggatg atgaaaccaa ctctatatta actttatgcc	3840
gtatgatattt aactatggac acgggtaaaa tcataccaaa agatattgag ggaaatgcag	3900
tggctgaatc ttctccatta gaacataggg agagaatttt gttagcagtt cgtagttatc	3960
ttggagagaa tattgaatgg actaatgaaa atgtaaaatt aactataaac tatttaataa	4020
acagattaaa aaaattataa aaaaattgaa aaaatgggtg aaacactttt ttcaattttt	4080
ttgttttatt atttaatat tgggaaatat tcattctaatt tggtaatcag atttttagaaa	4140
acaataaacc cttgcatatg atatcgatgt acagatccct ggtatgagtc agcaaacctt	4200
tcttcacgag gcagacctca gcgccccccc cccctagct tgtctacgtc tgatgctttg	4260

aatcggacgg	acttgccgat	cttgatatgcg	gtgatttttc	cctcgtttgc	ccacttttta	4320
atggtggccg	gggtgagagc	tacgcgggcg	gcgacctgct	gcgctgtgat	ccaatattcg	4380
gggtcgttca	ctggttcccc	tttctgattt	ctggcataga	agaacccccg	tgaactgtgt	4440
ggttccgggg	gttgctgatt	tttgcgagac	ttctcgcgca	attccctagc	ttaggtgaaa	4500
acaccatgaa	acactagggg	aacacccatg	aaacacccat	tagggcagta	gggcggcttc	4560
ttcgtctagg	gcttgcatth	gggcgggtgat	ctggctctta	gcgtgtgaaa	gtgtgtcgta	4620
gggtggcgtg	tcaatgcact	cgaacgtcac	gtcattttacc	gggtcacggg	gggcaaagag	4680
aactagtggg	ttagacattg	ttttcctcgt	tgctcgggtg	gggtgagcttt	tctagccgct	4740
cggtaaacgc	ggcgatcatg	aactcttgga	ggttttcacc	gttctgcatg	cctgcgcgct	4800
tcattgtcct	acgtagtgcc	aaaggaacgc	gtgcgggtgac	cacgacgggc	ttagcctttg	4860
cctgcgcttc	tagtgcttcg	atggtggctt	gtgcctgcgc	ttgctgcgcc	tgtagtgcct	4920
gttgagcttc	ttgtagttgc	tgctctagct	gtgccttggt	tgccatgctt	taagactcta	4980
gtagcttttc	tgcgatatgt	catgcgcgat	cgtagcaaac	attgtcctgc	aactcattca	5040
ttatgtgcag	tgctcctgtt	actagtcgta	catactcata	tttacctagt	ctgcatgcag	5100
tgcatgcaca	tgcatgcatg	tcgtgcta	gtgtaaaaca	tgtacatgca	gattgctggg	5160
gggtgcaggg	gcggagccac	cctgtccatg	cgggggtgtg	ggcttgcccc	gccggtacag	5220
acagtgcagc	ccggggcacc	tagtcgcgga	tacccccctt	aggatcggga	cacgtaaccc	5280
tcccatgtcg	atgcaa	atcttga	gtacgggtaa	gctggcacgc	atagccaagc	5340
taggcggcca	ccaaacacca	ctaaaaatta	atagttccta	gacaagacaa	acccccgtgc	5400
gagctaccaa	ctcatatgca	cggggggccac	ataacccgaa	gggggttcaa	ttgacaacca	5460
tagcactagc	taagacaacg	ggcacaacac	ccgcacaaac	tcgcactgcg	caaccccgca	5520
caacatcggg	tctaggtaac	actgaaatag	aagtgaacac	ctctaaggaa	ccgcagggtca	5580
atgaggggtc	taagggtcact	cgcgctaggg	cgtggcgtag	gcaaaacgtc	atgtacaaga	5640
tcaccaatag	taaggctctg	gcgggggtgcc	ataggtggcg	cagggacgaa	gctgttgcgg	5700
tgtcttggtc	gtctaacggt	gttcgcagct	ttgaggggtc	gcaaaactct	cactctcgct	5760
gggggtcacc	tctggctgaa	ttggaagtca	tgggcgaacg	ccgcattgag	ctggctattg	5820
ctactaagaa	tcacttggtg	gcgggtggcg	cgctcatgat	gtttgtgggc	actgttcgac	5880
acaaccgctc	acagtcattt	gcgcagggtg	aagcgggtat	taagactgcg	tactcttcga	5940
tggtgaaaac	atctcagtgg	aagaaagaac	gtgcacggta	cgggggtggag	cacacctata	6000
gtgactatga	ggtcacagac	tcttgggcga	acggttgcca	cttgaccgcg	aacatgctgt	6060
tggtcttgga	tcgtccactg	tctgacgatg	aactcaaggc	gtttgaggat	tccatgtttt	6120
cccgtgggtc	tgctgggtgt	gttaaggccg	gtatggacgc	gccactgcgt	gagcacgggg	6180
tcaaacttga	tcagggtgtct	acctgggggtg	gagacgctgc	gaaaatggca	acctacctcg	6240
ctaagggtcat	gtctcaggaa	ctgactggct	ccgtactaa	aaccgcgtct	aaggggtcgt	6300

ES 2 643 014 T3

acacgccgtt tcagatgttg gatatgttgg ccgatcaaag cgacgccggc gaggatatgg	6360
acgctgtttt ggtggctcgg tggcgtgagt atgaggttgg ttctaaaaac ctgcgttcgt	6420
cctggtcacg tggggctaag cgtgcttttg gcattgatta catagacgct gatgtacgtc	6480
gtgaaatgga agaagaactg tacaagctcg ccggtctgga agcaccggaa cgggtcgaat	6540
caaccgcgt tgcgttgct ttggtgaagc ccgatgattg gaaactgatt cagtctgatt	6600
tcgcggttag gcagtacgtt ctagattgcg tggataaggc taaggacgtg gccgctgcgc	6660
aacgtgtcgc taatgaggtg ctggcaagtc tgggtgtgga ttccaccccg tgcattgatc	6720
ttatggatga tgtggacttg gacgcggttc tgcctactca tggggacgct actaagcgtg	6780
atctgaatgc ggcggtgttc gcgggtaatg agcagactat tcttcgcacc cactaaaagc	6840
ggcataaacc ccgttcgata ttttgtgcga tgaatttatg gtcaatgtcg cgggggcaaa	6900
ctatgatggg tcttggttgt gacaatggct gatttcatca ggaatggaac tgtcatgctg	6960
ttatgtgcct ggctcctaata caaagctggg gacaatgggt tgccccgttg atctgatcta	7020
gttcggattg gcggggcttc actgtatctg ggggtggcat cgtgaataga ttgcacaccg	7080
tagtgggcag tgtgcacacc atagtggcca tgagcaccac cacccccagg gacgccgacg	7140
gcgcgaagct ctgcgcctgg tgcggctcgg agatcaagca atccggcgct gcccgagacc	7200
gggactactg ccgccgctcc tgcgccagc gggcgtagca ggcccgcgcc cagcgcgagg	7260
cgatcgtgtc gcgcgtggcg tcggcagtcg ctcgccgaga tacgtcacgt gacgaaatgc	7320
agcagccttc cattccgtca cgtgacgaaa ctcggggccgc aggtcagagc acggttccgc	7380
ccgctccggc cctgccggac ccccggcac cgcgaagagg cccggcagta ccggcataac	7440
caagcctatg cctacagcat ccagggtgac ggtgccgagg atgacgatga gcgcattgtt	7500
agatttcata cacggtgcct gactgcgtta gcaatttaac tgtgataaac taccgcatta	7560
aagcttatcg atgataagct gtcaaacatg gcctgtcgct tgcggtattc ggaatcttgc	7620
acgccctcgc tcaagccttc gtactgggtc ccgccacca acgtttcggc gagaagcagg	7680
ccattatcgc cggcatggcg gccgacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgcca	7740
gggtgggttt tcttttcacc agtgagacgg gcaacagctg attgcccttc accgcctggc	7800
cctgagagag ttgcagcaag cgggccacgc tggtttgccc cagcaggcga aaatcctgtt	7860
tgatgggtgt taacggcggg atataacatg agctgtcttc ggtatcgtcg tatccacta	7920
ccgagatatc cgcaccaacg cgagcccg actcggtaat ggcgcgcatt gcgccagcg	7980
ccatctgacg gttggcaacc agcatcgag tgggaacgat gccctcattc agcatttgca	8040
tggtttgttg aaaaccggac atggcactcc agtcgccttc ccgttccgt atcggctgaa	8100
tttgattgcg agtgagatat ttatgccagc cagccagacg cagacgcgcc gagacagaac	8160
ttaatgggcc cgctaacagc gcgatttgct ggtgacccaa tgcgaccaga tgctccacgc	8220
ccagtcgcgt accgtcttca tgggagaaaa taatactgtt gatgggtgtc tggtcagaga	8280
catcaagaaa taacgccgga acattagtgc aggcagcttc cacagcaatg gcacccgtgt	8340

ES 2 643 014 T3

catccagcgg atagttaatg atcagccac tgacgcgttg cgcgagaaga ttgtgcaccg	8400
ccgctttaca ggcttcgacg ccgcttcggt ctaccatcga caccaccacg ctggcaccca	8460
gttgatcggc gcgagattta atcgccgcga caatttgca cggcgcgtgc agggccagac	8520
tggaggtggc aacgccaatc agcaacgact gtttgcccgc cagttgttgt gccacgcggt	8580
tgggaatgta attcagctcc gccatcgccg cttccacttt tccccgcgtt ttcgcagaaa	8640
cgtggctggc ctggttcacc acgcgggaaa cggcttgata agagacaccg gcatactctg	8700
cgacatcgta taacgttact gggttcacat tcaccaccct gaattgactc tcttccgggc	8760
gctatcatgc cataccgcga aagggtttgc accattcgat ggtgtcaacg taaatgcatg	8820
ccgcttcgcc ttcgcgcgcg aattgcaagc tgatccgggc ttatcgactg cacggtgcac	8880
caatgcttct ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta tggctgtgca ggtcgtaaat	8940
cactgcataa ttcgtgtcgc tcaaggcgca ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg	9000
acatcataac ggttctggca aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggttc	9060
gtataatgtg tggaaattgt agcggataac aatttcacac aggaaacaga attaaaagat	9120
atgaccatga ttacgcc	9137

<210> 9

< 211> 9100

< 212> ADN

5 < 213> Escherichia coli

<400> 9

aagcttgcat gcctgcaggt cgactctaga ggatctaagg agatatacat atgagtactg	60
cactcgcaac gctggctggg aagctggctg aacgtgtcgg catggattct gtcgaccac	120
aggaactgat caccactctt cgccagacgg catttaaagg tgatgccagc gatgcgcagt	180
tcatcgcatc actgatcgtt gccaacaggt acggccttaa tccgtggacg aaagaaattt	240
acgcccttcc tgataagcag aatggcatcg ttccggtggg gggcgttgat ggctggtccc	300
gcatcatcaa tgaaaaccag cagtttgatg gcatggactt tgagcaggac aatgaatcct	360
gtacatgccg gatttaccgc aaggaccgta atcatccgat ctgcgttacc gaatggatgg	420
atgaatgccg ccgcgaacca ttcaaaactc gcgaaggcag agaaatcacg gggccgtggc	480
agtcgcattc caaacggatg ttacgtcata aagccatgat tcagtgtgcc cgtctggcct	540
tcggatttgc tggatatctat gaCaaggatg aagccgagcg cattgtcgaa aatactgcat	600
acactgcaga acgtcagccg gaacgcgaca tcaactccgt taacgatgaa accatgcagg	660
agattaacac tctgctgacg gccctggata aaacatggga tgacgactta ttgccgctct	720
gttcccagat atttcgccgc gacattcgtg catcgtcaga actgacacag gccgaagcag	780
taaaagctct tggattcctg aaacagaaag ccgcagagca gaaggtggca gcatgaattc	840
actggccgtc gttttacagc caagcttggc tgttttggcg gatgagagaa gattttcagc	900
ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa aacagaattt gcctggcggc	960
agtagcgcgg tggctccacc tgaccccatg ccgaactcag aagtgaacg ccgtagcgcc	1020

gatggtagtg tgggggtctcc ccatgcgaga gtagggaaact gccaggcatc aaataaaacg 1080
aaaggctcag tcgaaagact gggccttttcg ttttatctgt tgtttgctcg tgaacgctct 1140
cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacggt gcgaagcaac ggcccggagg 1200
gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa attaaagcaga aggccatcct 1260
gacggatggc ctttttgctg ttctacaaac tcttttgttt atttttctaa atacattcaa 1320
atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 1380
agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgctg gcattttgcc 1440
ttcctgtttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 1500
gtgcacgagt ggggttacat gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 1560
gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat 1620
tatcccggtg tgacgcccgg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg 1680
acttggttga gtaattcgta atcatgtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc 1740
tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata 1800
gagtgaagta actcacatta attgctgtgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc 1860
tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgctgtattg 1920
ggcgtctctc cgcttctctg ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgctggcag 1980
cgggtatcagc tcaactcaag gcggtataac ggttatccac agaatacagg gataacgcag 2040
gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc 2100
tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc 2160
agaggtgggc aaaccgcaga ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc 2220
tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt 2280
cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg 2340
ttcgtctcaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat 2400
ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag 2460
ccactggtaa caggattagc agagcgagggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt 2520
ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc 2580
cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta 2640
gcggtgggtt ttttggttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag 2700
atcctttgat cttttctacg ggggtctgac ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga 2760
ttttggctat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttgggg ggggggggaa 2820
agccacgttg tgtctcaaaa tctctgatgt tacattgcac aagataaaaa tatatcatca 2880
tgaacaataa aactgtctgc ttacataaac agtaatacaa ggggtgttat gagccatatt 2940
caacgggaaa cgtcttgctc gagatctatc gattttcgtt cgtgaatata tgttataata 3000
actataacta ataacgtaac gtgactggca agagatattt ttaaaacaat gaatagggtt 3060

ES 2 643 014 T3

acacttactt tagttttatg gaaatgaaag atcatatcat atataatcta gaataaaaatt	3120
aactaaaata attattatct agataaaaaa tttagaagcc aatgaaatct ataaataaac	3180
taaattaagt ttatttaatt aacaactatg gatataaaaat aggtactaat caaaatagt	3240
aggaggatat atttgaatac atacgaacaa attaataaag tgaaaaaaat acttcggaaa	3300
catttaaaaa ataaccttat tggactttac atgtttggat caggagtga gagtggacta	3360
aaaccaaata gtgatcttga ctttttagtc gtcgtatctg aaccattgac agatcaaagt	3420
aaagaaatac ttatacaaaa aattagacct atttcaaaaa aaataggaga taaaagcaac	3480
ttacgatata ttgaattaac aattattatt cagcaagaaa tggtagcgtg gaatcatcct	3540
cccaaacaag aatttattta tggagaatgg ttacaagagc tttatgaaca aggatacatt	3600
cctcagaagg aattaaattc agatttaacc ataatgcttt accaagcaaa acgaaaaaat	3660
aaaagaatat acggaaatta tgacttagag gaattactac ctgatattcc attttctgat	3720
gtgagaagag ccattatgga ttcgtcagag gaattaatag ataattatca ggatgatgaa	3780
accaactcta tattaacttt atgccgtatg attttaacta tggacacggg taaaatcata	3840
ccaaaagata ttgcgggaaa tgcagtggct gaatcttctc cattagaaca tagggagaga	3900
attttgttag cagttcgtag ttatcttggg gagaatattg aatggactaa tgaaaatgta	3960
aatttaacta taaactattt aaataacaga ttaaaaaaat tataaaaaaa ttgaaaaaat	4020
gggtggaaaca cttttttcaa tttttttggt ttattattta atatttgga aatattcatt	4080
ctaattggta atcagatttt agaaaacaat aaacccttgc atatgatatc gatgtacaga	4140
tccctgggat gagtcagcaa caccttcttc acgaggcaga cctcagcgcc ccccccccc	4200
tagcttgtct acgtctgatg ctttgaatcg gacggacttg ccgatcttgt atgcggtgat	4260
ttttccctcg ttgcccact ttttaatggt ggccggggtg agagctacgc gggcggcgac	4320
ctgctgcgct gtgatccaat attcggggtc gttcactggt tcccccttct gatttctggc	4380
atagaagaac ccccgtagac tgtgtggttc cgggggttgc tgatttttgc gagacttctc	4440
gcgcaattcc ctagcttagg tgaaaacacc atgaaacact agggaaacac ccatgaaaca	4500
cccattaggg cagtagggcg gcttcttctg ctagggcttg catttgggcg gtgatctggt	4560
cttttagcgtg tgaaagtgtg tcgtaggttg cgtgctcaat gcactcgaac gtcacgtcat	4620
ttaccgggtc acgggtggga aagagaacta gtgggttaga cattgttttc ctggtgtcg	4680
gtggtggtga gcttttctag ccgctcggta aacgcggcga tcatgaactc ttggagggtt	4740
tcaccgttct gcatgcctgc gcgcttcatg tcctcacgta gtgccaaagg aacgcgtgcg	4800
gtgaccacga cgggcttagc ctttgcctgc gcttctagt cttcgatggt ggcttgtgcc	4860
tgcgcttgct gcgcctgtag tgctgttga gcttcttga gttgctgttc tagctgtgcc	4920
ttggttgcca tgctttaaga ctctagtagc tttcctgcga tatgtcatgc gcatgcgtag	4980
caaacattgt cctgcaactc attcattatg tgcagtgtc ctgttactag tcgtacatac	5040
tcatatttac ctagtctgca tgcagtgcac gcacatgcag tcatgtcgtg ctaatgtgta	5100

ES 2 643 014 T3

aaacatgtac atgcagattg ctgggggtgc agggggcgga gccaccctgt ccatgcgggg	5160
tgtggggctt gccccgccgg tacagacagt gagcaccggg gcacctagtc gcggataccc	5220
cccctaggta tcggacacgt aaccctccca tgtcgatgca aatctttaac attgagtacg	5280
ggtaagctgg cacgcatagc caagctaggc ggccaccaa caccactaaa aattaatagt	5340
tcctagacaa gacaaacccc cgtgcgagct accaactcat atgcacgggg gccacataac	5400
ccgaagggggt ttcaattgac aaccatagca ctagctaaga caacggggcac aacacccgca	5460
caaactcgca ctgcgcaacc ccgcacaaca tcgggtctag gtaacactga aatagaagtg	5520
aacacctcta aggaaccgca ggtcaatgag ggttctaagg tcaactcgcg tagggcgtgg	5580
cgtaggcaaa acgtcatgta caagatcacc aatagtaagg ctctggcggg gtgccatagg	5640
tggcgcaggg acgaagctgt tgcggtgtcc tggctcgtcta acggtgcttc gcagtttgag	5700
ggctctgcaa actctcactc tcgctggggg tcacctctgg ctgaattgga agtcatgggc	5760
gaacgccgca ttgagctggc tattgctact aagaatcact tggcggcggg tggcgcgctc	5820
atgatgtttg tgggcactgt tcgacacaac cgctcacagt catttgcgca ggttgaagcg	5880
ggattaaga ctgcgtactc ttcgatggtg aaaacatctc agtgaagaa agaacgtgca	5940
cggtagggg tggagcacac ctatagtgac tatgaggtca cagactcttg ggcgaacggt	6000
tggcacttgc accgcaacat gctgttgttc ttggatcgtc cactgtctga cgatgaactc	6060
aaggcgtttg aggattccat gttttcccgc tggctctgctg gtgtgggttaa ggccgggatg	6120
gacgcgccac tgcgtgagca cgggggtcaaa cttgatcagg tgtctacctg gggtagagac	6180
gctgcgaaaa tggcaacctc cctcgctaag ggcattgttc aggaactgac tggctccgct	6240
actaaaaccg cgtctaaggg gtcgtacacg ccgtttcaga tgttggatat gttggccgat	6300
caaagcgacg ccggcgagga tatggacgct gttttgggtg ctcggtggcg tgagtatgag	6360
gttggttcta aaaacctgcg ttcgtcctgg tcacgtgggg ctaagcgtgc tttgggcatt	6420
gattacatag acgctgatgt acgtcgtgaa atggaagaag aactgtacaa gctcgccggt	6480
ctggaagcac cggaaacgggt cgaatcaacc cgcttgctg ttgctttggt gaagcccgat	6540
gattggaaac tgattcagtc tgatttcgcg gttaggcagt acgttctaga ttgctgggat	6600
aaggctaagg acgtggccgc tgcgcaacgt gtcgctaata aggtgctggc aagtctgggt	6660
gtggattcca ccccgatcat gatcggttat gatgatgtgg acttggaacg ggttctgcct	6720
actcatgggg acgctactaa gcgtgatctg aatgcggcgg tgttcgcggg taatgagcag	6780
actattcttc gcacccacta aaagcggcat aaacccggt cgatattttg tgcgatgaat	6840
ttatgggtcaa tgcgcgggg gcaaactatg atgggtcttg ttgttgacaa tggctgattt	6900
catcaggaat ggaactgtca tgcgttatg tgcctggctc ctaatcaaag ctggggacaa	6960
tgggttgccc cgttgatctg atctagtctg gattggcggg gcttcaactg atctgggggt	7020
ggcatcgtga atagattgca caccgtagtg ggcagtgctc acaccatagt ggccatgagc	7080
accaccaccc ccagggacgc cgacggcgcg aagctctgcg cctggtgcgg ctcggagatc	7140

aagcaatccg gcgtcggccg gagccgggac tactgcccgc gtcctgcccg ccagcgggcg 7200
tacgaggccc ggcgccagcg cgaggcgatc gtgtccgccc tggcgtcggc agtcgctcgc 7260
cgagatacgt cacgtgacga aatgcagcag ccttccattc cgtcacgtga cgaaactcgg 7320
gccgcaggtc agagcacggt tccgcccgtc ccggccctgc cggacccccg gcatccccga 7380
agaggcccg cagtaccggc ataaccaagc ctatgcctac agcatccagg gtgacggtgc 7440
cgaggatgac gatgagcgca ttgttagatt tcatacacgg tgcctgactg cgttagcaat 7500
ttaactgtga taaactaccg cattaagct tatcgatgat aagctgtcaa acatggcctg 7560
tcgcttgccg tattcggaat cttgcacgcc ctcgctcaag ccttcgtcac tggccccgcc 7620
accaaacgtt tcggcgagaa gcaggccatt atcgccggca tggcgggccga cgcgcgggga 7680
gaggcggttt gcgtattggg cgccagggtg gtttttcttt tcaccagtga gacgggcaac 7740
agctgattgc cttcaccgc ctggccctga gagagttgca gcaagcggtc cacgctggtt 7800
tgccccagca ggcgaaaatc ctgtttgatg gtggttaacg gcgggatata acatgagctg 7860
tcttcggtat cgtcgtatcc cactaccgag atatccgcac caacgcgcag cccggactcg 7920
gtaatggcgc gcattgcgcc cagcgccatc tgatcggttg caaccagcat cgcagtggga 7980
acgatgccct cattcagcat ttgcatggtt tgttgaaaac cggacatggc actccagtcg 8040
ccttcccgtt ccgctatcgg ctgaatttga ttgcgagtga gatatttatg ccagccagcc 8100
agacgcagac gcgccgagac agaacttaat gggcccgtc acagcgcgat ttgctggtga 8160
cccaatgcga ccagatgctc cacgcccagt cgcgtaccgt cttcatggga gaaaataata 8220
ctgttgatgg gtgtctggtc agagacatca agaaataacg ccggaacatt agtgcaggca 8280
gcttccacag caatggcatc ctggatcatc agcggatagt taatgatcag cccactgacg 8340
cgttgcgcga gaagattgtg caccgcccgt ttacaggctt cgacgccgct tcgttctacc 8400
atcgacacca ccacgctggc acccagttga tcggcgcgag atttaatcgc cgcgacaatt 8460
tgcgacggcg cgtgcagggc cagactggag gtggcaacgc caatcagcaa cgactgtttg 8520
cccgccagtt gttgtgccac gcggttggga atgtaattca gctccgccat cgccgcttcc 8580
actttttccc gcgttttcgc agaaacgtgg ctggcctggt tcaccacgcg ggaaacggtc 8640
tgataagaga caccggcata ctctgcgaca tcgtataacg ttactggttt cacattcacc 8700
accctgaatt gactctcttc cgggcgctat catgccatac cgcgaaagg tttgcaccat 8760
tcgatggtgt caacgtaa atgcacgctc tcgccttcgc gcgcgaattg caagctgac 8820
cgggcttata gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg 8880
tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgactccc 8940
gttctggata atgttttttg cgccgacatc ataacggttc tggcaaata tctgaaatga 9000
gctgttgaca attaatcatc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 9060
cacacaggaa acagaattaa aagatatgac catgattacg 9100

<210> 10

<211> 1429

<212> ADN

<213> Mycobakterium

<400> 10

ctgcagggtcg accggcagat ctaaggagat atacatatga cctcctcgga gatcgacaag	60
atcgatccgg acgcaggcac tcttgagtgg cttcctgctg cacaggcgcc ttccgcagtc	120
tcacgcgcga tgttgcgaga acacgctcag atgatggcgg acgcttacca actcgcgaa	180
ggatctgctg gagatggacg gaatggcact ggtctgatgg ttccacagcg ctttcgcggt	240
aaaccggaag aagcggcagc tgcaatgatt tacggctctg agctcggtct gaaccactt	300
caggctgtgc aacgagtagt acccatccat ggcatgccaa ccctggaagc tcggaccatg	360
gtgggactgc ttaaagctcg cggttacaag atccgcaccg tcgaacagtc ggacacttcc	420
gtcacagtcg aaggcgctcg accagacggc gaaacggcta gctcaacctg gaccatcgaa	480
cgcgacaaac gcgccggcta cggtccaacc ccatcatcac cggactccaa gcgtcgaccc	540
gacgtcgacg atgactgggt taccgtgtcg aaaacatggg atggaaaagg caagaagtcc	600
gttggtggga acatgaagta catcaccgac ccacaggcga tgctgaaagc taaagcccag	660
tctgagggtg gtcgcgatct ggcgcccgcg gttctgatgg gcatctccta taccgggag	720
gatctggaat ctgaacgcca ggatcagttc gaggatcgtc gtcccgcagc agccccagca	780
cgcactcagc gtgtaaccgt tgacgaaatc ttcgccgagg aagtgccgtt gtcctccgat	840
ggctttgccg gtgataaccc tccgacggca gctcaagctg caccggagcc tgccccggaa	900
cctgacacgc accaagctcc tgccggggat gtgatcgagg accaaggcga tgggtgcgccg	960
gatcccgggtg aaccttcccc agcggaacag agcgagacag ttgtcgaacc agccccagag	1020
cccggccctg caccggatac cgctgccgct gctaagtcca cgtccaagaa agtgaacgct	1080
aaacgctcta ccgcgccagc agctaaccct gacaaaccaa agaccgcat gcgtcaagct	1140
ctggagaagc gcttgttcgc actcttgggc gatgccggac ttagcggagc ggccgaccgc	1200
gacggtcggg ttgccgtgta ccgttccgtg ctcgaaaacg aggcaattgg ctccactgac	1260
gatctggatg accctgcgat tgggaagggt gcagatcagc tctatgcatg gcagcagcag	1320
aatgaactgg atgacaagat tgccggtatc ctcagcgatg ctgcccgtgc tgagtctgag	1380
tcggtcgccc cagcagcaga tccgacttct gagggcaatg agtgaattc	1429

<210> 11

<211> 1093

<212> ADN

<213> Mycobakterium

5

<400> 11		
	gcagatctaa ggagatatac atatggctga gaatgcggtg acaaagcagg acagcccga	60
	agcaccggaa accatctctc aggttctcca agtcctggtt cctcagttgg ctgcgcagt	120
	gcctaaaggc atggaccag atcgattgc acgcacgta cagaccgaaa ttcgcaagtc	180
	acgcaacgcg aaagcggcag gcattgcca gacgtccttg gacgattgca cccaagagag	240
	ctttgcggga gctctctca cttcggccgc actcggtttg gaacctggag tgaacggcga	300
	atgctacctg gtgccctatc gcgatactcg acgcggcgtg gtagagtgtc agctgatcat	360
	cgggtatcag ggtatcgtca agctgttttg gcaacatccg cgcgcatcgc gcattgatgc	420
	gcagtgggtt ggcgcaaagc atgaattcca ctacaccatg ggctgaatc ccacgctcaa	480
	acacgtcaag gcaaaggag atcggggcaa tccagtctac ttctacgca tcgtggaagt	540
	taccggtgcc gagcctctgt gggacgtttt caccgccgac gagatccgtg aactgcgtcg	600
	tgggaagggtt ggttcctccg gcgatatcaa ggatccacag cgggtggatgg aacgtaagac	660
	tgccttgaaa caggtcctga agcttgctcc caagacgaca cgcttgacg ctgctatccg	720
	agctgatgac cgccctggta ccgacctctc tcagtcccaa gcaattgctc ttccctccac	780
	ggtgaaaccg accgctgact acatcgatgg cgagattgcc gaaccacacg aagtcgatac	840
	cccaccgaag tcatcccggtg cccaacgagc acaacgcgca actgccccag caccagacgt	900
	tcagatggca aaccagacc agctgaaacg gcttggtgag attcagaagg cggagaagta	960
	caacgatgct gactggttca agtttctggc cgattctgcg ggagtgaagg caaccggtgc	1020
	tgccgatctg accttcgatg aggctaaagc tgtcatcgac atgttcgacg gtcctaacgc	1080
	gtaacaattg ata	1093
<210> 12		
5	< 211> 100	
	< 212> ADN	
	< 213> artificial	
<220>		
< 223> oligonucleótido		
<400> 12		
10	aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagtc aagctgcgtc	60
	agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcgtt atccgtacct	100
<210> 13		
< 211> 100		
< 212> ADN		
15	< 213> artificial	
<220>		
< 223> oligonucleótido		
<400> 13		
	aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagtc cagcggcgtc	60
	agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcgtt atccgtacct	100
<210> 14		
< 211> 100		
< 212> ADN		
20	< 213> artificial	

	<220> < 223> oligonucleótido		
	<400> 14 aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaaggc aagctgcgtc agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcggt atccgtacct	60 100	
5	<210> 15 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial		
10	<220> < 223> oligonucleótido		
	<400> 15 aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagtg cagcggcgtc agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcggt atccgtacct	60 100	
15	<210> 16 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial		
	<220> < 223> oligonucleótido		
20	<400> 16 aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagtt cagcggcgtc agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcggt atccgtacct	60 100	
	<210> 17 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial		
25	<220> < 223> oligonucleótido		
	<400> 17 aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagga aagctgcgtc agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcggt atccgtacct	60 100	
30	<210> 18 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial		
	<220> < 223> oligonucleótido		
35	<400> 18 aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaaggt gagctgcgtc agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcggt atccgtacct	60 100	

ES 2 643 014 T3

<210> 19
 < 211> 100
 < 212> ADN
 < 213> artificial

5 <220>
 < 223> oligonucleótido

<400> 19
 aacaacgatg actgggagg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagga tagctgcgtc 60
 agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcggt atccgtacct 100

10 <210> 20
 < 211> 100
 < 212> ADN
 < 213> artificial

<220>
 < 223> oligonucleótido

15 <400> 20
 aacaacgatg actgggagg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagct tagctgcgtc 60
 agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcggt atccgtacct 100

20 <210> 21
 < 211> 100
 < 212> ADN
 < 213> artificial

<220>
 < 223> oligonucleótido

<400> 21
 aacaacgatg actgggagg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagca gagctgcgtc 60
 agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcggt atccgtacct 100

25 <210> 22
 < 211> 100
 < 212> ADN
 < 213> artificial

30 <220>
 < 223> oligonucleótido

<400> 22
 aacaacgatg actgggagg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagca tagctgcgtc 60
 agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcggt atccgtacct 100

35 <210> 23
 < 211> 100
 < 212> ADN
 < 213> artificial

<220>
 < 223> oligonucleótido

	<400> 23		
	aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaaggt tagctgcgtc	60	
	agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcgtt atccgtacct	100	
5	<210> 24 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial		
	<220> < 223> oligonucleótido		
10	<400> 24		
	aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagtg gagctgcgtc	60	
	agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcgtt atccgtacct	100	
	<210> 25 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial		
15	<220> < 223> oligonucleótido		
	<400> 25		
	aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagct gagctgcgtc	60	
	agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcgtt atccgtacct	100	
20	<210> 26 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial		
	<220> < 223> oligonucleótido		
25	<400> 26		
	aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaaggc gagctgcgtc	60	
	agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcgtt atccgtacct	100	
30	<210> 27 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial		
	<220> < 223> oligonucleótido		
	<400> 27		
	aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaaggg aagctgcgtc	60	
	agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcgtt atccgtacct	100	
35	<210> 28 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial		

ES 2 643 014 T3

	<220> < 223> oligonucleótido	
	<400> 28 aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaaggg tagctgcgtc agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcgtt atccgtacct	60 100
5	<210> 29 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial	
10	<220> < 223> oligonucleótido	
	<400> 29 aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagca cagcggcgtc agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcgtt atccgtacct	60 100
15	<210> 30 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial	
	<220> < 223> oligonucleótido	
20	<400> 30 aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagcc aagctgcgtc agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcgtt atccgtacct	60 100
	<210> 31 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial	
25	<220> < 223> oligonucleótido	
	<400> 31 aacaacgatg actgggcggg tctctcctgc ttcgttgagc acctcaagggt aagctgcgtc agtcaaaatg gccacagctt tcgcagcgtt atccgtacct	60 100
30	<210> 32 < 211> 100 < 212> ADN < 213> artificial	
	<220> < 223> oligonucleótido	
35	<400> 32 tcttcaagat ctccatcgcg cggcggccgt cggaacgagg gcagggtgaag atgatatcgg tgggtgccgtc ttctacagaa gagacgttct gcagaacctat	60 100

<210> 33
 < 211> 1566
 < 212> ADN
 < 213> Corynebacterium glutamicum

5 <400> 33
 atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcacccctcaa gggctctgcc 60
 cagggcggtt ccgctcacgc agtaggggaa caagcaatcg cggtatttgg tcttgactcc 120
 tccagcttac ctacctcgga cgctatTTTT gctgcagttc caggaacccg cactcacggc 180
 gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgttg ccattttgac tgacgcagct 240
 tggcttgagg tgctcaacga agcaggagag acccgcccag tcatcgttgt tgatgatgtc 300
 cgcgcagtac ttggcgcagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaa agatttcacg 360
 ctcatggag tcaactggaac ctacaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga 420
 ctcatggagg cagggccaaa agttggtttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg 480
 gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct 540
 cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgtg gtgatggaag tatccagcca tgcattgtca 600
 ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgctg ttaccaacct gtcgcaggat 660
 caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttccgc 720
 gcagattctc cacttggtgc tgacaaacag gtcgtgtgcg ttgatgattc ttggggtcag 780
 cgcattggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca cccttgggca agaagcagac 840
 ttcagcgcta cagacatcaa tgcagcgac tctggcgccc agagttttaa gatcaacgcc 900
 ccctcaaacc agtctacca ggtcgagcta gctcttccag gtgcgttcaa cgttgctaac 960
 gccacgttg catttgccgc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga 1020
 ggcattgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc 1080
 cttgcagtgg tggattatgc ccacaagcct gctgcagtgg ctgctgtgtt ggatacgttg 1140
 aggacccaga ttgacgggcg cctcggagtg gttatcggtg ctggtggaga ccgcgattcc 1200
 accaagcgtg gccccatggg gcagttgtcc gcacagcgtg ctgatctagt tattgtcact 1260
 gatgacaacc ctcgctcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca 1320
 cagcaggggtg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca 1380
 gaagcaattc gcgttttggt cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga 1440
 aaaggccatg aagttggaca actagttgct ggtgtcacc accattttga tgaccgcaa 1500
 gaagtgcgcg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac tcccccttac tacggaagaa 1560
 ggatag 1566

10 <210> 34
 < 211> 1566
 < 212> ADN
 < 213> Corynebacterium glutamicum

ES 2 643 014 T3

<400> 34
atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcacccctcaa gggctctgcc 60
cagggcggtc ccgctcacgc agtaggggaa caagcaatcg cggctattgg tcttgactcc 120
tccagcttac ctacctcgga cgctattttt gctgcagttc caggaaccgc cactcacggc 180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgtgg ccattttgac tgacgcagct 240
taccttgagg tgctcaacga agcaggagag acccgcccag tcatcgttgt tgatgatgtc 300
cgcgcagtac ttggcgcagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaaa agatttcacg 360
ctcattggag tcactggaac ctcaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga 420
ctcatggagg caggccacaa agttggtttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg 480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct 540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgtg gtgatggaag tatccagcca tgcatgtca 600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgctt ttaccaacct gtcgcaggat 660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttccgc 720
gcagattctc cacttggtgc tgacaaacag gtcgtgtgcg tggatgattc ttggggtcag 780
cgcattggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca cccttgggca agaagcagac 840
ttcagcgcta cagacatcaa tgtcagcgac tctggcgccc agagttttaa gatcaacgcc 900
ccctcaaacc agtcctacca ggtcgagcta gctcttccag gtgcgttcaa cgttgctaac 960
gccacgttg catttgccgc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga 1020
ggcatgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc 1080
cttgagtggt tggattatgc ccacaagcct gctgcagtggt ctgctgtgtt ggatacgttg 1140
aggaccacga ttgacgggag cctcggagtg gttatcgggt ctgggtggaga ccgcgattcc 1200
accaagcggt gccccatggg gcagttgtcc gcacagcggt ctgatctagt tattgtcact 1260
gatgacaacc ctcgttcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca 1320
cagcagggtg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca 1380
gaagcaattc gcgttttggc cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga 1440
aaaggccatg aagttggaca actagttgct ggtgtcaccc accattttga tgaccgcgaa 1500
gaagttcgcg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac ttccccttac tacggaagaa 1560
ggatag 1566

- 5 <210> 35
< 211> 1566
< 212> ADN
< 213> Corynebacterium glutamicum

ES 2 643 014 T3

```

<400> 35
atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcatacctcaa gggctctgcc      60
cagggcggtc ccgctcacgc agtaggggaa caagcaatcg cggtattgg tcttgactcc      120
tccagcttac ctacctcgga cgctatTTTT gctgcagttc caggaacccg cactcacggc      180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgtgg ccattttgac tgacgcagct      240
aaccttgagg tgctcaacga agcaggagag acccgcccag tcacgtttgt tgatgatgtc      300
cgcgcagtac ttggcgagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaaa agatttcacg      360
ctcattggag tcaactggaac ctcaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga      420
ctcatggagg cagggcacaa agttggtttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg      480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct      540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgtg gtgatggaag tatccagcca tgcattgtca      600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgctt ttaccaacct gtcgcaggat      660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttccgc      720
gcagattctc cacttggtgc tgacaaacag gtcgtgtgcg tggatgattc ttggggtcag      780
cgcatggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca cccttgggca agaagcagac      840
ttcagcgcta cagacatcaa tgtagcgac tctggcgccc agagttttaa gatcaacgcc      900
ccctcaaacc agtcctacca ggtcgagcta gctcttcag gtgcgttcaa cgttgctaac      960
gccacgttgg catttgccgc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga     1020
ggcatgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc     1080
cttgcagtggt tggattatgc ccacaagcct gctgcagtggt ctgctgtgtt ggatacgttg     1140
aggaccacaga ttgacgggcg cctcggagtg gttatcgggt ctggtggaga ccgcatgcc     1200
accaagcggtg gcccctatgg gcagttgtcc gcacagcgtg ctgatctagt tattgtcact     1260
gatgacaacc ctcgttcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca     1320
cagcaggggtg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca     1380
gaagcaattc gcgttttggt cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga     1440
aaaggccatg aagttggaca actagtgtgt ggtgtcaccc accattttga tgaccgcgaa     1500
gaagttcgcg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac ttccccttac tacggaagaa     1560
ggatag                                           1566

```

- 5 <210> 36
 < 211> 1566
 < 212> ADN
 < 213> Corynebacterium glutamicum

```

<400> 36
atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcatcctcaa gggctctgcc      60
cagggcggtc ccgctcacgc agtaggggaa caagcaatcg cggctattgg tcttgactcc      120
tccagcttac ctacctcgga cgctatTTTT gctgcagttc caggaacccg cactcacggc      180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgtgg ccattttgac tgacgcagct      240
tgccttgagg tgcTcaacga agcaggagag acccgcccag tcatcgttgt tgatgatgtc      300
cgcgcagtac ttggcgcagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaaa agatttcacg      360
ctcattggag tcactggaac ctCaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga      420
ctcatggagg cagggccaaa agttggtttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg      480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct      540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgtg gtgatggaag tatccagcca tgcattgtca      600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgctt ttaccaacct gtcgcaggat      660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttccgc      720
gcagattctc cacttggtggc tgacaaacag gtcgtgtgcg tggatgattc ttggggctcag      780
cgcatggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca ccttggggca agaagcagac      840
ttcagcgcta cagacatcaa tgtcagcgac tctggcgccc agagttttaa gatcaacgcc      900

ccctcaaacc agtccTacca ggtcgagcta gctcttccag gtgcgttcaa cgttgctaac      960
gccacgttg catttgccgc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga      1020
ggcatgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc      1080
cttgCagtgg tggattatgc ccacaagcct gctgcagtgg ctgctgtgtt ggatacgttg      1140
aggaccCaga ttgacgggCg cctcgagtg gttatcggtg ctggtggaga ccgcgattcc      1200
accaagcgTg gccccatggg gcagttgtcc gcacagcgTg ctgatctagt tattgtcact      1260
gatgacaacc ctCgttcaga ggtgcctgcc acgattcgCg cagcagtcac tgcaggagca      1320
cagcagggTg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca      1380
gaagcaattc gcgttttggT cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga      1440
aaaggccatg aagttggaca actagtTgct ggtgtcaccC accattttga tgaccgcgaa      1500
gaagtTcgCg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac tcccccttac tacggaagaa      1560
ggatag                                         1566

```

- 5 <210> 37
 < 211> 1566
 < 212> ADN
 < 213> corynebacterium glutamicum


```

<400> 37
atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcacccctcaa gggctctgcc      60
cagggcggtc ccgctcacgc agtaggggaa caagcaatcg cggctattgg tcttgactcc      120
tccagcttac ctacctcgga cgctattttt gctgcagttc caggaacccg cactcacggc      180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgtgg ccattttgac tgacgcagct      240
tcccttgagg tgctcaacga agcaggagag acccgcccag tcatcgttgt tgatgatgtc      300
cgcgcagtac ttggcgcagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaaa agatttcacg      360
ctcattggag tcactggaac ctcaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga      420
ctcatggagg cagggccaaa agttggtttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg      480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct      540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgtg gtgatggaag tatccagcca tgcattgtca      600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgctt ttaccaacct gtcgcaggat      660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttccgc      720
gcagattctc cacttggtgc tgacaaacag gtcgtgtgcg tggatgattc ttggggtcag      780
cgcatggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca cccttgggca agaagcagac      840
ttcagcgcta cagacatcaa tgctcagcgc tctggcgccc agagttttaa gatcaacgcc      900
ccctcaaacc agtccctacca ggtcgagcta gctcttccag gtgcgttcaa cgttgctaac      960
gccacgttgg catttgccgc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga     1020
ggcatgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc     1080

cttgcaagtg tggattatgc ccacaagcct gctgcagtggt ctgctgtgtt ggatacgttg     1140
aggaccacga ttgacgggag cctcggagtg gttatcggtg ctggtggaga ccgcgattcc     1200
accaagcgtg gccccatggg gcagttgtcc gcacagcgtg ctgatctagt tattgtcact     1260
gatgacaacc ctcgctcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca     1320
cagcaggggtg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca     1380
gaagcaattc gcgttttggt cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga     1440
aaaggccatg aagttggaca actagttgct ggtgtcaccc accattttga tgaccgcgaa     1500
gaagttcgcg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac ttccccttac tacggaagaa     1560
ggatag                                           1566

```

- 5 <210> 38
 < 211> 1566
 < 212> ADN
 < 213> Corynebacterium glutamicum

```

<400> 38
atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcatacctcaa gggctctgcc      60
cagggcggtc ccgctcacgc agtaggggaa caagcaatcg cggctattgg tcttgactcc      120
tccagcttac ctacctcgga cgctatTTTT gctgcagttc caggaaccgc cactcacggc      180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgtgg ccattttgac tgacgcagct      240
ttccttgagg tgctcaacga agcaggagag acccgcccag tcatcgttgt tgatgatgtc      300
cgcgcagtac ttggcgcagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaa agatttcacg      360
ctcattggag tcaactggaac ctacaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga      420
ctcatggagg cagggccacaa agttgggttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg      480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct      540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgtg gtgatggaag tatccagcca tgcattgtca      600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgctg ttaccaacct gtcgcaggat      660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttccgc      720
gcagattctc cacttggtggc tgacaaacag gtcgtgtgcg tggatgattc ttggggtcag      780
cgcattggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca cccttgggca agaagcagac      840
ttcagcgcta cagacatcaa tgtcagcgac tctggcgccc agagttttaa gatcaacgcc      900
ccctcaaacc agtcttacca ggtcgagcta gctcttcag gtgcgttcaa cgttgctaac      960
gccacgttgg catTTGCCGc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga     1020
ggcatgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc     1080
cttgacgtgg tggattatgc ccacaagcct gctgcagtgg ctgctgtgtt ggatacgttg     1140
aggaccacga ttgacgggcg cctcggagtg gttatcggtg ctggtggaga ccgcgattcc     1200
accaagcgtg gccccatggg gcagttgtcc gcacagcgtg ctgatctagt tattgtcact     1260
gatgacaacc ctcgttcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca     1320
cagcaggggtg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca     1380
gaagcaattc gcgttttggc cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga     1440
aaaggccatg aagttggaca actagttgct ggtgtcacc accattttga tgaccgcgaa     1500
gaagttcgcg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac ttccccttac tacggaagaa     1560
ggatag                                           1566

```

- 5 <210> 39
 < 211> 1566
 < 212> ADN
 < 213> Corynebacterium glutamicum

ES 2 643 014 T3

```

<400> 39
atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcatcctcaa gggctctgcc      60
cagggcgttc ccgctcacgc agtaggggaa caagcaatcg cggctattgg tcttgactcc      120
tccagcttac ctacctcgga cgctatTTTT gctgcagttc caggaacccg cactcacggc      180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgtgg ccattttgac tgacgccgct      240
gtgcttgagg tgctcaacga agcaggagag acccgcccag tcatcgttgt tgatgatgtc      300
cgcgcagtac ttggcgcagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaaa agatttcacg      360
ctcattggag tcactggaac ctcaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga      420
ctcatggagg cagggccaaa agttggtttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg      480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct      540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgtg gtgatggaag tatccagcca tgcattgtca      600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgctg ttaccaacct gtcgcaggat      660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttcgcg      720
gcagattctc cacttggtggc tgacaaacag gtcgtgtgcg tggatgattc ttggggtcag      780
cgcattggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca cccttgggca agaagcagac      840
ttcagcgcta cagacatcaa tgcagcgac tctggcgccc agagttttaa gatcaacgcc      900
ccctcaaacc agtcttacca ggtcgagcta gctcttcag gtgcgttcaa cgttgctaac      960
gccacgttgg catttgccgc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga     1020
ggcatgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc     1080
cttgacgttg tggattatgc ccacaagcct gctgcagtgg ctgctgtgtt ggatacgttg     1140
aggaccacga ttgacgggcg cctcgagtg gttatcggtg ctgggtggaga ccgcgattcc     1200
accaagcgtg gccccatggg gcagttgtcc gcacagcgtg ctgatctagt tattgtcact     1260
gatgacaacc ctggttcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca     1320
cagcaggggtg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca     1380
gaagcaattc gcgttttggt cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga     1440
aaaggccatg aagttggaca actagttgct ggtgtcacc accattttga tgaccgcgaa     1500
gaagttcgcg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac ttccccttac tacggaagaa     1560
ggatag                                           1566

```

- 5 <210> 40
 < 211> 1566
 < 212> ADN
 < 213> Corynebacterium glutamicum

ES 2 643 014 T3

```

<400> 40
atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcaccccaa gggctctgcc      60
cagggcggtc ccgctcacgc agtaggggaa caagcaatcg cggctattgg tcttgactcc      120
tccagcttac ctacctcgga cgctatTTTT gctgcagttc caggaacccg cactcacggc      180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgtgg ccattttgac tgacgcagct      240
ctgcttgagg tgctcaacga agcaggagag acccgcccag tcatcgttgt tgatgatgtc      300
cgcgcagtac ttggcgagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaa agatttcacg      360
ctcattggag tcaactggaac ctcaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga      420
ctcatggagg cagggcacaa agttgggttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg      480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct      540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgctg gtgatggaag tatccagcca tgcattgtca      600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgctt ttaccaacct gtcgcaggat      660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttccgc      720
gcagattctc cacttggtgg tgacaaacag gtcgtgtgcg tggatgattc ttggggtcag      780
cgcatggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca cccttgggca agaagcagac      840
ttcagcgcta cagacatcaa tgtcagcgac tctggcgccc agagttttaa gatcaacgcc      900
ccctcaaacc agtcttacca ggtcgagcta gctcttcag gtgcgttcaa cgttgctaac      960
gccacgttgg catttgccgc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga     1020
ggcatgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc     1080
cttgacgttg tggattatgc ccacaagcct gctgcagttg ctgctgtgtt ggatacgttg     1140
aggaccacga ttgacgggcg cctcggagtg gttatcggtg ctggtggaga ccgcgatttc     1200
accaagcgtg gccccatggg gcagttgtcc gcacagcgtg ctgatctagt tattgtcact     1260
gatgacaacc ctggttcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca     1320
cagcaggggtg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca     1380
gaagcaattc gcgttttggt cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga     1440
aaaggccatg aagttggaca actagttgct ggtgtcacc accattttga tgaccgcgaa     1500
gaagttcgcg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac ttccccttac tacggaagaa     1560
ggatag                                           1566

```

<210> 41

< 211> 1566

< 212> ADN

< 213> Corynebacterium glutamicum

5

ES 2 643 014 T3

```

<400> 41
atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcatacctcaa gggctctgcc      60
caggcgcttc ccgctcacgc agtaggggaa caagcaatcg cggctattgg tcttgactcc      120
tccagcttac ctacctcgga cgctattttt gctgcagttc caggaacccg cactcacggc      180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgtgg ccattttgac tgacgcagct      240
caccttgagg tgcacaacga agcaggagag acccgcccag tcacgcttgt tgatgatgtc      300
cgcgcagtac ttggcgcagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaaa agatttcacg      360
ctcattggag tcaactggaac ctcaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga      420
ctcatggagg caggccacaa agttggtttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg      480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct      540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgtg gtgatggaag tatccagcca tgcattgtca      600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgctt ttaccaacct gtcgcaggat      660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttccgc      720
gcagattctc cacttggtgc tgacaaacag gtcgtgtgcg tggatgattc ttggggctcag      780
cgcatggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca cccttgggca agaagcagac      840
ttcagcgcta cagacatcaa tgtcagcgac tctggcgccc agagttttta gatcaacgcc      900
ccctcaaacc agtccctacca ggtcgagcta gctcttccag gtgcgttcaa cgttgctaac      960
gccacgttgg catttgccgc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga     1020
ggcatgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc     1080
cttgacgttg tggattatgc ccacaagcct gctgcagtggt ctgctgtgtt ggatacgttg     1140
aggacccaga ttgacgggcg cctcggagtg gttatcggtg ctggtggaga ccgcgatttc     1200
accaagcgtg gccccatggg gcagttgtcc gcacagcgtg ctgatctagt tattgtcact     1260
gatgacaacc ctcgttcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca     1320
cagcagggtg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca     1380
gaagcaattc gcgttttggt cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga     1440
aaaggccatg aagttggaca actagttgct ggtgtcacc accattttga tgaccgcgaa     1500
gaagttcgcg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac ttcccccttac tacggaagaa     1560
ggatag                                           1566

```

```

<210> 42
< 211> 1566
< 212> ADN
< 213> Corynebacterium glutamicum

```

5

<400> 42
atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcaccccaa gggctctgcc 60
cagggcggtc ccgtccacgc agtaggggaa caagcaatcg cggtattgg tcttgactcc 120
tccagcttac ctacctcgga cgctatTTTT gctgcagttc caggaacccg cactcacggc 180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgtgg ccattttgac tgacgcagct 240
atccttgagg tgctcaacga agcaggagag acccgcccag tcatcgttgt tgatgatgtc 300
cgcgcagtac ttggcgcagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaa agatttcacg 360
ctcattggag tccactggaac ctccaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga 420
ctcatggagg cagggccaaa agttgggttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg 480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct 540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgtg gtgatggaag tatccagcca tgcattgtca 600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgcgt ttaccaacct gtcgcaggat 660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttccgc 720
gcagattctc cacttggtggc tgacaaacag gtcgtgtgcg tggatgattc ttggggctcag 780
cgcatggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca cccttgggca agaagcagac 840
ttcagcgcta cagacatcaa tgcagcgac tctggcgccc agagtttta gatcaacgcc 900
ccctcaaacc agtcttacc ggtcgagcta gctcttccag gtgcgttcaa cgttgctaac 960
gccacgttgg catTTTgcgc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga 1020
ggcatgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc 1080
cttgcaagtg ttgattatgc ccacaagcct gctgcagtgg ctgctgtgtt ggatacgttg 1140
aggacccaga ttgacgggcg cctcggagtg gttatcggtg ctggtggaga ccgcgattcc 1200
accaagcgtg gccccatggg gcagttgtcc gcacagcgtg ctgatctagt tattgtcact 1260
gatgacaacc ctcggtcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca 1320
cagcaggggtg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca 1380
gaagcaattc gcgttttggc cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga 1440
aaaggccatg aagttggaca actagtgtgt ggtgtcacc accattttga tgaccgcgaa 1500
gaagtgcgcg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac tcccccttac tacggaagaa 1560
ggatag 1566

<210> 43
< 211> 1566
< 212> ADN
< 213> Corynebacterium glutamicum

ES 2 643 014 T3

<400> 43
atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcatcctcaa gggctctgcc 60
cagggcggtc ccgctcacgc agtaggggaa caagcaatcg cggctattgg tcttgactcc 120
tccagcttac ctacctcgga cgctattttt gctgcagttc caggaaccgc cactcacggc 180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgtgg ccattttgac tgacgcagct 240
acccttgagg tgctcaacga agcaggagag acccgcccag tcatcgttgt tgatgatgtc 300
cgcgcagtac ttggcgcagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaa agatttcacg 360
ctcattggag tctactggaac ctcaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga 420
ctcatggagg cagggcacia agttggtttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg 480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct 540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgtg gtgatggaag tatccagcca tgcatgtca 600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgctt ttaccaacct gtcgcaggat 660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttccgc 720
gcagattctc cacttggtggc tgacaaacag gtcgtgtgcg tggatgattc ttggggtcag 780
cgcattggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca cccttgggca agaagcagac 840
ttcagcgcta cagacatcaa tgctcagcagc tctggcgccc agagttttaa gatcaacgcc 900
ccctcaaacc agtcttacc ggtcgagcta gctcttcag gtgcgttcaa cgttgctaac 960
gccacgttgg catttgccgc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga 1020
ggcatgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc 1080
cttgagtggt tggattatgc ccacaagcct gctgcagtggt ctgctgtgtt ggatacgttg 1140
aggacccaga ttgacgggcg cctcggagtg gttatcggtg ctggtggaga ccgcgattcc 1200
accaagcgtg gccccatggg gcagttgtcc gcacagcgtg ctgatctagt tattgtcact 1260
gatgacaacc ctcggtcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca 1320
cagcaggggtg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca 1380
gaagcaattc gcgttttggt cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga 1440
aaaggccatg aagttggaca actagtgtgt ggtgtcacc accattttga tgaccgcgaa 1500
gaagtgcgcg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac tcccccttac tacggaagaa 1560
ggatag 1566

<210> 44
< 211> 1566
< 212> ADN
< 213> Corynebacterium glutamicum

ES 2 643 014 T3

<400> 44
atggcaacca cgttgctgga cctcaccaaa cttatcgatg gcatcctcaa gggctctgcc 60
cagggcggtc ccgctcacgc agtaggggaa caagcaatcg cggctattgg tcttgactcc 120
tccagcttac ctacctcgga cgctatTTTT gctgcagttc caggaacccg cactcacggc 180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagctgtgg ccattttgac tgacgcagct 240
cgccttgagg tgctcaacga agcaggagag acccgcccag tcatcgttgt tgatgatgtc 300
cgcgcagtac ttggcgcagc atcatcaagc atttatggcg atccttcaaa agatttcacg 360
ctcattggag tcactggaac ctcaggtaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga 420
ctcatggagg caggccacaa agttggtttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg 480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct 540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgctg gtgatggaag tatccagcca tgcattgtca 600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat gtagctgctt ttaccaacct gtcgcaggat 660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcatt gttcttccgc 720
gcagattctc cacttggtgc tgacaaacag gtcgtgtgcg tggatgattc ttggggtcag 780
cgcattggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagtatcca ccttgggca agaagcagac 840
ttcagcgcta cagacatcaa tgtcagcgac tctggcgccc agagttttaa gatcaacgcc 900
ccctcaaacc agtcctacca ggtcgagcta gctcttcag gtgcgttcaa cgttgctaac 960
gccacgttg catttgccgc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gtttgctcga 1020
ggcatgtcca aggtcgcggt tccaggccgt atggaacgca ttgatgaggg acaagacttc 1080
cttgcagtgg tggattatgc ccacaagcct gctgcagtgg ctgctgtgtt ggatacgttg 1140
aggaccagga ttgacgggcg cctcgagtg gttatcggtg ctggtggaga ccgcgattcc 1200
accaagcgtg gccccatggg gcagttgtcc gcacagcgtg ctgatctagt tattgtcact 1260
gatgacaacc ctcgttcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca 1320
cagcaggggtg cttcagagtc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaaattgg tgaccgtgca 1380
gaagcaattc gcgttttggc cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga 1440
aaaggccatg aagtgggaca actagtgtgt ggtgtcaccc accattttga tgaccgcgaa 1500
gaagtgcgcg ctgctttgac agaaaagctc aacaataaac ttccccctac tacggaagaa 1560
ggatag 1566

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo modificado genéticamente con respecto a su tipo salvaje que comprende una secuencia génica que codifica un sensor de metabolitos, que codifica una proteína que reconoce a un aminoácido, un ácido orgánico, un ácido graso, una vitamina o una sustancia activa vegetal,
caracterizado porque
 el microorganismo contiene un vector, que contiene un gen que codifica una recombinasa que no está presente en el tipo salvaje del microorganismo según de una de las secuencias 8, 4, 9, 7, 6, 5 o 3.
2. Un microorganismo según la reivindicación 1,
caracterizado porque
 la secuencia génica que codifica una recombinasa es una secuencia que codifica una proteína, que recombina a un ADN añadido extracelularmente con un ADN propio de la célula.
3. Un microorganismo según una de las reivindicaciones 1 o 2,
caracterizado porque
 el microorganismo es un microorganismo del género *Corynebacterium*, *Enterobacterium* o *Escherichia*.
4. Un procedimiento para identificar a un microorganismo tomado del conjunto que se compone de *Corynebacterium*, *Enterobacterium* o *Escherichia*, que contiene un vector según la secuencia 4 u 8 con una concentración intracelular, elevada con respecto a su tipo salvaje, de un determinado metabolito tomado del conjunto que se compone de un aminoácido, un ácido orgánico, un ácido graso, vitaminas o una sustancia activa vegetal en una suspensión de células, que incluye las etapas de procedimiento de:
 - i) poner a disposición una suspensión de células que contiene el microorganismo tomado del conjunto que se compone de *Corynebacterium*, *Enterobacterium* o *Escherichia*, que contiene un vector según la secuencia 4 u 8 y adicionalmente una secuencia génica que codifica un sensor de metabolitos, que reconoce a metabolitos tomados del conjunto que se compone de un aminoácido, un ácido orgánico, un ácido graso, vitaminas o una sustancia activa vegetal;
 - ii) modificar genéticamente las células según la etapa i) por recombinación mediando adición de un ADN, que contiene por lo menos un gen G1 hasta Gn modificado o por lo menos una mutación M1 hasta Mm, mediando obtención de una suspensión de células, en la que las células se diferencian en lo que se refiere a la concentración intracelular del metabolito;
 - iii) identificar células individuales en la suspensión de células con una concentración intracelular elevada del metabolito por detección de fluorescencia mediante un sensor de metabolitos para aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, vitaminas o sustancias activas vegetales.
5. Un procedimiento para producir un microorganismo modificado genéticamente con respecto a su tipo salvaje tomado del conjunto que se compone de *Corynebacterium*, *Enterobacterium* o *Escherichia* con producción optimizada de un metabolito tomado del conjunto que se compone de un aminoácido, un ácido orgánico, un ácido graso, vitaminas o una sustancia activa vegetal, que incluye las siguientes etapas:
 - i) poner a disposición una suspensión de células que contiene el microorganismo tomado del conjunto que se compone de *Corynebacterium*, *Enterobacterium* o *Escherichia*, que contiene un vector según la secuencia 4 u 8 y adicionalmente una secuencia génica que codifica un sensor de metabolitos, que reconoce a metabolitos tomados del conjunto que se compone de un aminoácido, un ácido orgánico, un ácido graso, vitaminas o una sustancia activa vegetal;
 - ii) modificar genéticamente las células según la etapa i) por recombinación mediando adición de un ADN, que contiene por lo menos un gen G1 hasta Gn modificado o por lo menos una mutación M1 hasta Mm, mediando obtención de una suspensión de células, en la que las células se diferencian en lo que se refiere a la concentración intracelular del metabolito;
 - iii) identificar células individuales en la suspensión de células con una concentración intracelular elevada del metabolito por detección de fluorescencia mediante un sensor de metabolitos para aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, vitaminas o sustancias activas vegetales.
 - iv) separar las células identificadas a partir de la suspensión de células;
 - v) identificar por lo menos a un gen G1 hasta Gn modificado genéticamente o por lo menos a una mutación M1 hasta Mm en las células identificadas y separadas, que es responsable de la elevada concentración intracelular del metabolito;
 - vi) producir una célula productora modificada genéticamente con respecto a su tipo salvaje con una optimizada producción del metabolito, cuyo genoma comprende por lo menos uno de los genes G1 hasta Gm y/o por lo menos una mutación M1 hasta Mm.
6. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 4 hasta 5,
caracterizado porque

la modificación genética de la célula según la etapa ii) se efectúa mediante una recombinasa, que contiene una o varias moléculas de ADN incorporadas en la célula, que contiene el gen modificado o los genes G1 hasta Gn modificados y/o la mutación o las mutaciones M1 hasta Mm, incorpora en el ADN propio de la célula, que se presenta como cromosoma o plásmido.

5 7. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 5 o 6,
caracterizado porque
se emplea un ADN para por lo menos un gen G1 hasta Gn modificado y/o por lo menos una mutación M1 hasta Mm, que codifican una de las etapas de la ruta de biosíntesis del metabolito.

10 8. Un procedimiento para producir un metabolito, que incluye las etapas de procedimiento de:

a) producir una célula modificada genéticamente con respecto a su tipo salvaje con una optimizada producción de un determinado metabolito mediante un procedimiento según las reivindicaciones 5 hasta 7,
15 b) cultivar la célula en un medio de cultivo, que contiene sustancias nutricias en unas condiciones en las que la célula procedente de las sustancias nutricias produce el determinado metabolito.

9. Un procedimiento según la reivindicación 8,
caracterizado porque
el metabolito es un componente tomado del conjunto que se compone de aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, vitaminas o sustancias activas vegetales.

20

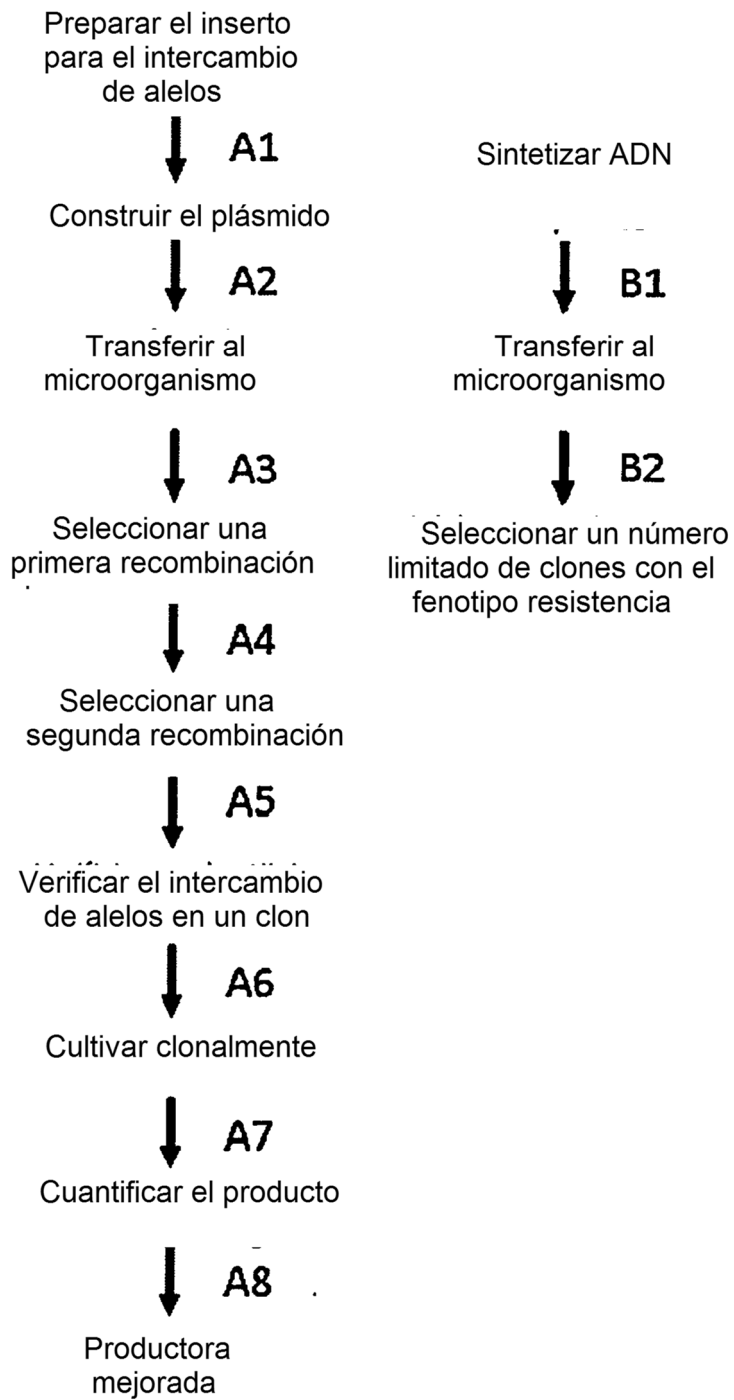


Fig. 1

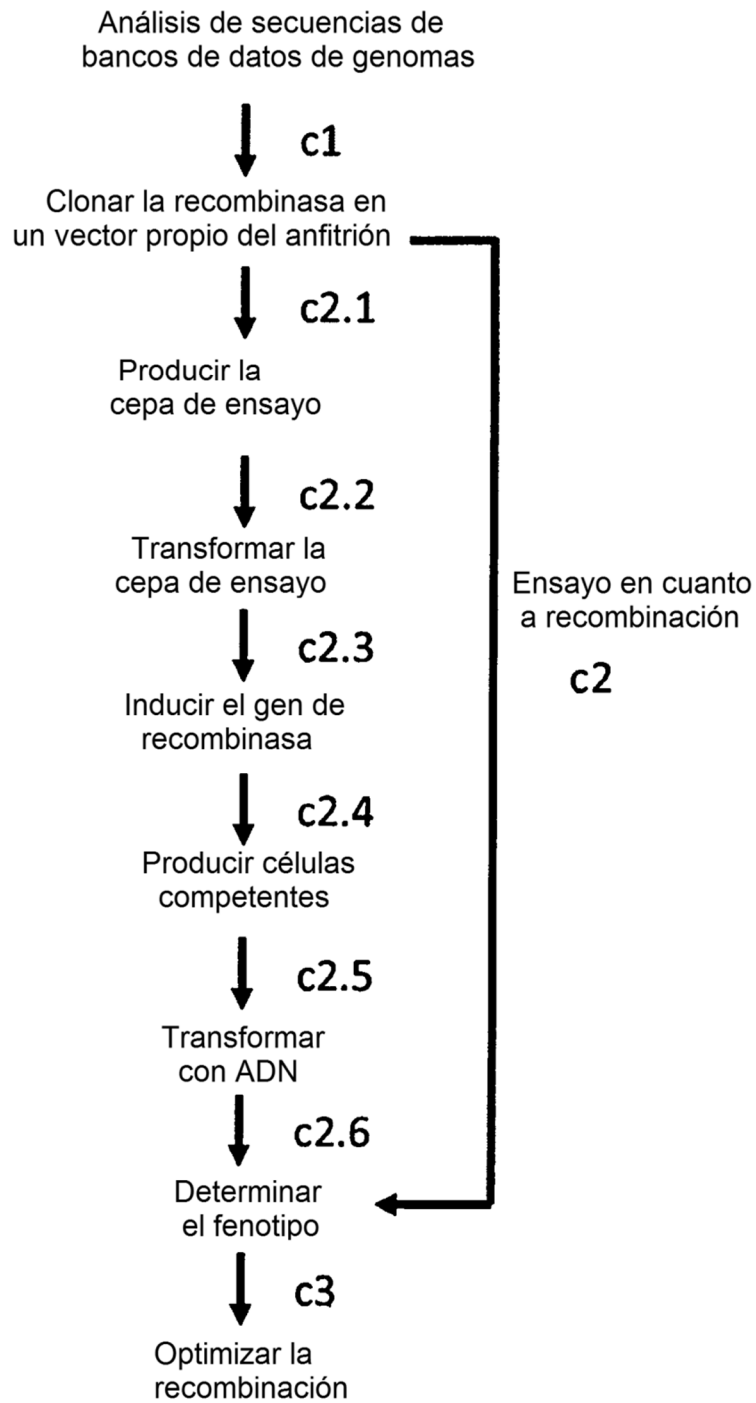


Fig. 2

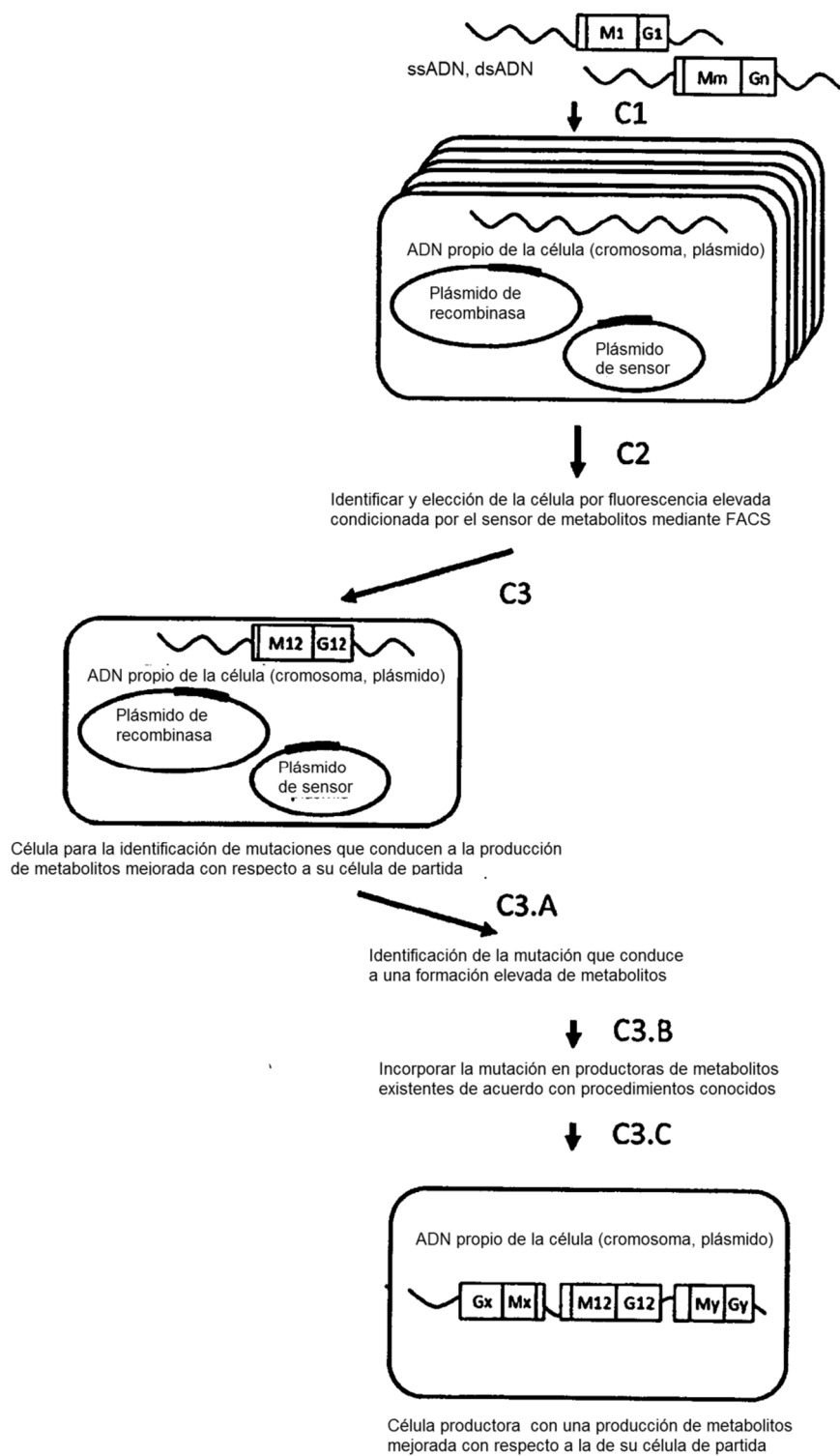


Fig. 3