

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 313**

51 Int. Cl.:

C12P 7/58 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2010 PCT/US2010/062275**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11090730**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2010 E 10844275 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2519642**

54 Título: **Traustoquítridos recombinantes que crecen en xilosa, y composiciones, métodos de preparación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

28.12.2009 US 290471 P

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

25.01.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LIPPMEIER, JAMES CASEY y
APT, KIRK E.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 651 313 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

Traustoquítridos recombinantes que crecen en xilosa, y composiciones, métodos de preparación y usos de los mismos

5 Referencia solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud de Estados Unidos n.º 61/290.471, presentada el 28 de diciembre de 2009.

10 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere a un método de producción de un cultivo celular de traustoquítridos, que comprende: a. transformar una célula de traustoquítridos con moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador heterólogo de xilosa, una isomerasa heteróloga de xilosa y una cinasa heteróloga de xilulosa; o con moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador heterólogo de xilosa, una cinasa heteróloga de xilulosa, una reductasa heteróloga de xilosa y una xilitol deshidrogenasa heteróloga; en el que los genes heterólogos tienen los codones optimizados para su expresión en la célula de traustoquítridos, y los genes heterólogos están bajo el control de cualquier secuencia promotora, cualquier secuencia terminadora y/o cualquier otra secuencia reguladora que es funcional en una célula de traustoquítridos; y b. cultivar la célula de traustoquítridos transformada en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono, y cultivos celulares que comprenden los traustoquítridos recombinantes, así como métodos de producción de cultivos celulares, biomasa, aceites microbianos, composiciones y biocombustibles usando los traustoquítridos recombinantes.

Antecedentes

30 Los ácidos grasos se clasifican basándose en la longitud y características de saturación de la cadena de carbono. Los ácidos grasos se denominan ácidos grasos de cadena corta, de cadena media o de cadena larga basándose en el número de carbonos presentes en la cadena, se denominan ácidos grasos saturados cuando no hay dobles enlaces presentes entre los átomos de carbono, y se denominan ácidos grasos insaturados cuando hay dobles enlaces presentes. Los ácidos grasos de cadena larga insaturados están monosaturados cuando hay únicamente un doble enlace presente y están poliinsaturados cuando hay más de un doble enlace presente.

35 Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se clasifican basándose en la posición del primer doble enlace desde el extremo metilo del ácido graso: los ácidos grasos omega-3 (n-3) contienen un primer doble enlace en el tercer carbono, mientras que los ácidos grasos omega-6 (n-6) contienen un primer doble enlace en el sexto carbono. Por ejemplo, el ácido docosahexaenoico ("DHA") es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga omega-3 (LC-PUFA) con una longitud de cadena de 22 carbonos y 6 dobles enlaces, a menudo denominado "22:6 n-3". Otros LC-PUFA omega-3 incluyen ácido eicosapentaenoico ("EPA"), denominado "20:5 n-3" y ácido docosapentaenoico omega-3 ("DPA n-3"), denominado "22:5 n-3". DHA y EPA se han llamado ácidos grasos "esenciales". Los LC-PUFA omega-6 incluyen ácido araquidónico ("ARA"), denominado "20:4 n-6" y ácido docosapentaenoico omega-6 ("DPA n-6"), denominado "22:5 n-6".

40 Los ácidos grasos omega-3 son moléculas biológicamente importantes que afectan a la fisiología celular debido a su presencia en las membranas celulares, regulan la producción y la expresión génica de compuestos biológicamente activos y sirven como sustratos biosintéticos. Roche, H. M., Proc. Nutr. Soc. 58: 397-401 (1999). El DHA, por ejemplo, representa aproximadamente un 15 %-20 % de los lípidos en la corteza cerebral humana y un 30 %-60 % de los lípidos en la retina, está concentrado en los testículos y el esperma y es un componente importante de la leche materna. Jean-Pascal Bergé & Gilles Barnathan, Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms: Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds, and Economical Aspects, in Marine Biotechnology I 49 (T. Scheper, ed., 2005). El DHA representa hasta un 97 % de los ácidos grasos omega-3 en el cerebro y hasta un 93 % de los ácidos grasos omega-3 en la retina. Además, el DHA es esencial para el desarrollo tanto fetal como infantil, así como para el mantenimiento de las funciones cognitivas en adultos. *Id.* Los ácidos grasos omega-3, incluyendo DHA y EPA, también poseen propiedades antiinflamatorias. Véase, por ejemplo, *id.* y Simopoulos, A.P., J. Am. Coll. Nutr. 21: 495-595 (2002). En particular, el EPA compite con el ácido araquidónico por la síntesis de eicosanoides tales como prostaglandinas y leucotrienos a través de ciclooxigenasas y lipoxigenasas. *Id.* Como los ácidos grasos omega-3 no se sintetizan de *novo* en el cuerpo humano, estos ácidos grasos deben obtenerse de fuentes nutritivas.

60 Los traustoquítridos, que son organismos microalgáceos del orden *Thraustochytriales*, están reconocidos como fuentes alternativas para la producción de lípidos. Por ejemplo, se ha informado de que cepas de especies de traustoquítridos producen ácidos grasos omega-3 como un alto porcentaje de los ácidos grasos totales producidos por los organismos. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.130.242; Huang, J. *et al.*, J. Am. Oil.

Chem. Soc. 78: 605-610 (2001); Huang, J. *et al.*, Mar. Biotechnol. 5: 450-457 (2003). Los traustóquiritos también se han reconocido como fuentes de lípidos para la producción de biocombustibles. Véase, por ejemplo, la publicación de Estados Unidos n.º 2009/0064567 y el documento WO 008/067605.

5 La biomasa vegetal está compuesta de tres fracciones principales; celulosa, hemicelulosas y lignina. La celulosa está compuesta principalmente de polímeros de glucosa, la hemicelulosa que está enriquecida con polímeros de xilosa y la lignina que está compuesta principalmente de compuestos polifenólicos complejos. Los carbohidratos derivados de estas fracciones de biomasa se han mencionado colectivamente como azúcares lignocelulósicos y se han investigado como una fuente de materias primas renovables de bajo coste para la fermentación de etanol.

10 La hemicelulosa vegetal de fuentes tales como bagazo de caña de azúcar, rastrojo de maíz, pasto varilla, paja de trigo, madera dura y blanda, y similares puede ser una fuente de azúcares enriquecidos en xilosa. Los azúcares pueden liberarse de la hemicelulosa a través de hidrólisis ácida y/o digestión enzimática.

15 Aunque los traustóquiritos metabolizan la glucosa y/o la fructosa, no parecen metabolizar de forma natural la xilosa. Véase, por ejemplo, Honda *et al.*, Mycol. Res. 4:439-448 (1998); Goldstein, American J. of Botany 50:271-279 (1963); Damare, Indian Journal of Marine Sciences 35:326-340 (2006). Por tanto, los cultivos de traustóquiritos incluyendo los cultivos comerciales e industriales, actualmente requieren jarabes de glucosa como fuentes de carbono y energía.

20 Existe una necesidad continuada de producción de traustóquiritos con la capacidad de crecer sobre fuentes de carbono alternativas tales como xilosa para su uso en aplicaciones comerciales e industriales.

Breve resumen de la invención

25 La presente invención se refiere a un método de producción de un cultivo celular de traustóquiritos, que comprende: a. transformar una célula de traustóquiritos con moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador heterólogo de xilosa, una isomerasa heteróloga de xilosa y una cinasa heteróloga de xilulosa; o con moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador heterólogo de xilosa, una cinasa heteróloga de xilulosa, una reductasa heteróloga de xilosa y una xilitol deshidrogenasa heteróloga; en el que los genes heterólogos tienen los codones optimizados para su expresión en la célula de traustóquiritos, y los genes heterólogos están bajo el control de cualquier secuencia promotora, cualquier secuencia terminadora y/o cualquier otra secuencia reguladora que sea funcional en una célula de traustóquiritos; y b. cultivar la célula de traustóquiritos transformada en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono. La presente invención se define por las reivindicaciones. La materia objeto fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona con fines informativos únicamente. En algunas realizaciones, la célula de traustóquiritos expresa un transportador heterólogo de xilosa, una xilosa isomerasa heteróloga y una cinasa heteróloga de xilulosa. En algunas realizaciones, la célula de traustóquiritos expresa un transportador heterólogo de xilosa, una reductasa heteróloga de xilosa, una xilitol deshidrogenasa heteróloga y una cinasa heteróloga de xilulosa. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido asociado con la importación de xilosa es al menos un 90 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: la secuencia polinucleotídica de n.º de acceso AJ875406, BT015128, AF127802, AJ249910, X59465 o X55392; una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de n.º de acceso CAB76571; la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23; y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el traustóquiritido es un *Schizochytrium* o un *Thraustochytrium*. En algunas realizaciones, la invención se refiere a un cultivo celular de traustóquiritos producido por el método.

50 En algunas realizaciones, la célula de traustóquiritos expresa un transportador heterólogo de xilosa, una cinasa heteróloga de xilulosa, una reductasa heteróloga de xilosa y una xilitol deshidrogenasa heteróloga. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido asociado con la importación de xilosa es al menos un 90 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: la secuencia polinucleotídica de n.º de acceso AJ875406, BT015128, AF127802, AJ249910, X59465 o X55392; una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de n.º de acceso CAB76571; la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23; y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el traustóquiritido es un *Schizochytrium* o un *Thraustochytrium*.

60 La presente invención también se refiere a un cultivo de traustóquiritos que comprende: (a) cualquiera de las células de traustóquiritos descritas en este documento y (b) un medio de cultivo celular que comprende xilosa como fuente de carbono.

La presente invención también se refiere a un método de producción de una biomasa de traustóquiritos, que comprende: (a) cultivar cualquiera de las células de traustóquiritos descritas en este documento en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono, y (b) recoger la biomasa del medio de cultivo.

65

La presente invención también se refiere a un método de producción de un aceite microbiano, que comprende: (a) cultivar cualquiera de las células de traustóquitridos descritas en este documento en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono para producir una biomasa, y (b) extraer un aceite de la biomasa.

5 La presente invención también se refiere a un método de producción de un producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica para un animal o ser humano, que comprende: (a) cultivar cualquiera de las células de traustóquitridos descritas en este documento en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono, (b) recoger una biomasa del medio de cultivo y (c) preparar el producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica a partir de la biomasa. En algunas realizaciones, el método comprende además extraer un aceite de la biomasa y preparar el producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica a partir del aceite. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es una fórmula infantil. En algunas realizaciones, la fórmula infantil es adecuada para bebés prematuros.

15 En algunas realizaciones, el producto alimenticio es leche, una bebida, una bebida terapéutica, una bebida nutritiva o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un aditivo para alimentos para animales o seres humanos. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un suplemento nutritivo. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un pienso para animales. En algunas realizaciones, el pienso para animales es un pienso de acuicultura. En algunas realizaciones, el pienso para animales es un pienso para animales domésticos, un pienso para animales de zoológico, un pienso para animales de trabajo, un pienso para ganado o una combinación de los mismos.

25 La presente invención también se refiere a un método para producir un biocombustible, que comprende: (a) cultivar cualquiera de las células de traustóquitridos descritas en este documento en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono para producir una biomasa, (b) extraer un aceite de la biomasa y (c) producir un biocombustible transesterificando el aceite, craqueando el aceite, procesando el aceite por despolimerización térmica, añadiendo el aceite a un proceso de refinado del petróleo o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el biocombustible se produce transesterificando el aceite. En algunas realizaciones, el biocombustible es un biodiésel. En algunas realizaciones, el biocombustible se produce craqueando el aceite. En algunas realizaciones, el biocombustible es un biocombustible de aviones. En algunas realizaciones, el biocombustible se produce procesando el aceite por despolimerización térmica. En algunas realizaciones, el biocombustible es un diésel renovable. En algunas realizaciones, el biocombustible se produce añadiendo el aceite a un proceso de refinado del petróleo. En algunas realizaciones, el biocombustible es un diésel renovable coprocesado.

35 Breve descripción de los dibujos/figuras

La figura 1 muestra un mapa plasmídico de pCL0120 (SEQ ID NO: 12).

La figura 2 muestra una tala de uso de codones para *Schizochytrium*.

40 La figura 3 muestra la secuencia de polinucleótidos de codones optimizados (SEQ ID NO: 2) que codifica la proteína transportadora de xilosa de *Candida intermedia* GXS1, correspondiente al n.º de acceso a GenBank AJ875406.

La figura 4 muestra la secuencia polinucleotídica de codones optimizados (SEQ ID NO: 3) que codifica la proteína transportadora de xilosa de *Arabidopsis thaliana* At5g17010, correspondiente al n.º de acceso a GenBank BT015128.

45 La figura 5 muestra un mapa plasmídico de pCL0130 (SEQ ID NO: 14).

La figura 6 muestra un mapa plasmídico de pCL0131 (SEQ ID NO: 15).

Las figuras 7A y 7B muestran la secuencia polinucleotídica de pCL0121 (SEQ ID NO: 4). El vector confiere resistencia al antibiótico ZEOCIN™ y también alberga un gen que codifica una forma secretada de eGFP.

Las figuras 8A y 8B muestran la secuencia polinucleotídica de pCL0122 (SEQ ID NO: 5). El vector confiere resistencia al antibiótico paromomicina y también alberga un gen que codifica una forma secretada de eGFP.

50 La figura 9 muestra un mapa plasmídico de pCL0121.

La figura 10 muestra un mapa plasmídico de pCL0122.

La figura 11 muestra la secuencia polinucleotídica de codones optimizados (SEQ ID NO: 6) que codifica la proteína xilosa isomerasa de *Piromyces* sp. E2 "XylA", correspondiente al n.º de acceso a GenBank CAB76571.

55 La figura 12 muestra la secuencia polinucleotídica de codones optimizados (SEQ ID NO: 7) que codifica la proteína cinasa de xilulosa de *Piromyces* sp. E2 "XylB", correspondiente al n.º de acceso a GenBank AJ249910.

La figura 13 muestra un mapa plasmídico de pCL0132 (SEQ ID NO: 16).

La figura 14 muestra un mapa plasmídico de pCL0136 (SEQ ID NO: 20).

La figura 15 muestra la secuencia polinucleotídica de codones optimizados (SEQ ID NO: 21) que codifica la proteína xilosa reductasa de *Pichia stipitis* "XylI", correspondiente al n.º de acceso a GenBank X59465.

60 La figura 16 muestra la secuencia polinucleotídica de codones optimizados (SEQ ID NO: 22) que codifica la proteína cinasa de xilulosa de *Pichia stipitis* "Xyk3", correspondiente al n.º de acceso a GenBank AF127802.

La figura 17 muestra un mapa plasmídico de pCL0133 (SEQ ID NO: 17).

La figura 18 muestra un mapa plasmídico de pCL0135 (SEQ ID NO: 19).

La figura 19 muestra un mapa plasmídico de pCL0123 (SEQ ID NO: 13).

65 La figura 20 muestra la secuencia polinucleotídica de codones optimizados (SEQ ID NO: 23) que codifica la proteína xilitol deshidrogenasa de *Pichia stipitis* "Xyl2", correspondiente al n.º de acceso a GenBank X55392.

La figura 21 muestra un mapa plasmídico de pCL0134 (SEQ ID NO: 18)

La figura 22 muestra transferencias de Western de lisados de sedimentos de cultivo de cultivos de clones de *Schizochytrium* resistentes a SMM transformados con pCL0130 (figura 22A) o pCL0131 (figura 22B) y la cepa de tipo silvestre de *Schizochytrium* ATCC 20888 (WT), sondeada con anticuerpos que reconocen la proteína transportadora de xilosa de *Candida intermedia* GXS1 (transformante pCL0130) o la proteína transportadora de xilosa de *Arabidopsis thaliana* At5g17010 (transformante pCL0131).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método de producción de un cultivo celular de traustocuítridos, que comprende: a. transformar una célula de traustocuítridos con moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador heterólogo de xilosa, una isomerasa heteróloga de xilosa y una cinasa heteróloga de xilulosa; o con moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador heterólogo de xilosa, una cinasa heteróloga de xilulosa, una reductasa heteróloga de xilosa y una xilitol deshidrogenasa heteróloga; en el que los genes heterólogos tienen codones optimizados para su expresión en la célula de traustocuítridos, y los genes heterólogos están bajo el control de cualquier secuencia promotora, cualquiera secuencia terminadora y/o cualquier otra secuencia reguladora que sea funciona en una célula de traustocuítridos; y b. cultivar la célula de traustocuítridos transformada en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono y cultivos celulares que comprenden los traustocuítridos recombinantes, así como métodos de producción de cultivos celulares, biomasas, aceites microbianos, composiciones y biocombustibles usando los traustocuítridos recombinantes.

Traustocuítridos

De acuerdo con la presente invención, el término "traustocuítrido" se refiere a cualquier miembro el orden *Thraustochytriales*, que incluye la familia *Thraustochytriaceae*. La ubicación taxonómica actual de los traustocuítridos puede resumirse de la siguiente manera:

Reino: *Stramenopila (Chromista)*

Filo: *Labyrinthulomycota (Heterokonta)*

Clase: *Labyrinthulomycetes (Labyrinthulales)*

Orden: *Labyrinthulales*

Familia: *Labyrinthulaceae*

Orden: *Thraustochytriales*

Familia: *Thraustochytriaceae*

A fines de la presente invención, las cepas descritas como traustocuítridos incluyen los siguientes organismos: Orden: *Thraustochytriales*; Familia: *Thraustochytriaceae*; Géneros: *Thraustochytrium* (Especies: sp., *arudimentale*, *aureum*, *benthicola*, *globosum*, *kinnei*, *motivum*, *multirudimentale*, *pachydermum*, *proliferum*, *roseum*, *striatum*), *Ulkenia* (Especies: sp., *amoebaidea*, *keruelensis*, *minuta*, *profunda*, *radiata*, *sailens*, *sarkariana*, *schizochytrrops*, *visurgensis*, *yorkensis*), *Schizochytrium* (Especies: sp., *aggregatum*, *limnaceum*, *mangrovei*, *minutum*, *octosporum*), *Japonochytrium* (Especies: sp., *marinum*), *Aplanochytrium* (Especies: sp., *haliotidis*, *keruelensis*, *profunda*, *stocchinoi*), *Althornia* (Especies: sp., *crouchii*) o *Elina* (Especies: sp., *marisalba*, *sinorifca*). A los fines de esta invención, las especies descrita dentro de *Ulkenia* se considerarán miembros del género *Thraustochytrium*. *Aurantiochytrium*, *Oblongichytrium*, *Botryochytrium*, *Parietichytrium* y *Sicyoidochytrium* son géneros adicionales abarcados por la presente invención.

Las cepas de traustocuítridos incluyen, aunque sin limitación las cepas depositadas PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215, PTA-9695, PTA-9696, PTA-9697, PTA-9698, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210, PTA-10211, *Thraustochytrium* sp. (23B) (ATCC 20891); *Thraustochytrium striatum* (Schneider)(ATCC 24473); *Thraustochytrium aureum* (Goldstein) (ATCC 34304); *Thraustochytrium roseum* (Goldstein) (ATCC 28210); y *Japonochytrium* sp. (L1) (ATCC 28207). *Schizochytrium* incluye, aunque sin limitación, *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium* sp. (S31) (ATCC 20888), *Schizochytrium* sp. (S8) (ATCC 20889), *Schizochytrium* sp. (LC-RM) (ATCC 18915), *Schizochytrium* sp. (SR 21), la cepa depositada ATCC 28209 y la cepa depositada *Schizochytrium limacinum* IFO 32693.

En algunas realizaciones, la célula de traustocuítridos de la invención es una célula de *Schizochytrium* o *Thraustochytrium*. En algunas realizaciones, el traustocuítrido es de una especie seleccionada de *Schizochytrium* sp., *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium minutum*, *Thraustochytrium* sp.,

Thraustochytrium striatum, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium roseum*, *Japonochytrium* sp. y cepas derivadas de los mismos.

De acuerdo con la presente invención, el término "transformación" se usa para hacer referencia a cualquier método por el que una molécula de ácido nucleico (es decir, una molécula recombinante de ácido nucleico) puede insertarse en una célula de traustocítridos de la invención. En sistemas microbianos, el término "transformación" se usa para describir un cambio hereditario debido a la adquisición de ácidos nucleicos exógenos por el microorganismo y es esencialmente sinónimo del término "transfección". Las técnicas adecuadas de transformación para introducir moléculas de ácido nucleico en células de traustocítridos incluyen, aunque sin limitación, bombardeo de partículas, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, infección y fusión de protoplastos.

Aunque la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere principalmente a la molécula física de ácido nucleico y las expresiones "secuencia de ácido nucleico" o "secuencia polinucleotídica" se refieren principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, las expresiones se usan de forma intercambiable, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico, secuencia polinucleotídica o una secuencia de ácido nucleico que es capaz de codificar una proteína. En algunas realizaciones, las moléculas aisladas de ácido nucleico descritas en este documento se producen usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o clonación) o síntesis química. De acuerdo con la presente invención, una molécula "aislada" de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que se ha retirado de su medio natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana), siendo su medio natural el genoma o cromosoma en que se encuentra la molécula de ácido nucleico en la naturaleza. Por tanto, "aislada" no refleja necesariamente el grado al que se ha purificado la molécula de ácido nucleico, sino que indica que la molécula no incluye un genoma completo o un cromosoma completo en que la molécula de ácido nucleico se encuentra en la naturaleza. Una molécula aislada de ácido nucleico puede incluir ADN, ARN (por ejemplo, ARNm) o derivados de ADN o ARN (por ejemplo, ADNc). Las moléculas aisladas de ácido nucleico incluyen moléculas de ácido nucleico naturales y homólogos de las mismas, incluyendo, aunque sin limitación, variantes alélicas naturales y moléculas de ácido nucleico modificadas en que se han insertado, eliminado, sustituido y/o invertido, nucleótidos de tal manera que dichas modificaciones proporcionan el efecto deseado sobre la secuencia, la función y/o la actividad biológica del péptido o proteína codificado.

El término "proteína" incluye moléculas polipeptídicas de una sola cadena, así como complejos de múltiples polipéptidos en los que los polipéptidos constituyentes individuales están unidos por medios covalentes o no covalentes. El término "polipéptido" incluye péptidos de dos o más aminoácidos de longitud, típicamente que tienen más de 5, 10 o 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, un polipéptido como se describe en este documento es un polipéptido heterólogo. El término "heterólogo", como se usa en este documento, se refiere a una secuencia, por ejemplo, que no se encuentra de forma natural en la célula de traustocítridos de la invención.

El polipéptido expresado es un polipéptido heterólogo. Se describe una célula de traustocítridos que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador heterólogo de xilosa (por ejemplo, n.º de acceso AJ875406 y/o BT015128), isomerasa heteróloga de xilosa (por ejemplo, n.º de acceso CAB76571), cinasa heteróloga de xilulosa (por ejemplo, n.º de acceso AF127802 y/o AJ249910), reductasa heteróloga de xilosa (por ejemplo, n.º de acceso X59465), xilitol deshidrogenasa heteróloga (por ejemplo, n.º de acceso X55392) o cualquier combinación de las mismas. En algunos ejemplos, la célula de traustocítridos comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador de xilosa (por ejemplo, n.º de acceso AJ875406 y/o BT015128), una isomerasa de xilosa (por ejemplo, n.º de acceso CAB76571) y una cinasa de xilulosa (por ejemplo, n.º de acceso AF127802 y/o AJ249910). En algunos ejemplos, la isomerasa de xilosa es como se describe en el documento WO 03/062430 A1. La secuencia polinucleotídica tiene los codones optimizados para maximizar la eficacia de traducción en la célula de traustocítridos. En algunos ejemplos, una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador de xilosa, una isomerasa de xilosa, una cinasa de xilulosa, una reductasa de xilosa, una xilitol deshidrogenasa o cualquier combinación de las mismas se integra en el genoma de la célula de traustocítridos. En algunos ejemplos, una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador de xilosa, una isomerasa de xilosa, una cinasa de xilulosa, una reductasa de xilosa, una xilitol deshidrogenasa o cualquier combinación de las mismas se integra de forma estable en el genoma de la célula de traustocítridos.

En algunos ejemplos, el sistema de expresión usado para la producción de un transportador de xilosa, una isomerasa de xilosa, una cinasa de xilulosa, una reductasa de xilosa, una xilitol deshidrogenasa o cualquier combinación de las mismas en una célula de traustocítridos comprende elementos reguladores que se obtienen de secuencias de traustocítridos. En algunos ejemplos, el sistema de expresión usado para la producción de un transportador de xilosa, una isomerasa de xilosa, una cinasa de xilulosa, una reductasa de xilosa, una xilitol deshidrogenasa o cualquier combinación de las mismas en una célula de traustocítridos comprende elementos reguladores que se obtienen de secuencias que no son de traustocítridos, incluyendo secuencias derivadas de secuencias algáceas que no son de traustocítridos. En algunos ejemplos, el sistema de expresión comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador de xilosa, una isomerasa de xilosa, una cinasa de xilulosa, una reductasa de xilosa, una xilitol deshidrogenasa o cualquier combinación de las mismas en la que la secuencia polinucleotídica está unida de forma funcional a cualquier secuencia promotora, cualquier secuencia terminadora y/o cualquier otra secuencia reguladora que sea funcional en una célula de traustocítridos. Pueden usarse secuencias

al menos un 98 %, al menos un 99 % o que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de un transportador de xilosa, isomerasa de xilosa, reductasa de xilosa xilitol deshidrogenasa o cinasa de xilulosa. En algunas realizaciones, una secuencia polinucleotídica de cualquiera de los métodos de la invención codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o que es idéntica a: las secuencia de aminoácidos codificada por el n.º de acceso AJ875406, BT015128, AF127802, AJ249910, X59465 o X55392; o la secuencia de aminoácidos del n.º de acceso CAB76571. En algunas realizaciones, una secuencia polinucleotídica de cualquiera de los métodos de la invención codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o que es idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23. En algunas realizaciones, una secuencia polinucleotídica de cualquiera de los métodos de la invención es al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o que es idéntica a: la secuencia polinucleotídica del n.º de acceso AJ875406, BT015128, AF127802, AJ249910, X59465 o X55392; una secuencia polinucleotídica del n.º de acceso AJ875406, BT015128, AF127802, AJ249910, X59465 o X55392 que tiene los codones optimizados para la expresión en *Schizochytrium*; una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos del n.º de acceso CAB76571; una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos del n.º de acceso CAB76571, en la que la secuencia polinucleotídica tiene los codones optimizados para la expresión en *Schizochytrium*; o la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23.

Cultivos de traustóquitridos, biomásas y aceites microbianos

La presente invención también se refiere a un cultivo celular de traustóquitridos que comprende cualquiera de las células de traustóquitridos de la invención como se describe en este documento y un medio de cultivo celular que comprende xilosa como fuente de carbono.

La presente invención también se refiere a un método de producción de un cultivo celular que traustóquitridos, que comprende transformar una célula de traustóquitridos con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende un polipéptido asociado con el metabolismo de xilosa como se describe en este documento, seleccionar la célula de traustóquitridos transformada y cultivar la célula de traustóquitridos transformada en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono, en el que se produce un cultivo celular de traustóquitridos. La presente invención también se refiere a un cultivo celular de traustóquitridos producido por el método. Las fuentes de xilosa incluyen, aunque sin limitación, bagazo de caña de azúcar, rastrojo de maíz, pasto varilla, paja de trigo, madera dura y blanda, u otro material vegetal.

En algunas realizaciones, la xilosa es la fuente de carbono principal en el medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la xilosa es la única fuente de carbono en el medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende melazas, un jarabe, hidrolizado, extracto o jugo de cualquier planta productora de xilosa o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende una materia prima que contiene hemicelulosa, tal como bagazo de caña de azúcar, rastrojo de maíz, pasto varilla, paja de trigo, madera dura y blanda u otro material vegetal.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende un transportador de xilosa, una isomerasa de xilosa, una cinasa de xilulosa, una reductasa de xilosa, una xilitol deshidrogenasa o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la célula de traustóquitridos exporta un transportador heterólogo de xilosa, una isomerasa heteróloga de xilosa, una cinasa heteróloga de xilulosa, una reductasa heteróloga de xilosa, una xilitol deshidrogenasa heteróloga o cualquier combinación de las mismas al medio de cultivo.

Las condiciones de cultivo para células de traustóquitridos incluyen, aunque sin limitación, un medio, biorreactor, temperatura, pH y condiciones de oxígeno eficaces que permiten la producción de proteínas y/o la recombinación. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en que típicamente se cultiva una célula de traustóquitridos. Dicho medio típicamente comprende un medio acuoso que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, así como sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. Las fuentes de nitrógeno incluyen, aunque sin limitación, peptona, extracto de levadura, polipeptona, extracto de malta, extracto de carne, casaminoácidos, licor de macerado de maíz, fuentes de nitrógeno orgánico, glutamato de sodio, urea, fuentes de nitrógeno inorgánico, acetato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y sulfato de sodio.

Las condiciones de cultivo no limitantes adecuadas para traustóquitridos se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.340.742. también se describen diversos parámetros de fermentación para inocular, cultivar y recuperar la microflora, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.130.242. los medios líquidos o sólidos pueden contener agua salada natural o artificial. Las células de traustóquitridos de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microvaloración y placas Petri.

El volumen de fermentación puede ser cualquier volumen usado para el crecimiento de traustoqueítridos, incluyendo volúmenes comerciales e industriales. En algunas realizaciones, el volumen de fermentación (volumen de cultivo) es de al menos 2 l, al menos 10 l, al menos 50 l, al menos 100 l, al menos 200 l, al menos 500 l, al menos 1000 l, al menos 10 000 l, al menos 20 000 l, al menos 50 000 l, al menos 100 000 l, al menos 150 000 l, al menos 200 000 l, al menos 250 000 l, al menos 300 000 l, al menos 350 000 l al menos 400 000 l o al menos 500 000 l. En algunas realizaciones, el volumen de fermentación es de 2 l a 2 000 000 l, de 2 l a 1 000 000 l, de 2 l a 500 000 l, de 2 l a 200 000 l, de 2 l a 100 000 l, de 2 l a 50 000 l, de 2 l a 25 000 l, de 2 l a 20 000 l, de 2 l a 15 000 l, de 2 l a 10 000 l, de 2 l a 5000 l, de 2 l a 1000 l, de 2 l a 500 l o de 2 l a 100 l.

La presente invención también se refiere a un método de producción de una biomasa de traustoqueítridos, que comprende cultivar una célula de traustoqueítridos de la invención en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono, y recoger una biomasa del medio de cultivo. Una biomasa de traustoqueítridos es una biomasa celular recogida obtenida por cualquier método convencional para el aislamiento de una biomasa de traustoqueítridos, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.130.242 y la publicación de Estados Unidos n.º 2002/0001833. La biomasa recogida puede contener células de traustoqueítridos, así como fragmentos celulares de traustoqueítridos.

La presente invención también se refiere a un método de producción de un aceite microbiano que comprende cultivar una célula de traustoqueítridos de la invención en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono para producir una biomasa, y extraer un aceite de la biomasa. El aceite puede extraerse de una biomasa recién recogida o puede extraerse de una biomasa recogida previamente que se ha almacenado en condiciones que evitan el deterioro. Pueden usarse métodos conocidos para cultivar un traustoqueítridos de la invención, para aislar una biomasa del cultivo, para extraer aceite microbiano de la biomasa y para analizar el perfil de ácidos grasos de los aceites extraídos de la biomasa. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.130.242.

Un aceite microbiano puede ser cualquier aceite derivado de cualquier traustoqueítridos, incluyendo, por ejemplo: un aceite crudo extraído de la biomasa de un traustoqueítrido sin procesamiento adicional; un aceite refinado que se obtiene tratando un aceite crudo con procesamiento adicional tal como refinado, blanqueado y/o desodorizado; un aceite diluido obtenido diluyendo un aceite crudo o refinado; o un aceite enriquecido que se obtiene, por ejemplo, tratando un aceite crudo o refinado con métodos adicionales de purificación para aumentar la concentración de un ácido grado en el aceite.

En algunas realizaciones, el aceite crudo puede aislarse de un traustoqueítrido usando técnicas convencionales, sin someterse a refinamiento o purificación adicional. Por ejemplo, el aceite crudo puede aislarse usando extracción con disolvente, tal como, aunque sin limitación, extracción con hexano o extracción con isopropanol. En algunas realizaciones, el aceite crudo puede aislarse usando métodos de extracción físicos y/o mecánicos tales como, aunque sin limitación, extracción a través del uso de un homogeneizador o por prensado.

En algunas realizaciones, el aceite crudo puede someterse a procesamiento adicional, tal como refinado, desolventización, desodorizado, hibernación, filtración en frío y/o blanqueado. Dichos aceites "procesados" incluyen aceites microbianos que se han sometido a extracción con disolvente y uno o más procesamientos adicionales. En algunas realizaciones, los aceites están mínimamente procesados. Aceites "mínimamente procesados" incluyen aceites microbianos que se han sometido a extracción con disolvente y filtración. En ciertas relaciones, los aceites mínimamente procesados se someten además a hibernación.

En algunas realizaciones, se usa un método similar al proceso FRIOLEX® (Westfalia Separator Industry GmbH, Alemania) para extraer los aceites microbianos producidos por los traustoqueítridos. El proceso FRIOLEX® es un proceso de extracción física de aceite basado en agua, por el que la materia prima que contiene aceite puede usarse directamente para extraer aceite sin usar ningún método convencional de extracción con disolvente. En este proceso, puede usarse un disolvente orgánico soluble en agua como auxiliar del proceso y el aceite se separa del caldo de materia prima por separación de densidad usando la gravedad o fuerzas centrifugas. El documento WO 96/05278 divulga dicha extracción.

Después de haber extraído el aceite, el aceite puede recuperarse o separarse de los componentes no lipídicos por cualquier medio adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, se usan técnicas físicas y/o mecánicas de bajo coste para separar las composiciones que contienen lípidos de las composiciones no lipídicas. Por ejemplo, si se crean múltiples fases o fracciones por el método de extracción usado para extraer el aceite, donde una o más fases o fracciones contienen lípidos, un método para recuperar las fases o fracciones que contienen lípidos puede implicar la eliminación física de las fases o fracciones que contienen lípidos de las fases o fracciones no lipídicas, o viceversa. En algunas realizaciones, se usa un método de tipo FRIOLEX® para extraer los lípidos producidos por los microorganismos, y la fase ligera rica en lípidos después se separa físicamente de la fase pesada rica en proteínas (tal como por desnatado de la fase rica en lípidos que está en la parte superior de la fase pesada rica en proteínas después de la separación por densidad).

Los aceites microbianos producidos por traustoqueítridos de la presente invención pueden recuperarse de la autólisis o lisis inducida exponiendo las células de traustoqueítridos a una condición que incluye, aunque sin limitación, un

cierto pH, una cierta temperatura, la presencia de una enzima, la presencia de un detergente, alteraciones físicas o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la lisis o autólisis de las células de traustóquitridos se realiza por el uso de fuerzas mecánicas. En realizaciones adicionales de la presente invención, la lisis o autólisis de las células de traustóquitridos va seguida por separación mecánica de los lípidos de las composiciones no lipídicas.

Las enzimas adecuadas que pueden usarse para inducir la lisis de las células de traustóquitridos incluyen, aunque sin limitación, enzimas disponibles en el mercado o mezclas enzimáticas tales como proteinasa K o ALCALASE®. En algunas realizaciones, los traustóquitridos productores de aceite experimentan lisis inducida en presencia de un detergente, tal como detergentes iónicos (catiónicos o aniónicos), detergentes no iónicos, detergentes zwitteriónicos o combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales de la presente invención, los métodos de alteración física tales como molienda mecánica como homogeneización líquida, uso de ondas de sonido de alta frecuencia en sonicación, métodos de ciclos de congelación/descongelación, prensado, extrusión o molienda pueden usarse para inducir la lisis de los traustóquitridos productores de aceite. La extracción de los aceites puede tener lugar en los fermentadores al final de la fermentación por lisis en tanque de las células de traustóquitridos.

En algunas realizaciones, los cultivos celulares, biomasa y aceites microbianos producidos a partir de las células de traustóquitridos de la invención cultivados en xilosa tienen las mismas características o características sustancialmente similares (por ejemplo, densidades celulares, pesos celulares en seco, productividades de ácido graso y perfiles de ácidos grasos) asociadas con cultivos, biomasa y aceites microbianos producidos a partir de las células de traustóquitridos no transformadas correspondientes cultivadas en glucosa y/o fructosa. En algunas realizaciones, el peso celular en seco de una biomasa producida a partir de un cultivo de traustóquitridos de la invención es mayor después de su crecimiento en xilosa que el peso celular en seco obtenido en condiciones idénticas del crecimiento de un cultivo de las células de traustóquitridos no transformadas correspondientes en glucosa y/o fructosa. En algunas realizaciones, la cantidad total de ácidos grasos como porcentaje del peso celular en seco de la biomasa es mayor después del crecimiento de un traustóquitrido de la invención en xilosa que la cantidad obtenida en condiciones idénticas del cultivo de una célula de traustóquitridos no transformada correspondiente en glucosa y/o fructosa.

Métodos de producción de composiciones

La presente invención también se refiere a un método de preparación de un producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica para animales o seres humanos, que comprende cultivar una célula de traustóquitridos de la invención en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono para producir una biomasa, recoger la biomasa y preparar el producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica para animales o seres humanos a partir de la biomasa.

Las biomasa de traustóquitridos pueden secarse antes de su uso en una composición por métodos que incluyen, aunque sin limitación, secado por congelación, secado al aire, secado por pulverización, secado en embudo, secado al vacío (liofilización) o un proceso similar. Como alternativa, una biomasa recogida y lavada puede usarse directamente en una composición sin secado. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.130.242 y 6.812.009.

En algunas realizaciones, el método de preparación de un producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica para animales o seres humanos comprende además extraer el aceite de la biomasa. Los aceites microbianos pueden usarse como material de partida para producir de forma eficaz un producto enriquecido en un ácido graso tal como DHA o EPA. Por ejemplo, los aceites microbianos pueden someterse a diversas técnicas de purificación conocidas en la técnica, tales como destilación o aducción de urea, para producir un producto de potencia mayor con mayores concentraciones de DHA, EPA u otro ácido graso. Los aceites microbianos también pueden usarse en reacciones químicas para producir compuestos derivados de ácidos grasos en los aceites, tales como ésteres y sales de DHA EPA u otro ácido graso.

Cualquier traustóquitrido que se haya transformado como se describe en este documento para crecer en xilosa puede seleccionarse para preparar cualquiera de las composiciones descritas basándose en un atributo deseable del traustóquitrido, tal como, aunque sin limitación, la densidad celular de un cultivo celular del traustóquitrido, los porcentajes y tipos de ácidos grasos asociados con la células seca de una biomasa del traustóquitrido, el perfil de ácidos grasos asociado con la biomasa y/o el aceite microbiano del traustóquitrido, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la biomasa o aceite microbiano de traustóquitridos comprende un mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados que ácidos grasos monoinsaturados. En algunas realizaciones, la biomasa o aceite microbiano de traustóquitridos comprende un porcentaje mayor de ácidos grasos omega-3 que ácidos grasos omega-6. En algunas realizaciones, la biomasa o aceite microbiano de traustóquitridos comprende un porcentaje mayor de DHA que otros ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, la biomasa de traustóquitridos comprende un porcentaje mayor de DHA que otros ácidos grasos poliinsaturados. En algunas realizaciones, la biomasa o aceite microbiano de traustóquitridos comprende un mayor porcentaje de EPA que otros ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, la biomasa o aceite microbiano de traustóquitridos comprende un porcentaje mayor de EPA que otros ácidos grasos poliinsaturados.

Una composición puede incluir uno o más excipientes. Como se usa en este documento, "excipiente" se refiere a un componente, o mezcla de componentes, que se usa en una composición para dar características deseables a la composición, incluyendo alimentos, así como composiciones farmacéuticas, cosméticas e industriales. Un excipiente puede describirse como un excipiente "farmacéuticamente aceptable" cuando se añade a una composición farmacéutica, lo que significa que el excipiente es un compuesto, material, composición, sal y/o forma de dosificación que es adecuada, dentro del alcance del criterio médico apropiado, para su contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesiva u otras complicaciones problemáticas sobre la duración deseada del contacto acorde con una relación de beneficio/riesgo razonable. En algunas realizaciones, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del Gobierno Federal o Estatal o enumerado en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea internacional reconocida en líneas generales para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. Pueden usarse diversos excipientes. En algunas realizaciones, el excipiente puede ser, aunque sin limitación, un agente alcalino, un estabilizante, un antioxidante, un agente de adhesión, un agente de separación, un agente de recubrimiento, un componente de fase exterior, un componente de liberación controlada, un disolvente, un tensioactivo, un humectante, un agente tamponante, un relleno, un emoliente o combinaciones de los mismos. Los excipientes, además de los analizados en este documento, pueden incluir excipientes enumerados en, aunque sin limitación, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.^a ed. (2005).

En algunas realizaciones, la composición es un producto alimenticio. Un producto alimenticio es cualquier alimento para consumo por animales o seres humanos, e incluye composiciones tanto sólidas como líquidas. Un producto alimenticio puede ser un aditivo para alimentos para animales o seres humanos. Los alimentos incluyen, aunque sin limitación, alimentos comunes; productos líquidos, incluyendo leches, bebidas, bebidas terapéuticas y bebidas nutritivas; alimentos funcionales; suplementos; nutraceúticos; fórmulas infantiles, incluyendo fórmulas para bebés prematuros; alimentos para mujeres embarazadas o mujeres en periodo de lactancia; alimentos para adultos; alimentos geriátricos; y alimentos para animales.

En algunas realizaciones, una biomasa o aceite microbiano de traustoquítridos puede usarse directamente como o incluirse como un aditivo dentro de uno o más de: un aceite, materia grasa, producto para untar, otro ingrediente graso, bebida, salsa, alimento de base láctea o de soja (tal como leche, yogur, queso y helado), un alimento horneado, un producto nutritivo, por ejemplo, como un suplemento nutritivo (en forma de cápsula o comprimido), un suplemento vitamínico, un suplemento dietético, una bebida energética, un producto alimenticio en polvo acabo o semiacabado y combinaciones de los mismos.

Una lista parcial de composiciones alimenticias que pueden incluir un aceite microbiano incluye, aunque sin limitación, productos de base de soja (leches, helados, yogures, bebidas, cremas, productos para untar, blanqueadores); sopas y mezclas de sopa; pastas, masas y artículos alimenticios horneados incluyendo, por ejemplo, productos de pastelería fina, cereales de desayuno, tortas, pasteles de queso, empanadas, magdalenas, galletas, barritas, panes, rosquillas, bizcochos, muffins, pasteles, bollos, picatostes, tentempié, golosinas, pasteles de merienda, empanadas, barras de granola/aperitivo y pastas tostadas; dulces; confitería dura; chocolate y otro tipo de confitería; chicles; productos alimenticios líquidos, por ejemplo, leches, bebidas energéticas, fórmulas infantiles, bebidas carbonatadas, té, comidas líquidas, zumos de frutas, bebidas basadas en frutas, bebidas basadas en hortalizas; jarabes multivitamínicos, sustitutos de comidas, alimentos medicinales y jarabes; mezclas de bebidas energéticas; pasta; producto de pescado procesados; productos de carne procesados; productos de aves de corral procesados; jugos y salsas; condimentos (salsa de tomate, mahonesa, etc.); productos para untar a base de aceite vegetal; productos lácteos; yogur; mantequillas; productos lácteos congelados; helados; postres congelados; yogures congelados; productos alimenticios semisólidos tales como alimentos para bebés; pudines y postres de gelatina; queso procesado y no procesado; mezclas de panqueques; barras alimenticias incluyendo barritas energéticas; mezclas de gofres; aderezos de ensalada; mezclas sustitutivas de huevo; frutos secos y aderezos basados en frutos secos; aperitivos salados tales como patatas fritas y otros fritos y crujientes, fritura de maíz, tortitas fritas, aperitivos extruidos, palomitas de maíz, galletas saladas, patatas fritas y frutos secos; especialmente aperitivos tales como salsas, aperitivos de frutos secos, aperitivos de carne, cortezas de cerdo, barritas alimenticias saludables y tortas de arroz/maíz.

En algunas realizaciones, un aceite microbiano puede usarse para complementar una fórmula infantil. La fórmula infantil puede complementarse con un aceite microbiano en solitario o en combinación con un aceite físicamente refinado derivado de un microorganismo que produce ácido araquidónico (ARA). Un microorganismo que produce ARA, por ejemplo, es *Mortierella alpina* o *Mortierella* sect. *Schmuckeri*. Como alternativa, las fórmulas infantiles pueden complementarse con un aceite microbiano en combinación con un aceite rico en ARA, incluyendo ARASCO® (Martek Biosciences, Columbia, MD).

En algunas realizaciones, la composición es un pienso para animales. Un "animal" significa cualquier organismo no humano que pertenece al reino Animalia e incluye, sin limitación, animales acuáticos y animales terrestres. La expresión "pienso para animales" o "alimento para animales" se refiere a cualquier alimento destinado a animales no humanos, sea para peces; peces comerciales; peces ornamentales; larvas de peces; bivalvos; moluscos; crustáceos; mariscos; camarón; larva de camarón; artemia, rotíferos, camarones en salazón; filtradores; anfibios; reptiles; mamíferos; animales domésticos; animales de granja; animales de zoológico; animales para deportes; de

- 5 reproducción; animales de carreras; animales de exhibición; animales de crianza; animales raros o en peligro; animales de compañía; mascotas tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones o caballos; primates tales como monos (por ejemplo, cebus, macaco, verde africano, patas, cynomolgus y cercopithecus), simios, orangutanes, babuinos, gibones y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos, félidos tales como gatos, leones y tigres; équidos tales como caballos, burros y cebras; animales para alimentación tales como vacas, ganado bovino, cerdos y ovejas; ungulados tales como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; y así sucesivamente. Un pienso para animales incluye, aunque sin limitación, un pienso de acuicultura, un pienso para animales domésticos incluyendo pienso para mascotas, un pienso para animales de zoológico, un pienso para animales de trabajo, un pienso para ganado o una combinación de los mismos.
- 10 En algunas realizaciones, la composición es un pienso o suplemento para piensos para cualquier animal cuya carne o productos se consumen por los seres humanos, tal como cualquier animal del que se obtiene carne, huevos o leche para consumo humano. Cuando se alimenta a dichos animales, pueden incorporarse nutrientes tales como LC-PUFA en la carne, la leche, los huevos u otros productos de dichos animales para aumentar su contenido de estos nutrientes.
- 15 En algunas realizaciones, la composición es un material secado por pulverización que puede desmenuzarse para formar partículas de un tamaño apropiado para su consumo por zooplancton, artemias, rotíferos y filtradores. En algunas realizaciones, el zooplancton, las artemias o los rotíferos alimentados por la composición se suministran a su vez a larvas de peces, peces, marisco, bivalvos o crustáceos.
- 20 En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas adecuadas incluyen, aunque sin limitación, una composición antiinflamatoria, un fármaco para el tratamiento de cardiopatía coronaria, un fármaco para el tratamiento de arteriosclerosis, un agente quimioterapéutico, un excipiente activo, un fármaco para la osteoporosis, un antidepresivo, un anticonvulsivo, un fármaco contra *Helicobacter pylori*, un fármaco para el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa, un fármaco para el tratamiento de enfermedad hepática degenerativa, un antibiótico, una composición que reduce el nivel de colesterol y una composición que reduce el nivel de triglicéridos. En algunas realizaciones, la composición es un alimento médico. Un alimento médico incluye un alimento que está en una composición a consumirse o administrarse de forma externa bajo la supervisión de un médico y que está destinada para el tratamiento dietético específico de una afección, para la que se establecen necesidades nutritivas distintivas, basándose en los principios científicos reconocidos, por evaluación médica.
- 25 En algunas realizaciones, el aceite microbiano puede formularse en una forma de dosificación. Las formas de dosificación pueden incluir, aunque sin limitación, comprimidos, cápsulas, sobres, píldoras, pastillas, polvos y gránulos, y formas parenterales de dosificación, que incluyen, aunque sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones y polvos secos que comprenden una cantidad eficaz del aceite microbiano. También es sabido en la técnica que dichas formulaciones también pueden contener diluyentes, rellenos, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, tensioactivos, vehículos hidrófobos, vehículos hidrosolubles, emulsionantes, tampones, humectantes, hidratantes, solubilizantes, conservantes y similares farmacéuticamente aceptables. Las formas de administración pueden incluir, aunque sin limitación, comprimidos, grageas, cápsulas, comprimidos encapsulados y píldoras, que contienen el aceite microbiano y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados.
- 35 Para administración oral, el aceite microbiano puede combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos posibilitan que los aceites microbianos se formen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, compuestos líquidos, suspensiones y similares, para ingesta oral por un sujeto a tratar. En algunas realizaciones, la forma de dosificación es un comprimido, píldora o comprimido encapsulado. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse añadiendo un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea para obtener comprimidos o núcleos de gragea. Los excipientes adecuados incluyen, aunque sin limitación, rellenos tales como azúcares incluyendo, aunque sin limitación, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, aunque sin limitación, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes tales como, aunque sin limitación, la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen, aunque sin limitación, cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol.
- 40 En algunas realizaciones, la composición es un cosmético, los cosméticos incluyen, aunque sin limitación, emulsiones, cremas, lociones, máscaras, jabones, champús, limpiadores, cremas faciales, acondicionadores, maquillajes, agentes de baño y líquidos de dispersión. Los agentes cosméticos pueden ser medicinales o no medicinales.
- 45 En algunas realizaciones, la composición es una composición industrial. En algunas realizaciones, la composición es un material de partida para uno o más productos fabricados. Un producto fabricado incluye, aunque sin limitación, un
- 50
- 55
- 60
- 65

polímero; un material fotosensible fotográfico; un detergente; un aceite industrial; o un detergente industrial. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.259.006 describe el uso de una grasa y aceite que contiene DHA para la producción de ácido behénico y la producción de materiales sensibles fotográficos usando ácido behénico.

5 Métodos de producción de biocombustibles

La presente invención también se refiere a un método para producir un biocombustible a partir de un traustokuítrido de la invención.

10 Como se usa en este documento, "biocombustible" se refiere a cualquier combustible que se produce a partir de y usando una biomasa o un aceite microbiano de un traustokuítrido de la invención incluyendo, aunque sin limitación, un biodiésel, un diésel renovable, un diésel renovable coprocesado, un biocombustible de aviones, un aceite de calefacción y un aditivo de combustible. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para generar un
 15 biocombustible a partir de las biomasa y aceites microbianos de los traustokuítridos de la presente invención incluyendo, aunque sin limitación, cualquier método descrito en el documento WO 2005/035693, la publicación de Estados Unidos n.º 2005/0112735, el documento WO 2007/027633, el documento WO 2006/127512, la publicación de Estados Unidos n.º 2007/0099278, la publicación de Estados Unidos n.º 2007/0089356, el documento WO 2008/067605, la publicación de Estados Unidos n.º 2009/0035842 y la publicación de Estados Unidos n.º 2009/0064567. Cualquiera de los biocombustibles descritos en este documento puede mezclarse con un
 20 combustible fósil. Por ejemplo, un biodiésel puede mezclarse con un diésel fósil a relaciones de un 1 %-99 %. En algunas realizaciones, un aceite microbiano de un traustokuítrido de la invención se usa como punto de partida para la producción de un biocombustible, aunque no se haya sometido a procesamiento convencional. Los ejemplos de procesamiento convencional que puede evitarse incluyen refinado (por ejemplo, refinado físico, refinado en sílice o refinado cáustico), desolventización, desodorizado, hibernación, filtración en frío y/o blanqueado. Por tanto, en
 25 ciertas realizaciones, los aceites no se han sometido a refinado, desolventización, desodorizado, hibernación, filtración en frío, blanqueado o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el método de producción de un biocombustible comprende cultivar un traustokuítrido de la invención en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono para producir una biomasa, extraer
 30 un aceite de la biomasa y producir un biocombustible transesterificando el aceite, craqueando el aceite, procesando el aceite por despolimerización térmica, añadiendo el aceite a un proceso de refinado de petróleo tradicional o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el biocombustible se produce transesterificando el aceite. En algunas realizaciones, el
 35 biocombustible es un biodiésel. Se conocen diversas formas de biodiésel e incluyen, aunque sin limitación, biodiéseles descritos en el documento WO 07/061903, la patente de Estados Unidos n.º 7.172.635, la patente EP n.º 1 227 143, el documento WO 02/38709, el documento WO 02/38707 y la publicación de Estados Unidos n.º 2007/0113467. La transesterificación de los triglicéridos en el aceite produce ésteres de ácido graso de cadena larga, es decir, ésteres de alquilo y puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica para la producción
 40 de biocombustibles. En algunas realizaciones, el éter de alquilo es un éster de metilo o un éster de etilo. En algunas realizaciones, la extracción del aceite de la biomasa de traustokuítridos y la transesterificación del aceite pueden realizarse simultáneamente. En algunas realizaciones, la extracción del aceite de la biomasa de traustokuítridos y la transesterificación del aceite se realizan por separado. Véase, por ejemplo, la publicación de Estados Unidos n.º 2009/0064567.

45 En algunas realizaciones, la transesterificación se realiza usando un alcohol de alquilo inferior y un catalizador ácido o básico. Los alcoholes adecuados para su uso en la presente invención incluyen cualquier alcohol de alquilo inferior que contenga de 1 a 6 átomos de carbono (es decir, un alcohol de alquilo C₁₋₆, tal como alcoholes de metilo, etilo, isopropilo, butilo, pentilo, hexilo e isómeros de los mismos). En algunas realizaciones, el alcohol comprende de un
 50 5 % en peso a un 70 % en peso, de un 5 % en peso a un 60 % en peso, de un 5 % en peso a un 50 % en peso, de un 7 % en peso a un 40 % en peso, de un 9 % en peso a un 30 % en peso o de un 10 % en peso a un 25 % en peso de la mezcla de composición oleosa, el alcohol y una base catalítica. En algunas realizaciones la composición oleosa y la base pueden añadirse a etanol puro o metanol puro. La cantidad de alcohol usada puede variar con la solubilidad del aceite en el alcohol. Puede usarse cualquier base conocida en la técnica que sea adecuada para su
 55 uso como reactivo, incluyendo bases de la fórmula RO-M, en la que M es un catión monovalente y RO es un alcóxido de un alcohol de alquilo C₁₋₆. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen, aunque sin limitación, sodio elemental, metóxido de sodio, etóxido de sodio, metóxido de potasio y etóxido de potasio. En algunas realizaciones, la base es etóxido de sodio. En algunas realizaciones, la base se añade a la reacción con la composición oleosa y el alcohol en una cantidad de 0,05 a 2,0 equivalentes molares de triglicéridos en el aceite, de 0,05 a 1,5 equivalentes molares, de 0,1 a 1,4 equivalentes molares, de 0,2 a 1,3 equivalentes molares o de 0,25 a 1,2 equivalentes molares.

60 El aceite que comprende triglicéridos, el alcohol y la base se hacen reaccionar juntos a una temperatura y durante una cantidad de tiempo que permite la producción de un éster a partir de los restos de ácido graso y el alcohol. En algunas realizaciones, la reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza a una temperatura de 20 °C a 140 °C, de 20 °C a 120 °C, de 20 °C a 110 °C, de 20 °C a 100 °C o de 20 °C a 90 °C. En algunas realizaciones, la reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza a una

temperatura de al menos 20 °C, al menos 75 °C, al menos 80 °C, al menos 85 °C, al menos 90 °C, al menos 95 °C, al menos 105 °C o al menos 120 °C. En algunas realizaciones, la reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza a una temperatura de 20 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C, 105 °C o 120 °C. En algunas realizaciones, la reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza durante un tiempo de 2 horas a 36 horas, de 3 horas a 36 horas, de 4 horas a 36 horas, de 5 horas a 36 horas o de 6 horas a 36 horas. En algunas realizaciones, la reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza durante 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32 o 36. En algunas realizaciones, la reacción de la composición oleosa, el alcohol y la base puede realizarse llevando a reflujo los componentes para producir los ésteres de ácido graso, tales como los ésteres de PUFA. En algunas realizaciones, la reacción de la composición oleosa puede realizarse a una temperatura que no provoca el reflujo de los componentes de reacción.

Por ejemplo, la realización de la reacción de la composición oleosa a presiones mayores de la presión atmosférica puede aumentar el punto de ebullición de los disolventes presentes en la mezcla de reacción. En dichas condiciones, la reacción puede producirse a una temperatura en la que los disolventes hervirían a presión atmosférica, pero no provocaría el reflujo de los componentes de reacción. En algunas realizaciones, la reacción se realiza a una presión de 34,47 kPa (5 libras por pulgada cuadrada (psi)) a 137,89 kPa (20 psi), de 48,26 kPa (7 psi) a 103,42 kPa (15 psi); o de 62,05 kPa (9 psi) a 82,73 kPa (12 psi). En algunas realizaciones, la reacción se realiza a una presión de 48,26 kPa (7 psi), 55,15 kPa (8 psi), 62,05 kPa (9 psi), 68,94 kPa (10 psi), 75,84 kPa (11 psi) o 82,73 kPa (12 psi). Las reacciones realizadas a presión pueden realizarse a las temperaturas de reacción enumeradas anteriormente. En algunas realizaciones, las reacciones realizadas a presión pueden realizarse al menos de 20 °C a 140 °C, de 20 °C a 120 °C, 20 °C 110 °C, de 20 °C a 100 °C o de 20 °C a 90 °C. En algunas realizaciones, las reacciones realizadas a presión pueden realizarse a al menos 70 °C, al menos 75 °C, al menos 80 °C, al menos 85 °C o al menos 90 °C. En algunas realizaciones, las reacciones realizadas a presión pueden realizarse a 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C o 90 °C.

Las cantidades reducidas de PUFA en aceite usadas para producir un biocombustible, tal como un biodiésel pueden aumentar la densidad de energía del biocombustible y pueden reducir la cantidad de sitios para oxidación potencial o sulfatación. En algunas realizaciones, la biomasa de traustoquítridos o aceite microbiano, o la fracción de triglicéridos del mismo, comprende un porcentaje mayor de ácidos grasos monoinsaturados que ácidos grasos poliinsaturados. En algunas realizaciones, el aceite microbiano se fracciona para eliminar los ácidos grasos poliinsaturados. En algunas realizaciones, el aceite se hidrogena para convertir los ácidos grasos poliinsaturados en ácidos grasos monoinsaturados. Para asegurar que pueden quemarse porcentajes mayores de biocombustible derivado de aceite microalgáceo, puede usarse cualquier método de hidrogenación parcial o total de aceites, como es rutinario en la fabricación de margarinas. En algunas realizaciones, los traustoquítrido que producen niveles bajos de PUFA se usan para producir los aceites microbianos. En algunas realizaciones, se seleccionan traustoquítridos de la invención que producen mayores cantidades de ácidos grasos monoinsaturados que ácidos grasos poliinsaturados. En algunas realizaciones, menos de un 50 % de los ácidos grasos insaturados en el aceite biológico son PUFA. En algunas realizaciones, los ácidos grasos insaturados en el aceite biológico contienen menos de un 40 %, menos de un 30 %, menos de un 20 %, menos un 10 % o menos de un 5 % de PUFA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende menos de un 50 %, menos de un 40 %, menos de un 30 %, menos de un 20 %, menos de un 10 % o menos de un 5 % en peso de PUFA.

Además de los métodos de transesterificación descritos anteriormente, también pueden usarse otras técnicas de reducción de la viscosidad de los aceites microbianos para producir biocombustibles. Estas técnicas incluyen, aunque sin limitación, el uso de lipasas, catálisis supercrítica con metanol y el uso de sistemas de células completas que implican la sobreexpresión citoplasmática de lipasas en una célula hospedadora seguida por permeabilización del hospedador para permitir la catálisis de transesterificación de triglicéridos dentro del citoplasma. En algunas realizaciones, una célula de traustoquítridos de la invención también comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una lipasa para la catálisis de transesterificación de triglicéridos dentro del citoplasma. Véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.226.771, la publicación de Estados Unidos n.º 2004/0005604, el documento WO 03/089620, el documento WO 05/086900, la publicación de Estados Unidos n.º 2005/0108789, el documento WO 05/032496, el documento WO 05/108533, la patente de Estados Unidos n.º 6.982.155, el documento WO 06/009676, el documento WO 06/133698, el documento WO 06/037334, el documento WO 07/076163, el documento WO 07/056786 y el documento WO 06/124818.

En algunas realizaciones, el biocombustible se produce por craqueo del aceite. En algunas realizaciones, el biocombustible es un biocombustible de aviones. En la técnica se entiende que "craqueo" describe la reducción de la longitud de la cadena de los ácidos grasos en un aceite por métodos tales como los usados en la industria de aceites. En algunas realizaciones, la presencia de una cantidad significativa de ácido graso poliinsaturado en el aceite proporcionará mayor flexibilidad y diversidad para la producción de hidrocarburos, ya que los múltiples sitios de insaturación en un ácido graso poliinsaturado proporcionan múltiples sitios para la escisión para generar hidrocarburos. Por ejemplo, ciertos combustibles de aviones requieren hidrocarburos con dos a ocho carbonos. Los ácidos grasos poliinsaturados pueden escindirse a través de procesos conocidos en la técnica, tales como craqueo para producir hidrocarburos más cortos de diversas longitudes de cadena.

En algunas realizaciones, el biocombustible se produce por despolimerización térmica. En algunas realizaciones, el biocombustible es un diésel renovable. Como se usa en este documento la despolimerización térmica incluye cualquier proceso para la producción de diésel renovable usando agua sobrecalentada.

5 En algunas realizaciones, el biocombustible se produce añadiendo el aceite a un proceso de refinado del petróleo durante la producción del combustible diésel. En algunas realizaciones, el biocombustible es un diésel renovable coprocesado.

10 Habiendo descrito en líneas generales esta invención, puede obtenerse una comprensión adicional por referencia a los ejemplos proporcionados en este documento. Estos ejemplos son con fines ilustrativos únicamente y no pretenden ser limitantes.

Ejemplo 1

15 Construcción de vectores de expresión del transportador de xilosa, la reductasa de xilosa, la cinasa de xilulosa, la xilitol deshidrogenasa y la isomerasa de xilosa

20 El vector pAB0018 (n.º de acceso a la ATCC PTA-9616) se digirió con HindIII, se trató con la nucleasa del frijol mungo, se purificó y después se digirió adicionalmente con KpnI generando cuatro fragmentos de diversos tamaños. Se aisló un fragmento de 2552 pb por técnicas electroforéticas convencionales en un gel de agar y se purificó usando kits comerciales de purificación de ADN. Después se realizó una segunda digestión de pAB0018 con PmeI y KpnI. Se aisló un fragmento de 6732 pb y se purificó de esta digestión y se ligó al fragmento de 2552 pb. El producto de ligamiento entonces se usó para transformar cepas suministradas de forma comercial de células *E. Coli* DH5-α competentes (Invitrogen) usando el protocolo del fabricante. Se propagaron plásmidos de clones resistentes a ampicilina, se purificaron y después se cribaron por digestiones de restricción o PCR para confirmar que el ligamiento generaba las estructuras plasmídicas esperadas. Un plásmido verificado se denominó pCL0120. Véase la figura 1 y la SEQ ID NO: 12.

30 Las secuencias que codifican la proteína transportadora de xilosa de *Candida intermedia* GXS1 (n.º de acceso a GenBank AJ875406) y la proteína transportadora de xilosa de *Arabidopsis thaliana* At5g17010 (n.º de acceso a GenBank BT015128) se enviaron a Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA) para la optimización de codones y la síntesis guiada por la tabla de uso de codones de *Schizochytrium* mostrada en la figura 2. La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de ácido nucleico de codones optimizados de GSX1 (figura 3), mientras que la SEQ ID NO: 3 es la secuencia de ácido nucleico de codones optimizados de At5g17010 (figura 4). La SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3 se clonaron respectivamente en pCL0120 usando los sitios de restricción 5' y 3' BamHI y NdeI para la inserción y ligamiento de acuerdo con técnicas convencionales. Los mapas de los vectores resultantes pCL0130 y pCL0131 se muestran en la figura 5 y en la figura 6 respectivamente. Las secuencias para los vectores pCL0121 y pCL0122 se proporcionan como las SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente.

40 Los vectores pCL0121 y pCL0122 se crearon ligando un fragmento de 5095 pb que se había liberado de pCL0120 por digestión con HindIII y KpnI a casetes sintéticos de marcador de selección diseñados para conferir resistencia a ZEOCIN™ o paromomicina. Estos casetes estaban compuestos de un promotor de alfa tubulina para dirigir la expresión del gen *sh ble* (para ZEOCIN™) o el gen *npt* (para paromomicina). Los transcritos de ambos genes marcadores de selección estaban terminados por un terminador de SV40. La secuencia completa de los vectores pCL0121 (SEQ ID NO: 4) y pCL0122 (SEQ ID NO: 5) se muestra en la figura 7 y 8, respectivamente. Los mapas de los vectores pCL0121 y pCL0122 se muestran en la figura 9 y 10, respectivamente.

50 Las secuencias que codifican la isomerasa de xilosa de *Piromyces* sp. E2 (CAB76571) y la cinasa de xilulosa de *Piromyces* sp. E2 (AJ249910) se enviaron a Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA) para la optimización de codones y la síntesis guiada por la tabla de uso de codones de *Schizochytrium* mostrada en la figura 2. "Xy1A" (SEQ ID NO: 6) es la secuencia de ácido nucleico de codones optimizados de CAB76571 (figura 11), mientras que "Xy1B" (SEQ ID NO: 7) es la secuencia de ácido nucleico de codones optimizados de AJ249910 (figura 12). La SEQ ID NO: 6 se clonó en el vector pCL0121 que produce el vector denominado pCL0132 (figura 13 y SEQ ID NO: 16). La SEQ ID NO: 7 se clonó en el vector pCL0122 produciendo el vector denominado pCL0136 (figura 14 y SEQ ID NO: 20).

55 Las secuencias que codifican la reductasa de xilosa de *Pichia stipitis* (X59465) y la cinasa de xilulosa de *Pichia stipitis* (AF127802) se enviaron a Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA) para la optimización de codones y la síntesis guiada por la tabla de uso de codones de *Schizochytrium* mostrada en la figura 2. "Xyl1" (SEQ ID NO: 21) es la secuencia de ácido nucleico de codones optimizados de X59465 (figura 15), mientras que "Xuk3" (SEQ ID NO: 22) es la secuencia de ácido nucleico de codones optimizados de AF127802 (figuras 16). La SEQ ID NO: 21 se clonó en el vector pCL0121 produciendo el vector denominado pCL0133 (figura 17 y SEQ ID NO: 17). La SEQ ID NO: 22 se clonó en el vector pCL0122, produciendo el vector denominado pCL0135 (figura 18 y SEQ ID NO: 19).

65 El vector pCL0123 se creó ligando un fragmento de 5095 pb que se había liberado de pCL0120 por digestión con HindIII y KpnI a un casete sintético de marcador de selección diseñado para conferir resistencia a ZEOCIN™. El casete estaba compuesto de un promotor de alfa tubulina para dirigir la expresión del gen *sh ble* (para ZEOCIN™). El

transcripto del gen marcador de selección estaba terminado por un terminador de SV40. Se muestra un mapa del vector pCL0123 en la figura 19 y la SEQ ID NO: 13.

5 Las secuencias que codifican la xilitol deshidrogenasa de *Pichia stipitis* (X55392) se enviaron a Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA) para la optimización de codones y la síntesis guiada por la tabla de uso de codones de *Schizochytrium* mostrada en la figura 2. "Xyl2" (SEQ ID NO: 23) es la secuencia de ácido nucleico de codones optimizados de X55392 (figura 20). SEQ ID NO: 23 se clonó en el vector pCL0123 produciendo el vector denominado pCL0134 (figura 21 y SEQ ID NO: 18).

10 Ejemplo 2

Transformación de *Schizochytrium* con vectores de expresión del transportador de xilosa, la isomerasa de xilosa, la reductasa de xilosa, la xilitol deshidrogenasa o la cinasa de xilulosa

15 La cepa de tipo silvestre de *Schizochytrium* ATCC 20888 se transformó individualmente con los vectores pCL0130 (transportador de xilosa de *Candida intermedia*), pCL0131 (transportador de xilosa de *Arabidopsis thaliana*), pCL0132 (isomerasa de xilosa de *Piromyces* sp. E2), pCL0133 (reductasa de xilosa de *Pichia stipitis*), pCL0134 (xilitol deshidrogenasa de *Pichia stipitis*), pCL0135 (cinasa de xilulosa de *Pichia stipitis*) o pCL0136 (cinasa de xilulosa de *Piromyces* sp. E2) usando electroporación con pretratamiento enzimático como se describe a continuación.

25 *Electroporación con pretratamiento enzimático* - Las células se cultivaron en 50 ml de medio M50-20 (véase la publicación de Estados Unidos n.º 2008/0022422) en un agitador a 200 r.p.m. durante 2 días a 30 °C. Las células se diluyeron a 1:100 en medio M2B (véase el siguiente párrafo) y se cultivaron durante una noche (16-24 h), intentando alcanzar la fase semilogarítmica de crecimiento (DO₆₀₀ de 1,5-2,5). Las células se centrifugaron en un tubo cónico de 50 ml durante 5 min a aproximadamente 3000 x g. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en manitol 1 M, pH 5,5, en un volumen adecuado para alcanzar una concentración final de 2 unidades DO₆₀₀. Se separaron en alícuotas 5 ml de las células en un matraz de agitación de 25 ml y se modificó con CaCl₂ 10 mM (solución madre 1,0 M, esterilizada en filtro) y 0,25 mg/ml de proteasa XIV (solución madre de 10 mg/ml, esterilizada en filtro; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los matraces se incubaron en un agitador a 30 °C y aproximadamente 30 100 r.p.m. durante 4 h. Las células se controlaron al microscopio para determinar el grado de formación de protoplastos, con las células individuales deseadas. Las células se centrifugaron durante 5 min a aproximadamente 2500 x g en tubos de fondo redondo (es decir, tubos Falco™ de 14 ml, BD Biosciences, San José, CA). El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron suavemente con 5 ml de glicerol al 10 % enfriado en hielo.

35 Las células se volvieron a centrifugar durante 5 min a aproximadamente 2500 x g en tubos de fondo redondo. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron suavemente con 500 µl de glicerol al 10 % enfriado en hielo, usando puntas de pipeta de orificio ancho. Se separaron en alícuotas 90 µl de células en una electrocubeta prerrefrigerada (cubeta Gene Pulser® - espacio de 0,1 cm o espacio de 0,2 cm Bio-Rad, Hercules, CA). Se añadió de 1 µg a 5 µg de ADN (en menos de o igual a un volumen de 10 µl) a la cubeta, se mezclaron suavemente con una punta de pipeta y se colocaron en hielo durante 5 min. Las células se sometieron a electroporación a 200 ohm (resistencia), 25 µF (capacitancia) y 250 V (para un espacio de 0,1 cm) o 500 V (espacio de 0,2 cm). Se añadieron 40 0,5 ml de medio M50-20 inmediatamente a la cubeta. Las células entonces se transfirieron a 4,5 ml de medio M50-20 en un matraz de agitación de 25 ml y se incubaron durante 2-3 h a 30 °C y aproximadamente 100 r.p.m. en un agitador. Las células se centrifugaron durante 5 min a aproximadamente 2500 x g en tubos de fondo redondo. El sobrenadante se retiró y el sedimento celular se resuspendió en 0,5 ml de medio M50-20. Las células se sembraron en placas en una cantidad apropiada (2 a 5) de placas M2B con selección apropiada y se incubaron a 30 °C.

50 El medio M2B consiste en 10 g/l de glucosa, 0,8 g/l de (NH₄)₂SO₄, 5 g/l de Na₂SO₄, 2 g/l de MgSO₄·7H₂O, 0,5 g/l de KH₂PO₄, 0,5 g/l de KCl, 0,1 g/l de CaCl₂·2H₂O, MES 0,1 M (pH 6,0), metales PB26 al 0.1 % y vitaminas PB26 al 0,1 % (v/v). Las vitaminas PB26 consistían en 50 mg/ml de vitamina B12, 100 µg/ml de tiamina y 100 µg/ml de Ca-pantotenato. Los metales PB26 se ajustaron a pH 4,5 y consistían en 3 g/l de FeSO₄·7H₂O, 1 g/l de MnCl₂·4 H₂O, 800 mg/ml de ZnSO₄·H₂O, 20 mg/ml de CoCl₂·H₂O, 10 mg/ml de Na₂MoO₄·2H₂O, 600 mg/ml de CuSO₄·5H₂O y 800 mg/ml de NiSO₄·6H₂O. Las soluciones madre PB26 se esterilizaron en filtro por separado y se añadieron al 55 caldo después de someter a autoclave. La glucosa, el KH₂PO₄ y el CaCl₂·2H₂O se sometieron a autoclave cada uno por separado del resto de los ingredientes del caldo antes de mezclarlos para evitar la precipitación de sales y el caramelizado de los carbohidratos. Todos los ingredientes del medio se adquirieron de Sigma Chemical (St. Louis, MO).

60 Los transformantes se seleccionaron para su cultivo en medio sólido que contenía el antibiótico apropiado. Se volvieron a sembrar entre 20 y 100 transformantes primarios de cada vector en medio sólido de "xilosa-SSFM" que es igual que SSFM (describo a continuación) excepto que contiene xilosa en lugar de glucosa como única fuente de carbono, y no se añadió ningún antibiótico. No se observó crecimiento para ningún clon resultante de la transformación con ningún vector individual en estas condiciones.

65

Medio SSFM: 50 g/L de glucosa, 13,6 g/l de Na₂SO₄, 0,7 g/l de K₂SO₄, 0,36 g/l de KCl, 2,3 g/l de MgSO₄·7H₂O, MES 0,1 M (pH 6,0), 1,2 g/l de (NH₄)₂SO₄, 0,13 g/l de glutamato de monosodio, 0,056 g/l de KH₂PO₄ y 0,2 g/l de CaCl₂·2H₂O. Las vitaminas se añadieron a 1 ml/l de una solución madre que consiste en 0,16 g/l de vitamina B12, 9,7 g/l de tiamina y 3,3 g/l de Ca-pantotenato. Los oligoelementos metálicos se añadieron a 2 ml/l de una solución madre que consiste en 1 g/l de ácido cítrico, 5,2 g/l de FeSO₄·7H₂O, 1,5 g/l de MnCl₂·4H₂O, 1,5 g/l de ZnSO₄·7H₂O, 0,02 g/l de CoCl₂·6H₂O, 0,02 g/l de Na₂MoO₄·2H₂O, 1,0 g/l de CuSO₄·5H₂O y 1,0 g/l de NiSO₄·6H₂O, ajustada a pH 2,5.

Se extrajo el ADNg de los transformantes primarios de pCL0130 y pCL0131 y se purificó y se usó como molde para PCR para comprobar la presencia del transgén.

Protocolo de extracción de ADN genómico de Schizochytrium - Los transformantes de *Schizochytrium* se cultivaron en 50 ml de medio. Se pipetearon de forma aséptica 25 ml de cultivo en un vial cónico de 50 ml y se centrifugaron durante 4 minutos a 3000 x g para formar un sedimento. El sobrenadante se retiró y el sedimento se almacenó a -80 °C hasta su uso. El sedimento se resuspendió en aproximadamente 4-5 volúmenes de una solución que consistía en Tris 20 mM pH 8, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, SDS al 0,5 % y 100 ug/ml de proteinasa K en un vial cónico de 50 ml. El sedimento se incubó a 50 °C con balanceo suave durante 1 hora. Una vez lisado, se añadieron 100 ug/ml de RNasa A y la solución se balanceó durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, se añadieron 2 volúmenes de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y la solución se balanceó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se centrifugó a 8000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. De nuevo, se añadieron 2 volúmenes de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y la solución se balanceó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se centrifugó a 8000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Se añadió un volumen igual de cloroformo al sobrenadante resultante y la solución se balanceó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución se centrifugó a 8000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Se añadió un volumen igual de cloroformo al sobrenadante resultante y la solución se balanceó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución se centrifugó a 8000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Se añadieron 0,3 volúmenes de NaOAc 3 M y 2 volúmenes de EtOH al 100 % al sobrenadante, que se balanceó suavemente durante unos pocos minutos. El ADN se enrolló con una varilla de vidrio estéril y se sumergió el ADN en EtOH al 70 % durante 1-2 minutos. El ADN se transfirió a un tubo de microfuga de 1,7 ml y se dejó secar al aire durante 10 minutos. Se añadieron hasta 0,5 ml de tampón de elución precalentado (tampón Tris, 10 mM, pH 8,0) al ADN y se colocó a 4 °C durante una noche.

Como alternativa, después de la incubación con RNasa, el ADN se purificó adicionalmente usando una columna Qiagen Genomic tip 500/G (Qiagen, Inc EE. UU., Valencia, CA), siguiendo el protocolo del fabricante

PCR - Los cebadores usados para detectar el transgén GX1 fueron 5'CL0130 (CCTCGGGCGGCGTCTCTT) (SEQ ID NO: 8) y 3'CL0130 (GGCGGCCTTCTCCTGGTTGC) (SEQ ID NO: 9). Los cebadores usados para detectar el transgén At5g17010 fueron 5'CL0131 (CTACTCCGTTGTTGCCGCCATCCT) (SEQ ID NO: 10) y 3'CL0131 (CCGCCGACCATACCGAGAACGA) (SEQ ID NO: 11). De los 10 clones resultantes de la transformación con pCL0130, se encontró que 4 albergaban el transgén GSX1; y de los 10 clones resultantes de la transformación con pCL0131, se encontró que 7 albergaban el transgén At5g17010. Se seleccionó un clon de cada uno de estos transformantes pCL0130 y pCL0131 positivos para la transformación con un segundo vector seleccionado de pCL0132, pCL0133, pCL0134, pCL0135 o pCL0136 para producir las siguientes combinaciones: pCL0130+pCL0132, pCL0130+pCL0133, pCL0130+pCL0134, pCL0130+pCL0135, pCL0130+pCL0136, pCL0131+pCL0132, pCL0131+pCL0133, pCL0131+pCL0134, pCL0131+pCL0135 y pCL0131+pCL0136. Después de la transformación con el segundo vector, cada cultivo se sembró en SSFM con antibióticos o en xilosa-SSFM directamente. De las muchas colonias que aparecieron después de 4-12 días de cultivo en placas de SSFM con antibióticos, se volvieron a sembrar 5 clones de cada transformación en xilosa-SSFM. No se observó crecimiento de ninguno de los clones resultantes de la cotransformación de pCL0130 o pCL0131 con ningún otro de los vectores en placas de medio sólido de xilosa-SSFM.

Ejemplo 3

Expresión de transportadores de xilosa en *Schizochytrium*

Se recogieron los sobrenadantes de cultivos en matraz de agitación de 50 ml cultivados en sPFM durante 3 días después de haber centrifugado los cultivos a 5000 x g. El medio sPFM se describe en la tabla 1, a continuación. Los sedimentos celulares se lisaron para las extracciones de proteínas como se describe previamente. Véase la publicación de Estados Unidos n.º 2010/0233760. Se realizó la SDS-PAGE de los lisados del sedimento de cultivo y los geles se tiñeron directamente con colorante de Coomassie o se usaron para la electrotransferencia a membranas de PVDF. Después de la transferencia, las membranas de PVDF se usaron para transferencia de Western de acuerdo con procedimientos comunes. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* Briefly, en resumen, las membranas se sondearon con una dilución 1:500 de antisuero primario derivado de conejos, que se habían inmunizado por inyección (Open Biosystems Products, Huntsville, AL) con una preparación del péptido transportador de xilosa conjugado con hemocianina de lapa californiana (KLH). Los péptidos sintéticos específicos conjugados con KLH eran RLRKLPIDHPDSLEELRD (SEQ ID NO: 24) - "130-pl" o ETKGLTLEEIEAKCL (SEQ ID NO: 25) - "131-p2 (Open

Biosystems Products, Huntsville, AL) para generar antisueros específicos para la SEQ ID NO:2 (GSX1 de *C. albicans*) o la SEQ ID NO:3 (At5g17010 de *A. thaliana*), respectivamente. Los antisueros entonces fueron seguidos por la adición de un anticuerpo monoclonal de ratón secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Promega Corporation, Madison, WI). Después se aplicó el reactivo BCIP/NBT a la membrana para revelar la señal. La transferencia de Western de los lisados del sedimento de cultivo de un clon transformado con pCL0130 y la cepa ATCC 20888 de *Schizochytrium* de tipo silvestre se muestra en la figura 22A. La transferencia de Western de los lisados del sedimento de cultivo de un clon transformado con pCL0131 y la cepa ATCC 20888 de *Schizochytrium* de tipo silvestre se muestra en la figura 22B. En cada ejemplo, de todas las bandas en los lisados de tipo silvestre o transformantes, se encontró que solamente una era única para un transformante dado y en cada caso esta banda única correspondía al tamaño predicho del transportador de xilosa expresado.

Tabla 1: Medio sPFM

Componente	Cantidad por litro
Na ₂ SO ₄	13,62 g
K ₂ SO ₄	0,72 g
KCl	0,56 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,27 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O*	0,19 g
MSG	3 g
MES (100 mM) pH 6	21,4 g
KH ₂ O ₄ *	0,4 g
Glucosa*	50 g
Vitamina B12*	0,16 mg
Tiamina*	9,75 mg
CaPantotenato*	3,33 mg
Ácido cítrico*	2 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O*	10,3 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O*	3,1 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O*	1,93 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O*	0,04 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O*	0,04 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O*	2,07 mg
NiSO ₄ ·6H ₂ O*	2,07 mg
pH hasta 2,5 con HCl	

* Añadido después de someter a autoclave.

Ejemplo 4

Cultivo en xilosa de *Schizochytrium* transformado con vectores de expresión del transportador de xilosa, la isomerasa de xilosa y la cinasa de xilulosa

Las cotransformaciones de la cepa ATCC 20888 de tipo silvestre de *Schizochytrium* se realizaron con dos mezclas diferentes de vectores. Las mezclas contenían el transportador de xilosa de *Candida intermedia* (pCL0130) o el transportador de xilosa de *Arabidopsis thaliana* (pCL0131) con dos vectores adicionales: un vector que contenía la isomerasa de xilosa de *Piromyces* sp. E2 (pCL0132) y un vector que contenía la cinasa de xilosa de *Piromyces* sp. E2 (pCL0136). Una combinación de vectores, llamada la Serie *Piromyces* 130, incluía pCL0130, pCL0132 y pCL0136. Otra combinación de vectores, llamada la Serie *Piromyces* 131, incluía pCL0131, pCL0132 y pCL0136. Los transformantes se sembraron en placa directamente en medio sólido de xilosa SSFM y después de 3-5 semanas, se recogieron colonias y se propagaron adicionalmente en xilosa-SSFM líquido. Dos colonias se recuperaron de las transformaciones con la Serie *Piromyces* 130 y cuatro colonias de las transformaciones de la Serie *Piromyces* 131. Varias rondas de transferencias en serie en medio líquido que contenía xilosa mejoraron las tasas de crecimiento de los transformantes. Los transformantes de la Serie *Piromyces* 130 y la Serie *Piromyces* 131 también se volvieron a sembrar en medio sólido SSFM que contenía sulfometum metilo (SMM), ZEOCIN™, o paromomicina. Todos los transformantes sembrados en estos medios eran resistentes a cada antibiótico ensayado, lo que indica que los transformantes albergaban los tres vectores respectivos. Las células de *Schizochytrium* transformadas con un transportador de xilosa, una isomerasa de xilosa y una cinasa de xilulosa eran capaces de crecer en medio sólido y líquido SSFM que contenía xilosa como única fuente de carbono.

Un clon de la Serie *Piromyces* 130 y un clon de la Serie *Piromyces* 131 se pasaron en serie en medio líquido que contenía xilosa. Los valores del peso celular en seco (DCW), la grasa como el porcentaje ponderal de DCW (% de grasa) y los gramos de grasa por litro de cultivo celular (g/l de grasa) para cada cultivo se midieron en los números de pase en serie 5, 11 y 19. Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Peso celular en seco, % de grasa y g/l de grasa para un transformante de la Serie Piromyces 130 y uno de la Serie Piromyces 131 cultivados en medio que contiene xilosa

	Serie Piromyces 130	Serie Piromyces 131
Peso celular en seco (DCW) (mg)		
Pase 5	0,12	0,13
Pase 11	0,36	0,26
Pase 19	0,33	0,33
% de grasa		
Pase 5	nd	nd
Pase 11	38,03	39,53
Pase 19	43,30	50,50
g/l de grasa		
Pase 5	nd	nd
Pase 12	2,74	2,06
Pase 19	2,85	3,38
nd = no determinado		

5 Los mismos clones se cultivaron adicionalmente en cultivo líquido para el análisis FAME. Las colonias recogidas de placas de medio sólido selectivas para el crecimiento en xilosa como fuente de carbono se propagaron en medio líquido que contenía xilosa como fuente principal de carbono sobre las 19 transferencias en serie. El inóculo usado para iniciar el 19.º pase en serie también se usó para comenzar un cultivo de control comparativo para cada clon en medio líquido que contenía glucosa como fuente principal de carbono. También se cultivó *Schizochytrium* de tipo silvestre (WT) en paralelo en medio líquido que contenía glucosa. No se detectó crecimiento de la cepa de *Schizochytrium* de tipo silvestre en medio líquido que contenía xilosa y, por tanto, no fue posible el análisis FAME y otra caracterización del crecimiento.

15 Se extrajeron los aceites de los cultivos celulares usando procedimientos convencionales y se analizaron para la composición de ácidos grasos como el porcentaje de ésteres de metilo de ácido graso totales (FAME). Véase, por ejemplo, la publicación de Estados Unidos n.º 2010/0239533.

20 El peso celular en seco (DCW), la grasa como un % ponderal de DCW (% de grasa), los gramos de grasa por litro de cultivo celular (g/l de grasa), los miligramos de DHA por gramo de grasa total, los valores porcentuales de cada grasa detectada y las sumas de los valores porcentuales de las clases de grasas (saturados, monoinsaturados y grasas de más de 18 carbonos de longitud) se enumeran en la tabla 3, a continuación.

Tabla 3: Análisis FAME de un transformante de la Serie Piromyces 130 y uno de la Serie Piromyces 131

	Crecimiento de WT en glucosa	Crecimiento de la Serie 130 en glucosa	Crecimiento de la serie 130 en xilosa	Crecimiento de la Serie 131 en glucosa	Crecimiento de la Serie 131 en xilosa
DCW mg	0,82	0,80	0,33	0,73	0,33
DCW g/l	16,38	15,95	6,59	14,61	6,68
% de grasa	60,58	65,88	43,34	60,39	50,53
g/l de grasa	9,92	10,51	2,85	8,82	3,38
Perfil de ácidos grasos:					
% 12:0	0,24	0,32	0,08	0,30	0,00
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	10,65	12,04	6,82	12,73	6,90
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,25	0,29	0,32	0,35	0,00
% 16:0	34,43	29,40	25,43	30,27	32,48
% 16:1	9,24	13,11	8,32	11,82	6,57
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:0	1,22	1,00	1,06	0,82	1,31
% 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:1 n-7	5,77	6,24	7,79	5,21	6,88
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ES 2 651 313 T3

	Crecimiento de WT en glucosa	Crecimiento de la Serie 130 en glucosa	Crecimiento de la serie 130 en xilosa	Crecimiento de la Serie 131 en glucosa	Crecimiento de la Serie 131 en xilosa
% 20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:4 ARA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:5 n-3 EPA	0,00	0,00	1,58	0,61	2,09
% 22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	10,21	10,12	14,05	10,56	12,18
% 22:5 n-3 DPA	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00
% 22:6 n-3 DHA	27,98	27,48	33,58	26,87	31,59
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% Desconocido	0,00	0,00	0,53	0,47	0,00
mg/g de DHA	167,67	179,05	144,03	160,50	157,88
FAME saturados	45,32	41,76	32,34	43,30	39,38
FAME monoinsaturados	15,26	19,63	16,42	17,37	13,45
>C 18 FAME	38,19	37,60	49,51	38,04	45,86

Ejemplo 5

5 Crecimiento en xilosa de *Schizochytrium* transformado con vectores de expresión del transportador de xilosa, la reductasa de xilosa, la xilitol deshidrogenasa y la cinasa de xilulosa

10 Las cotransformaciones de la cepa ATCC 20888 de tipo silvestre de *Schizochytrium* se realizaron de manera que un vector que contenía el transportador de xilosa de *Candida intermedia* (pCL0130) se cotransformó con tres vectores adicionales: un vector que contenía la reductasa de xilosa de *Pichia stipitis* (pCL0133), un vector que contenía la xilitol deshidrogenasa de *Pichia stipitis* (pCL0134) y un vector que contenía la cinasa de xilulosa de *Pichia stipitis* (pCL0135). Esta combinación de vectores se llamó la Serie Pichia 130. Los transformantes se sembraron en placa directamente en medio sólido de xilosa SSFM y después de 3-5 semanas se recogieron colonias y se propagaron adicionalmente en xilosa-SSFM líquido. Las tasas de cotransformación para la Serie Pichia 130 fueron similares a los de la Serie Piromyces 130 y la Serie Piromyces 131 del ejemplo 4. Las células de *Schizochytrium* transformadas con un transportador de xilosa de *Candida intermedia*, una reductasa de xilosa, una xilitol deshidrogenasa y una cinasa de xilulosa eran capaces de crecer en medio sólido y líquido SSFM que contenía xilosa como única fuente de carbono.

20 Todos los diversos aspectos, realizaciones y opciones descritos en este documento pueden combinarse en todas y cada una de las variaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> MARTEK BIOSCIENCES CORPORTATION

<120> Traustoquítridos recombinantes que crecen en xilosa, y composiciones, métodos de preparación y usos de los mismos

30 <130> 2715.051PC01

<140> A asignar

<141> Junto con la presente

35 <150> US 61/290.471

<151> 28-12-2009

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1614

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Señal de secreción

<400> 1

ES 2 651 313 T3

ggatccatga agttcgcgac ctcggtcgca attttgcttg tggccaacat agccaccgcc 60
 ctcgcgctga tgaccaacga gacctcggac cgccctctcg tgcactttac cccaacaag 120
 ggttggatga acgatcccaa cggcctctgg tacgacgaga aggatgctaa gtggcacctt 180
 tactttcagt acaaccctaa cgacaccgtc tggggcaccg cgctcttctg gggccacgcc 240
 acctccgacg acctcaccaa ctgggaggac cagcccattg ctatcgcccc caagcgcaac 300
 gactcgggag ctttttccgg ttccatggtt gtggactaca acaacacctc cggttttttt 360
 aacgacacca ttgacccccg ccagcgcgtc gtcgccatct ggacctaca cagccccgag 420
 agcgaggagc agtacatcag ctacagcctt gatggaggct acacctttac cgagtaccag 480
 aagaaccctg tcctcgccgc caactccacc cagttccgcg accctaaggt tttttggtac 540
 gagccttccc agaagtggat tatgaccgcc gctaagtcgc aggattaca gatcgagatc 600
 tacagcagcg acgacctcaa gtcctggaag cttgagtccg cctttgcca cgagggtttt 660
 ctcgatacc agtacgagtg ccccggtctc atcgaggctc ccaccgagca ggaccctcc 720
 aagtcctact gggatcatgtt tatttccatc aaccctggcg cccctgccgg cggcagcttc 780
 aaccagtact tcgtcggctc ctttaacggc acgcattttg aggccttcga caaccagtcc 840
 cgcgtcgtcg acttcggcaa ggactactac gccctccaga ccttcttta caccgacccc 900
 acctacggca ggcacctcgg tattgcttgg gcctccaact gggagtactc cgctttcgtc 960
 cccactaacc cctggcgcag ctcgatgtcc ctcgccgca agttttcgtc taacaccgag 1020
 taccaggcca accccgagac cgagcttatt aacctgaagg ccgagcctat tctcaacatc 1080
 tccaacgctg gcccttggtc ccgctttgct actaacacta ccctcaccaa ggccaactcc 1140
 tacaacgtcg atctctccaa ctccaccggt actcttgagt ttgagctcgt ctacgccgtc 1200
 aacaccaccc agaccatctc caagtccgtc ttgcgcgacc tctccctctg gttcaagggc 1260
 cttgaggacc ccgaggagta cctgogcatg ggttttgagg tctccgcctc ctcttcttc 1320
 ctcgatcgcg gtaactccaa ggtaagttt gtcaaggaga acccctactt tactaaccgt 1380
 atgagcgtca acaaccagcc ctttaagtcc gagaacgatc ttagctacta caaggtttac 1440
 ggcctcctcg accagaacat tctcgagctc tactttaacg acggagatgt cgtcagcacc 1500
 aacacctact ttatgaccac tggaaacgcc ctcggcagcg tgaacatgac caccggagtc 1560
 gacaacctct ttacattga caagtttcag gttcgcgagg ttaagtaaca tatg 1614

5 <210> 2
 <211> 1569
 <212> ADN
 <213> *Candida intermedia*

10 <220>
 <223> proteína transportadora de xilosa GXS1, codones optimizados

<400> 2

ES 2 651 313 T3

atgggcctcg aggataaccg catgggtaag cgctttgtca acgtgggcca gaagaaggcc 60
 ggtagcaccg ccatggccat cattggtggc ctcttcgcg cctcgggagg cgtcctcttc 120
 ggtaacgaca ccggcactat ctccggcgctc atgactatgg actacgttct cgcccgtac 180
 ccctccaaca agcactcctt caccgctgac gagtcgtcgc tcatcgtttc cattctttcg 240
 gtcggcacct tcttcggcgc cctctgcgcc ccgttcctca acgataccct cggccgcccgc 300
 tgggtgcctca tcctcagcgc cctcattgtc tttaacatcg gcgccatcct ccaggtcatt 360
 tccaccgcca tccccctgct ctgcgcggggc cgcgttatcg ccggtttcgg tgcgggcctc 420
 atttccgcca ccatcccgtc ctaccagtcc gagactgctc cgaagtggat tcgcggcgcc 480
 atcgtttctt gctaccagtg ggccatcact atcggacttt tcctcgtctc ctgcgtcaac 540
 aagggcaccg agcacatgac caactccggt tcgtaccgta ttcctctggc catccagtgc 600
 ctctggggcc tcatccttgg tattggcatg attttctctc ctgagacccc ccgcttctgg 660
 atttogaagg gcaaccagga gaaggccgcc gagtccctcg cccgtctccg caagctcccc 720
 atcgaccatc ctgatagcct tgaggagctt cgcgatatta ctgccgccta cgagttcgag 780
 accgtctacg gtaagtccag ctgggtcccag gtcttttccc acaagaacca tcagctcaag 840
 cgctcttta ccggcggttc cattcaggcc tttcagcagc tcaccggagt taactttatc 900
 ttttactacg gcaccacctt ttttaagcgc gccggagtca acggattcac catcagcctt 960
 gccaccaaca tcgttaacgt cggcagcact attcccggca ttcttctcat ggaggtcctc 1020
 ggccgcccga acatgctcat gggcgggtgcc accggcatgt cgctgtcgca gcttatcgtc 1080
 gccattgtcg gagttgccac gtcgggagaac aacaagtcga gccagtcggt cctcgtcgtc 1140
 ttctcgtgca tctttatcgc tttttttgcc gccacctggg gtccctgcgc ctgggtcgtc 1200
 gtcggcgagc tctttccctc tcgcaactgc gctaagtccg tttccctctg caccgctcc 1260
 aactggctct ggaactgggg cattgcttac gccaccccct acatggtcga cgaggataag 1320
 ggtaaacctc gcagcaacgt tttttttatt tggggaggct tcaacctcgc ttgcgtcttt 1380
 ttcgcgtggt acttcattta cgagaccaag ggcctttccc tcgagcaggt tgatgagctc 1440
 tacgagcatg tttcgaaggc gtggaagtcc aagggttttg tcccgtcca gcactccttt 1500
 cgcgagcagg tcgaccagca gatggactcc aagaccgagg ccattatgag cgaggaggcg 1560
 tcggtttaa 1569

5 <210> 3
 <211> 1512
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

10 <220>
 <223> proteína transportadora de xilosa At5g17010, codones optimizados

ES 2 651 313 T3

<400> 3

atggccctcg accctgagca gcagcagccc atttcctccg tgtcgcgcga gtttggttaag	60
tcgtccggtg agatctcccc cgagcgtgag cctctcatta aggagaacca cgtccccgag	120
aactactccg ttggtgccgc catcctcccc ttctctctcc cggccctggg tggcctcctt	180
tacggttacg agattggcgc tacgtcgtgc gctacgattt cccttcagtc cccctccctc	240
tccggcatct cctggtacaa cctctcctcc gtcgatggtg gcctcgtcac ttccggttcc	300
ctctacggtg ctctgtttgg ctccattggt gccttcacca ttgccgacgt tattggccgt	360
cgcaaggagc ttatcctcgc tgcctcctc tacctcgtcg gtgccctcgt taccgctctc	420
gcccctacgt actccgttct catcatcggc cgtgtcattt acggtgtttc cgtcggctctt	480
gccatgcatg ctgccctat gtacatcgcg gagaccgccc cgtcccccat ccgcggccag	540
ctcgtttccc tcaaggagtt tttcatcgtt ctccggtatgg tcggcggata cggcattggt	600
tccctcaccg tcaacgtcca ctccggttgg cgctacatgt acgctacctc cgttcccctc	660
gctgtgatca tgggcattgg catgtggtgg cttcctgcct cccccggtg gctcctcctc	720
cgcgtcattc agggtaaggg taacgttgag aaccagcgcg aggctgccat taagtccctc	780
tgctgcctcc gtggtcctgc cttcgtcgc acgcccgcg agcaggtaa cgagattctc	840
gccgagctta ccttcggttg cgaggataag gaggtcacct tcggcgcgct cttccagga	900
aagtgcctca aggcctcat tatcggcggc ggcttgttc tctttcagca gatcaccggt	960
cagccttcgg tcctctacta cccccctcg atcctccaga ctgcgggctt ctccgccgcc	1020
ggcgtatgcta cccgcgtttc cattcttctc ggctcctca agctcattat gaccggtgtc	1080
gccgtcgtcg ttatcgatcg tctcggcgt cgcctctcc tcctcggcgg agtcggtggt	1140
atggttgttt cgtctttct ccttggtcgt tactaccttt tcttcagcgc ttccccgtc	1200
gtcgcggttg tgcctcct tctctacgtg ggttgctacc agctctcctt tggccccatt	1260
ggctggctta tgatttcoga gatttttccc ctcaagctcc gtggtcgcgg actctccctt	1320
gccgtgcttg tcaactttgg tgccaacgcc ctcgtcacct ttgccttttc cctctcaag	1380
gagctcctcg ggcgcggcat cctgttttgc ggctttggcg ttatctgcgt tctctccctt	1440
gtttttatct tttttatcgt cccggagact aagggcctca cgctcgagga gatcgaggcg	1500
aagtgcctct aa	1512

5 <210> 4
 <211> 6175
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> vector pCL0121

ES 2 651 313 T3

<400> 4

ctottatctg cctcgcgccg ttgaccgccg cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc	60
tgcctcgcctc gcgcaggcgg gcgggcgagt ggggtgggtcc gcagccttcc gcgctcgccc	120
gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc	180
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag	240
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgcgc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg	300
gtcccgcgga gcctccgcgt tagtccccgc cccgcgccgc gcagtcccc gggaggcatc	360
gcgcaacctc cgcgccccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct	420
tcgcgcctc cgctcgcggc cgcgtcgccc gcgccccgct ccctatctgc tcccagggg	480
ggcaactcgc accttttgcg cccgctgccg ccgcgcggc cgcgccgccg ccctggtttc	540
ccccgcgagc gcggccgcgt cgcgcgcaa agactcgcg cgtgccgcc cgagcaacgg	600
gtggcggcgg cgcggcggcg ggcggggcgc ggcggcgcgt aggcggggct aggcgccggc	660
taggcgaaac gccgccccg ggcgccgccg ccgcccgtc cagagcagtc gccgcgccag	720
accgccaacg cagagaccga gaccgaggta cgtcgcgcc gagcacgcc cgacgcgcgg	780
cagggacgag gagcacgacg ccgcgccgcg ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga	840
cgcgggagcg agcgtgcatg tttccgcgcg agacgacgcc gcgcgcgctg gagaggagat	900
aaggcgcttg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata	960
gtatcttgcg tgcttgacg aggagactga cgaggaggac ggatacgtcg atgatgatgt	1020
gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgact actagcaagc aagggatcca tgaagtctgc	1080
gacctcggtc gcaattttgc ttgtggccaa catagccacc gccctcgcgc agagcgatgg	1140
ctgcaccccc accgaccaga cgatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt	1200
gcccacctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga	1260

ES 2 651 313 T3

gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcattctgca ccaccggcaa 1320
 gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag 1380
 ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta 1440
 cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacct gcgccgaggt 1500
 gaagttcgag ggcgacacct tggatgaacc catcgagctg aagggcatcg acttcaagga 1560
 ggacggcaac atcctgggac acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat 1620
 catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga 1680
 ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc 1740
 cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagctcc gccctgagca aagaccccaa 1800
 cgagaagcgc gatcacatgg tcttctgga gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcg 1860
 catggacgag ctgtacaagc accaccatca ccaccactaa catatgagtt atgagatccg 1920
 aaagtgaacc ttgtcctaac ccgacagcga atggcgggag ggggcgggct aaaagatcgt 1980
 attacatagt atttttcccc tactctttgt gtttctctt ttttttttt tgaacgcatt 2040
 caagccactt gtctgggttt acttggttgt ttgcttgctt gcttgcttgc ttgcctgctt 2100
 cttggtcaga cggcccaaaa aagggaaaaa attcattcat ggcacagata agaaaaagaa 2160
 aaagtttgc gaccaccgtc atcagaaagc aagagaagag aaacctcgc gctcacattc 2220
 tcgctcgcgt aagaatctta gccacgcata cgaagtaatt tgtccatctg gcgaatcttt 2280
 acatgagcgt tttcaagctg gagcgtgaga tcatacctt cttgatcgtg atgttccaac 2340
 cttgcatagg cctcgttgcg atccgctagc aatgcgtcgt actcccgttg caactgcgcc 2400
 atgcctcat tgtgacgtga gttcagattc ttctcgagac cttcgagcgc tgctaatttc 2460
 gcctgacgct ccttcttttg tgcttccatg acacgccgt tcaccgtgcg ttccacttct 2520
 tcctcagaca tgcccttggc tgctcagacc tgctcggtaa aacgggcccc agcacgtgct 2580
 acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg 2640
 ggacgccggc tggatgatcc tccagcggg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacct 2700
 caacttgttt attgcagctt ataatggtta caataaagc aatagcatca caaatttcac 2760
 aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc 2820
 ttatcataca tggctgacct gcaggaacct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 2880
 aggcggtttg cgtattgggc gctcttcgc ttctcgtc actgactcgc tgcgctcgtt 2940
 cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 3000
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 3060
 taaaaaggcc gogttgctgg cgtttttcca taggctcgc cccctgacg agcatcacia 3120
 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 3180
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 3240

ES 2 651 313 T3

gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 3300
cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggtgtgtg cacgaacccc cgttcagcc 3360
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 3420
atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg taggcggtgc 3480
tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat 3540
ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 3600
acaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgagaaa 3660
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 3720
aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 3780
tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat cttaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 3840
cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc 3900
catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 3960
cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 4020
aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 4080
ccagtctatt aattggtgcc ggggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 4140
caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 4200
attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 4260
agcggtagc tccttcgggc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 4320
actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 4380
ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 4440
ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 4500
gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgtgttgag 4560
atccagttcg atgtaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 4620
cagcgtttct gggtagcaaa aacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 4680
gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca 4740
gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata acaaatagg 4800
ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 4860
gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggccttt cgtctcgcgc gtttcggtga 4920
tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 4980
ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgctcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 5040
ctggcttaac tatgoggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccaag cttccaattt 5100
taggcccccc actgaccgag gtctgtcgat aatccaactt tccattgatt ttccagttt 5160

ES 2 651 313 T3

```

cgttaactca tgccactgag caaaacttcg gtctttccta acaaaagctc tcctcacaaa      5220
gcatggcgcg gcaacggacg tgcctcata ctccactgcc acacaaggctc gataaactaa      5280
gctcctcaca aatagaggag aattccactg acaactgaaa acaatgtatg agagacgatc      5340
accactggag cggcgcggcg gttggcgcg gaggtcggca gcaaaaacaa gcgactcgcc      5400
gagcaaaccg gaatcagcct tcagacggtc gtgcctaaca acacgccggtt ctaccccgcc      5460
ttcttcgctc cccttcgctt ccaagcatcc ttcaagttta tctctctagt tcaacttcaa      5520
gaagaacaac accaccaaca ccatggccaa gttgaccagt gccggttcgg tgctcaccgc      5580
gcgcgacgct gccggagcgg tcgagttctg gaccgaccgg ctcggttctt cccgggactt      5640
cgtggaggac gacttcgccg gtgtggtccg ggacgacgtg accctgttca tcagcgcggt      5700
ccaggaccag gtggtgccgg acaacaccct ggcttgggtg tgggtgcgcg gcctggacga      5760
gctgtacgcc gagtggctcg aggtcgtgtc cacgaacttc cgggacgcct cggggccggc      5820
catgaccgag atcggcgagc agccgtgggg gcgggagttc gccctgcgcg acccggccgg      5880
caactgcgtg cacttcgtgg ccgaggagca ggactgacac gtgctacgag atttcgattc      5940
caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt ttccgggacg ccggctggat      6000
gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccocaaact tgtttattgc      6060
agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata aagcattttt      6120
ttcactgcat tctagttgtg gtttgcctca actcatcaat gtatcttata ggtac          6175

```

```

<210> 5
<211> 6611
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> vector pCL0122

<400> 5

```

5

10

ES 2 651 313 T3

ctcttatctg cctcgcgccg ttgaccgccg cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc	60
tgcctcgctc gcgcagggcg gcggggcgagt ggggtgggtcc gcagccttcc gcgctcgccc	120
gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc	180
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatoga tcgtgcggtc aaaaagaaag	240
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgccc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg	300
gtcccgcgga gcctccgctg tagtccccgc cccgcgccgc gcagtcccc gggaggcatc	360
gcgcacctct cgccgcccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct	420
tcgccgcctc cgctcgggc cgcgctgccc gcgccccgct ccctatctgc tcccagggg	480
ggcactccgc accttttgcg cccgctgccg ccgcccgggc cgcgcccgcg ccctggtttc	540
ccccgcgagc gcggccgctg cgccgcgcaa agactcgccg cgtgccgccc cgagcaacgg	600
gtggcggcgg cgcgggcgcg ggcggggcgc ggcggcgct aggcggggct aggcgccggc	660

ES 2 651 313 T3

taggcgaaac	gccgcccccg	ggcgccgccc	ccgcccgcctc	cagagcagtc	gccgcgccag	720
accgccaacg	cagagaccga	gaccgaggta	cgtcgcgccc	gagcacgccg	cgacgcgcgg	780
cagggacgag	gagcacgacg	ccgcgcccgc	ccgcgcgggg	ggggggaggg	agaggcagga	840
cgcgggagcg	agcgtgcatg	tttccgcgcg	agacgacgcc	gcgcgcgctg	gagaggagat	900
aaggcgcttg	gatcgcgaga	gggccagcca	ggctggaggc	gaaaatgggt	ggagaggata	960
gtatcttgcg	tgcttgagcg	aggagactga	cgaggaggac	ggatacgtcg	atgatgatgt	1020
gcacagagaa	gaagcagttc	gaaagcgact	actagcaagc	aagggatcca	tgaagtctgc	1080
gacctcggtc	gcaatcttgc	ttgtggccaa	catagccacc	gccctcgcgc	agagcgatgg	1140
ctgcaccccc	accgaccaga	cgatggtgag	caagggcgag	gagctgttca	ccggggtggt	1200
gcccatcctg	gtcgagctgg	acggcgacgt	aaacggccac	aagttcagcg	tgtccggcga	1260
ggcgagggc	gatgccacct	acggcaagct	gaccctgaag	ttcatctgca	ccaccggcaa	1320
gctgcccgtg	ccctggccca	ccctcgtgac	caccctgacc	tacggcgtgc	agtgcttcag	1380
ccgctacccc	gaccacatga	agcagcacga	cttcttcaag	tccgccatgc	ccgaaggcta	1440
cgccagagag	cgccaccatct	tcttcaagga	cgacggcaac	tacaagacct	gcgcccaggt	1500
gaagttcgag	ggcgacaccc	tggtgaaccg	catcgagctg	aagggcatcg	acttcaagga	1560
ggacggcaac	atcctgggac	acaagctgga	gtacaactac	aacagccaca	acgtctatat	1620
catggcccgc	aagcagaaga	acggcatcaa	ggtgaacttc	aagatccgcc	acaacatcga	1680
ggacggcagc	gtgcagctcg	ccgaccacta	ccagcagaac	accccatcgc	gcgacggccc	1740
cgtgctgctg	cccgacaacc	actacctgag	caccctgacc	gccctgagca	aagaccccaa	1800
cgagaagcgc	gatcacatgg	tcctgctgga	gttcgtgacc	gccgcccggga	tactctcgg	1860
catggacgag	ctgtacaagc	accaccatca	ccaccactaa	catatgagtt	atgagatccg	1920
aaagtgaacc	ttgtcctaac	ccgacagcga	atggcgggag	ggggcgggct	aaaagatcgt	1980
attacatagt	atctttcccc	tactctttgt	gtttgtcttt	tttttttttt	tgaacgcatt	2040
caagccactt	gtctggggtt	acttgtttgt	ttgcttgctt	gcttgcttgc	ttgcctgctt	2100
cttggtcaga	cggcccaaaa	aagggaaaaa	attcattcat	ggcacagata	agaaaaagaa	2160
aaagtttgc	gaccaccgct	atcagaaagc	aagagaagag	aaacactcgc	gctcacattc	2220
tcgctcgcgt	aagaatctta	gccacgcata	cgaagtaatt	tgtccatctg	gcgaatcttt	2280
acatgagcgt	tttcaagctg	gagcgtgaga	tcataccttt	cttgatcgta	atggtccaac	2340
cttgcatagc	cctcgttgcg	atccgctagc	aatgcgtcgt	actcccgttg	caactgcgcc	2400
atcgctcat	tgtgacgtga	gttcagattc	ttctcgagac	cttcgagcgc	tgctaatttc	2460
gcctgacgct	ccttcttttg	tgcttccatg	acacgcgcgt	tcaccgtgcg	ttccacttct	2520
tcctcagaca	tgcccttggc	tgccctgacc	tgctcggtaa	aacgggcccc	agcacgtgct	2580

ES 2 651 313 T3

acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 2640
 ggacgccggc tggatgatcc tccagcggcg ggatctcatg ctggagttct tcgcccaccc 2700
 caacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac 2760
 aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc 2820
 ttatcataca tggtcgacct gcaggaacct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 2880
 aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttctctgctc actgactcgc tgcgctcggc 2940
 cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga 3000
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 3060
 taaaaggcc gcggtgctgg cgtttttcca taggctcgc ccccctgacg agcatcacia 3120
 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgct 3180
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccgataacct 3240
 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 3300
 cagttcggtg taggtcgctt gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 3360
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt 3420
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg tagggcggtc 3480
 tacagagttc ttgaagtggc ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat 3540
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 3600
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 3660
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 3720
 aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 3780
 tttaaattaa aatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga 3840
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc 3900
 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 3960
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagacct acgtcaccg gctccagatt tatcagcaat 4020
 aaaccagcca gccggaaggc cgcgagcagc aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 4080
 ccagctatt aattggtgcc ggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcc 4140
 caacggtgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 4200
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 4260
 agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 4320
 actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 4380
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 4440
 ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 4500
 gctcatcatt ggaaaacgct cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 4560

ES 2 651 313 T3

atccagttcg	atgtaaccca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	ttactttcac	4620
cagcgtttct	gggtgagcaa	aacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	gaataagggc	4680
gacacggaaa	tgttgaatac	tcatactctt	cctttttcaa	tattattgaa	gcatttatca	4740
gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	tgaatgtatt	tagaaaaata	aacaaatagg	4800
ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgacgtc	taagaaacca	ttattatcat	4860
gacattaacc	tataaaaata	ggcgtatcac	gaggcccttt	cgtctcgcgc	gtttcggtga	4920
tgacggtgaa	aacctctgac	acatgcagct	cccggagacg	gtcacagctt	gtctgtaagc	4980
ggatgccggg	agcagacaag	cccgtcaggg	cgcgtcagcg	ggtggtggcg	ggtgtcgggg	5040
ctggcttaac	tatgcggcat	cagagcagat	tgtactgaga	gtgcaccaag	cttccaattt	5100
taggcccccc	actgaccgag	gtctgtcgat	aatccacttt	tccattgatt	ttccaggttt	5160
cgttaactca	tgccactgag	caaaacttcg	gtctttccta	acaaaagctc	tcctcacaaa	5220
gcatggcgcg	gcaacggacg	tgtcctcata	ctccactgcc	acacaaggtc	gataaactaa	5280
gctcctcaca	aatagaggag	aattccactg	acaactgaaa	acaatgtatg	agagacgatc	5340
accactggag	cggcgcggcg	gttggggcgcg	gaggtcggca	gcaaaaacaa	gcgactcgcc	5400
gagcaaacc	gaatcagcct	tcagacggtc	gtgcctaaca	acacgccggt	ctaccccgcc	5460
ttcttcgcgc	cccttcgogt	ccaagcatcc	ttcaagttta	tctctctagt	tcaacttcaa	5520
gaagaacaac	accaccaaca	ccatgattga	acaagatgga	ttgcacgcag	gttctccggc	5580
cgcttgggtg	gagaggctat	tcggctatga	ctgggcacaa	cagacaatcg	gctgctctga	5640
tgccgccgtg	ttccggctgt	cagcgcaggg	gcgcccggtt	ctttttgtca	agaccgacct	5700
gtccggtgcc	ctgaatgaac	tgcaaggacg	ggcagcgcgg	ctatcgtggc	tggccacgac	5760
gggcgttcct	tgcgcaagctg	tgctcgacgt	tgtcactgaa	gcgggaaggg	actggctgct	5820
attgggcgaa	gtgccggggc	aggatctcct	gtcatctcac	cttgctcctg	ccgagaaagt	5880
atccatcatg	gctgatgcaa	tgccggcggt	gcatacgtt	gatccggcta	cctgcccatt	5940
cgaccaccaa	gcgaaacatc	gcatcgagcg	agcacgtact	oggatggaag	ccggtcttgt	6000
cgatcaggat	gatctggacg	aagagcatca	ggggctcgcg	ccagccgaac	tgttcgccag	6060
gctcaaggcg	cgcatgcccg	acggcgatga	tctcgtcgtg	acccatggcg	atgcctgctt	6120
gccgaatata	atggtgga	atggccgctt	ttctggattc	atcgactgtg	gccggctggg	6180
tgtggcggac	cgctatcagg	acatagcgtt	ggctaccogt	gatattgctg	aagagcttgg	6240
cggcgaatgg	gctgaccgct	tcctcgtgct	ttacggatca	gocgctcccg	attcgcagcg	6300
catcgccttc	tatcgccttc	ttgacgagtt	cttctgacac	gtgctacgag	atttcgattc	6360
caccgccgcc	ttctatgaaa	ggttgggctt	cggaatcggt	ttccgggacg	ccggctggat	6420
gatcctccag	cgcggggatc	tcatgctgga	gttcttcgcc	caccccaact	tgtttattgc	6480

ES 2 651 313 T3

agcTTataat ggtTacaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata aagcattttt 6540
 ttcactgcat tctagtTgtg gttTgtccaa actcatcaat gtatcttatc atgtctgaat 6600
 tcccggggt a c 6611

5 <210> 6
 <211> 1314
 <212> AD
 <213> *Piromyces* sp.

10 <220>
 <223> proteína isomerasa de xilosa de E2 "Xy1A", codones optimizados

<400> 6
 atggctaagg agtacttccc ccagatccag aagattaagt tcgagggtaa ggacagcaag 60
 aaccgcctcg cctttcatta ctacgacgcc gagaaggagg tgatgggcaa gaagatgaag 120
 gactggcttc gctttgctat ggcttggtgg cacactctct gcgctgaggg cgcgaccag 180
 tttggcggcg gtacgaagag ctttccgtgg aacgagggca ctgacgctat tgagattgct 240
 aagcagaagg ttgacgctgg tttcgagatt atgcagaagc tcggtattcc gtactactgc 300
 tttcacgatg tcgacctcgt ttccgagggc aactcgatcg aggagtacga gtcgaacctc 360
 aaggctgtgg ttgcctacct caaggagaag cagaaggaga ccggaatcaa gtcctctggt 420
 agcaccgcca acgttttcgg ccacaagcgc tacatgaacg gcgcctccac caaccctgac 480
 ttcgatgttg ttgcccgcgc tattgtccag attaagaacg ccatcgacgc tggatcgag 540
 ctcggagccg agaactacgt tttttggggc ggacgcgagg gttacatgtc cctcctcaac 600
 accgaccaga agcgtgagaa ggagcacatg gccactatgc ttaccatggc ccgcgactac 660
 gcccgagca agggttttaa gggactttt ctcatgagc cgaagcccat ggagccgacc 720
 aagcaccagt acgacgtcga caccgagacc gccattggct tccttaaggc ccacaacctt 780
 gacaaggatt ttaagggtgaa catcgagggt aaccacgcta cgcttgccgg ccacacctt 840
 gagcatgagc tcgcctgcgc tgttgacgcc ggaatgcttg gttccattga cgccaaccgc 900
 ggcgactacc agaacggctg ggacaccgac cagtttccga ttgaccagta cgagctcgtc 960
 caggcctgga tggagatcat ccgtggtgga ggctttgtta ccggtggtac gaacttcgac 1020
 gccaaagcgc gccgtaacag cacggacctc gaggacatca tcattgctca tgtgtcgggc 1080
 atggacgcca tggctcgcgc ccttgagaac gctgctaagc tcctccagga gagcccctac 1140
 acgaagatga agaaggagcg ctacgcgtcg tttgacagcg gaatcggtaa ggacttcgag 1200
 gatggcaagc tcaccctgga gcaggtgtac gagtacggt aagaagaacgg cgagccgaag 1260
 cagaccagcg gcaagcagga gctctacgag gccattgtcg ccatgtacca gttag 1314

15

ES 2 651 313 T3

<210> 7
 <211> 1485
 <212> ADN
 <213> *Piromyces sp.*

5

<220>
 <223> *proteína cinasa de xilulosa de E2 "XylB", codones optimizados*

10

<400> 7

```

atgaagaccg tcgccggcat cgatcttga acccagtcca tgaaggttgt catttacgac      60
tacgagaaga aggagatcat cgagtccgcc tcgtgcccta tggagctcat tagcgagtcg      120
gacggaaccc gcgagcagac gactgagtgg tttgacaagg gtctcgaggt gtgctttgga      180
aagctctccg ctgataacaa gaagaccatt gaggcgattg gcatctccgg ccagctccac      240
ggcttcgtcc ctctcgatgc gaacggaaag gcgctctaca acatcaagct ctggtgcgac      300
accgccactg tggaggagtg caagatcatt actgacgccg ccggcggcga caaggctgtc      360
atcgacgcgc tcggcaacct catgctcacc ggattcaccg ccccgaaagat tctctggctc      420
aagcgcaaca agcccgaggc ctttgctaac ctcaagtaca ttatgctgcc ccacgattac      480
ctcaactgga agctgactgg agactacgtc atggagtacg gcgacgcctc cggcaccgcc      540
ctttttgatt cgaagaaccg ctgctggtcg aagaagattt gcgacattat tgatcctaag      600
ctgctcgacc ttctccctaa gctcattgag ccctcggccc ccgccggtaa ggtcaacgac      660
gaggccgcca aggcgtacgg cattcccgcc ggaatccccg tttccgctgg cggcgggtgat      720
aacatgatgg gtgcggtcgg tactggcacc gtcgctgacg gattcctcac gatgagcatg      780
ggcacctccg gaactcttta cggctactcg gacaagccta tttccgacct ggctaacggc      840
ctcagcgggt tctgcagctc cacgggcggc tggcttcccc tcctttgcac catgaactgc      900
accgtcgcca ccgagttcgt ccgcaacctt tttcagatgg atatcaagga gctgaacgtc      960
gaggctgcta agtccccctg cggcagcgag ggcgttcttg tcattccttt cttcaacggc     1020
gagcgcaccc cgaacctccc caacggccgc gcctcgatta ccggcctcac ctccgcgaac     1080
acgtcccgcg ccaacatcgc tcgcgcctcc tttgagtcgg ccgtctttgc catgcgcggt     1140
ggcctcgatg cgtttcgtaa gctcggattc cagcccaagg agattcgcct catcggcgggt     1200
ggttcgaagt ccgacctctg gcgccagatc gctgctgaca ttatgaacct tcccatccgt     1260
gtcccccttc tcgaggaggc cggccccctc ggcggagctg tccaggccct ttggtgcctt     1320
aagaaccagt ccggtaagtg cgacatcgtc gagctttgca aggagcatal caagattgac     1380
gagtccaaga acgccaaccc gattgccgag aacgtcgcgg tgtacgataa ggcctacgat     1440
gagtactgca aggtcgtaa cacgctcagc cctctgtacg cctaa                          1485
    
```

ES 2 651 313 T3

5 <210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 5' CL0130

10 <400> 8
cctcgggagg cgctctctt 19

15 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 3' CL0130

20 <400> 9
ggcggccttc tctggtgc 20

25 <210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 5' CL0131

30 <400> 10
ctactcgtt gttgccgcca tcct 24

35 <210> 11
<211> 22
<212> ADN
<213> Cebador 3' CL0131

40 <400> 11
ccgccgacca taccgagaac ga 22

45 <210> 12
<211> 9291
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> vector pCL0120

50 <400> 12

ES 2 651 313 T3

ctcttatctg cctcgcgccg ttgaccgccg cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc	60
tgccctcgctc gcgcaggcgg gcggggcagt gggtaggtcc gcagccttcc gcgctcgccc	120
gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc	180
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag	240
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgcgc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg	300
gtcccgcgga gcctccgct tagtccccgc cccgcgccgc gcagtcccc gggaggcatc	360
gcgcacctct cgcgccccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct	420
tcgccgcctc cgctcgcggc cgcgtcgccc gcgccccgct ccctatctgc tcccagggg	480
ggcaactcgc accttttgcg cccgctgccg ccgcccgggc cgcgccgccg ccctggttc	540
ccccgcgagc gcggccgct cgccgcgcaa agactcgccg cgtgccgcc ccgagcaacgg	600

ES 2 651 313 T3

gtggcggcgg cgcggcggcg ggcggggcgc ggcggcgcgt aggcggggct aggcgccggc 660
 taggcgaaac gccgcccccg ggcgcgcgcg ccgcccgcctc cagagcagtc gccgcgccag 720
 accgccaacg cagagaccga gaccgaggta cgtcgcgccc gagcacgccg cgacgcgcgg 780
 cagggacgag gagcacgacg ccgcgcgcgc ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga 840
 cgcgggagcg agcgtgcatg tttccgcgcg agacgacgcc gcgcgcgcctg gagaggagat 900
 aaggcgcttg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata 960
 gtatcttgcg tgcttgacg aggagactga cgaggaggac ggatacgtcg atgatgatgt 1020
 gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgact actagcaagc aagggatcca tgaagtctgc 1080
 gacctcggtc gcaatthttg ttgtggccaa catagccacc gccctcgcgc agagcgatgg 1140
 ctgcaccccc accgaccaga cgatggtgag caagggcgag gagctgttca cgggggtggt 1200
 gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga 1260
 gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcacttca ccaccggcaa 1320
 gctgccccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag 1380
 ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta 1440
 cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgccgaggt 1500
 gaagtctgag ggcgacacc ttgtgaaccg catcgagctg aagggcacgc acttcaagga 1560
 ggacggcaac atcctgggac acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat 1620
 catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga 1680
 ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc 1740
 cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagtc ccctgagca aagacccaa 1800
 cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcg 1860
 catggacgag ctgtacaagc accaccatca ccaccactaa catatgagtt atgagatccg 1920
 aaagtgaacc ttgtcctaac ccgacagcga atggcgggag gggcgggct aaaagatcgt 1980
 attacatagt atthttcccc tactthttgt gthttgtthtt ththththtt tgaacgcatt 2040
 caagccactt gtctgggthtt acttgthttgt ttgcttgctt gcttgcttgc ttgcctgctt 2100
 cttggtcaga cggcccaaaa aagggaaaaa attcattcat ggcacagata agaaaaagaa 2160
 aaagthttgc gaccaccgtc atcagaaagc aagagaagag aaactctgc gctcacattc 2220
 tcgctcgcgt aagaatctta gccacgcata cgaagtaatt tgtccatctg gcgaatcttt 2280
 acatgagcgt thtcaagctg gagcgtgaga tcataccttt cttgatcgtat atgttccaac 2340
 cttgcatagg cctcgttgcg atccgctagc aatgcgtcgt actcccgttg caactcgcgc 2400
 atcgcctcat tgtgacgtga gttcagattc ttctcgagac cttcgagcgc tgctaatttc 2460
 gcctgacgct cthtctthttg tgcttccatg acacgcgcgt tcaccgtgcg thcacttct 2520
 tcctcagaca tgcccttggc tgctcagacc tgctcggtaa aacgggcccc agcacgtgct 2580

ES 2 651 313 T3

acgagatttc gattccaccg cgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 2640
 ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccaccc 2700
 caacttgttt attgcagctt ataatggta caaataaagc aatagcatca caaatctcac 2760
 aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc 2820
 ttatcataca tggtcgacct gcaggaacct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 2880
 aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttctctgctc actgactcgc tgcgctcggc 2940
 cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga 3000
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 3060
 taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctcgc ccccctgacg agcatcacia 3120
 aaatcgacgc tcaagtca ga ggtggcga aa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 3180
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 3240
 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 3300
 cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 3360
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc aaccggtaa gacacgactt 3420
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 3480
 tacagagttc ttgaagtggc ggcctaacta cggtacact agaagaacag tatttggtat 3540
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 3600
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 3660
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 3720
 aaactcacgt taagggattt tggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 3780
 tttaaattaa aatgaagtt ttaaataat cttaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 3840
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc 3900
 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 3960
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 4020
 aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 4080
 ccagtctatt aattggtgcc ggaagctag agtaagtagt tcgccagta atagtttgcg 4140
 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 4200
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 4260
 agcggtttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgtatc 4320
 actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 4380
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 4440
 ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 4500

ES 2 651 313 T3

gctcatcatt ggaaaacgtt ctctggggcg aaaactctca aggatcttac cgctggtgag 4560
atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 4620
cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 4680
gacacgghaa tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca 4740
gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata acaaataggg 4800
ggttccgcg acatttccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 4860
gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggccttt cgtctcgcgc gtttcgggtga 4920
tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 4980
ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtggtggcg ggtgtcgggg 5040
ctggctaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccaag ctttgcctca 5100
acgcaactag gcccaggcct actttcaactg tgtcttgtct tgcctttcac accgaccgag 5160
tgtgcacaac cgtgttttgc acaaagcgca agatgctcac tcgactgtga agcaaagggtt 5220
gcgcgcaagc gactgcgact gcgaggatga ggatgactgg cagcctgttc aaaaactgaa 5280
aatccgcat gggtcagctg ccattcgcgc atgacgcctg cgagagacaa gttaactcgt 5340
gtcactggca tgtcctagca tctttacgcg agcaaaattc aatcgcttta tttttcagt 5400
ttcgtaacct tctcgcaacc gcgaatcgcc gtttcagcct gactaatctg cagctgctg 5460
gcactgtcag tcagtcagtc agtcgtgcgc gctgttccag caccgaggtc gcgcgtcgcc 5520
gcgctggac cgctgctgct actgctagtg gcacggcagg taggagcttg ttgccggaac 5580
accagcagcc gccagtcgac gccagccagg ggaaagtccg gcgtcgaagg gagaggaagg 5640
cggcgtgtgc aaactaacgt tgaccactgg cgcccgccga cacgagcagg aagcaggcag 5700
ctgcagagcg cagcgcgcaa gtgcagaatg cgcgaaagat ccacttgcgc gcggcggggc 5760
cgcacttgcg ggcgcggcgc ggaacagtgc ggaaaggagc ggtgcagacg gcgcgcagtg 5820
acagtgggcg caaagccgcg cagtaagcag cggcggggaa cggtatacgc agtgccgcg 5880
gccgccgac acagaagtat acgcgggccc aagtggggcg tcgcgcgcgg gaagtgcgga 5940
atggcgggca aggaaaggag gagacggaaa gagggcggga aagagagaga gagagagtga 6000
aaaaagaaag aaagaaagaa agaaagaaag aaagctcgga gccacgccgc ggggagagag 6060
agaaatgaaa gcacggcacg gcaaagcaaa gcaaagcaga ccagccaga ccagccag 6120
ggaggagcgc gcgcaggacc cgcgcggcga gcgagcgagc acggcgcgcg agcgagcgag 6180
cgagcgagcg cgcgagcgag caaggcttgc tgcgagcgat cgagcgagcg agcgggaagg 6240
atgagcgcga cccgcgcggc gacgaggaca gcggcggcgc tgtcctcggc gctgacgacg 6300
cctgtaaagc agcagcagca gcagcagctg cgcgtaggcg cggcgtcggc acggctggcg 6360
gccgcggcgt tctcgtccgg cacgggcgga gacgcggcca agaaggcggc cgcggcgagg 6420
gcgttctcca cgggacgcgg cccaacgcg acacgcgaga agagctcgct ggccacggtc 6480

ES 2 651 313 T3

caggcggcga cggacgatgc ggccttcgtc ggctgaccg gcgccc aaat ctttcatgag 6540
 ctcatgcgcg agcaccaggt ggacaccatc tttggctacc ctggcggcgc cattctgccc 6600
 gtttttgatg ccatttttga gagtgcgcg cttcaagttc attctcgctc gccacgagca 6660
 gggcgccggc cacatggccg agggctacgc gcgcgccacg ggcaagcccg gcgttgtcct 6720
 cgtcacctcg ggccttgag ccaccaacac catcaccccg atcatggatg cttacatgga 6780
 cggtagccg ctgctcgtgt tcaccggcca ggtgcagacc tctgctgtcg gcacggacgc 6840
 tttccaggag tgtgacattg ttggcatcag ccgcgcgtgc accaagtgga acgtcatggt 6900
 caaggacgtg aaggagctcc cgcgccgat caatgaggcc tttgagattg ccatgagcgg 6960
 ccgccgggt cccgtgctcg tcgatcttcc taaggatgtg accgccgttg agctcaagga 7020
 aatgcccgac agctcccccc aggttgctgt gcgccagaag caaaaggctg agcttttcca 7080
 caaggagcgc attggcgctc ctggcacggc cgacttcaag ctcatgccc agatgatcaa 7140
 ccgtgcggag cgaccgtca tctatgctgg ccagggtgtc atgcagagcc cgttgaatgg 7200
 cccggctgtg ctcaaggagt tcgcggagaa ggccaacatt cccgtgacca ccacatgca 7260
 gggctcggc ggctttgacg agcgtagtcc cctctccctc aagatgctcg gcatgcacgg 7320
 ctctgcctac gccaaactact cgatgcagaa cgccgatctt atcctggcgc tcggtgcccg 7380
 ctttgatgat cgtgtgacgg gccgcgttga cgctttgct ccggaggctc gccgtgccga 7440
 gcgcgagggc gcgggtggca tcgttcaact tgagatttcc cccaagaacc tccacaaggt 7500
 cgtccagccc accgtcgcgg tcctcggcga cgtggtcgag aacctcgcca acgtcacgcc 7560
 ccacgtgcag cgccaggagc gcgagccgtg gtttgcgcag atcgccgatt ggaaggagaa 7620
 gcaccctttt ctgctcgagt ctggtgattc ggacgacaag gttctcaagc cgcagcaggt 7680
 cctcacggag cttaacaagc agattctcga gattcaggag aaggacgccg accaggaggt 7740
 ctacatcacc acgggcgtcg gaagccacca gatgcaggca gcgcagttcc ttacctggac 7800
 caagccgcgc cagtggatct cctcgggtgg cgccggcaact atgggctacg gccttccctc 7860
 ggccattggc gccaaagattg ccaagcccga tgctattggt attgacatcg atggtgatgc 7920
 ttcttattcg atgaccggta tggaattgat cacagcagcc gaattcaagg ttggcgtgaa 7980
 gattcttctt ttgcagaaca actttcaggg catggtcaag aacgttcagg atctctttta 8040
 cgacaagcgc tactcgggcc accgccatgt tcaaccgcgc cttcgacaag gtcgccgatg 8100
 cgatgcgtgc caagggtctc tactgcgcga aacagtcgga gctcaaggac aagatcaagg 8160
 agtttctcga gtacgatgag ggtcccgtcc tcctcgaggt tttcgtggac aaggacacgc 8220
 tcgtcttgcc catggtcccc gctggctttc cgctccacga gatggtcctc gagcctccta 8280
 agcccaagga cgcctaagtt cttttttcca tggcgggcca gcgagcgagc gcgcgagcgc 8340
 gcaagtgcgc aagcgccttg ccttgctttg ctctcgcttg ctttgctttg cttcacacaa 8400

ES 2 651 313 T3

```

cctaagtatg aattcaagtt ttcttgcttg tcggcgatgc ctgcctgcca accagccagc      8460
catccggccg gccgtccttg acgccttcgc ttccggcgcg gccatcgatt caattcaccc      8520
atccgatacg ttccgcccc tcacgtccgt ctgcgcacga cccctgcacg accacgcca      8580
ggccaacgcg ccgctcagct cagcttgtcg acgagtcgca cgtcacatat ctcagatgca      8640
tttggactgt gagtgttatt atgccactag cacgcaacga tcttcggggg cctcgtcat      8700
tgcacccggt cgggccctgc aggcgtggac gcgagtcgcc gccgagacgc tgcagcaggc      8760
cgctccgacg cgagggctcg agctcggcgc gcccgcgca tgtctgcctg gcgccactg      8820
atctctggag cgcaaggaag acacggcgac gcgaggagga ccgaagagag acgctggggg      8880
atgcaggata taccggggc gggacattcg ttccgcatac actcccccat tcgagcttgc      8940
tcgtccttgg cagagccgag cgcgaacggt tccgaacgcg gcaaggattt tggctctggt      9000
gggtggactc cgatcgaggc gcaggttctc cgcaggttct cgcaggccgg cagtggctcg      9060
tagaaatagg gagtgccgga gtcttgacgc gccttagctc actctccgcc cacgcgcgca      9120
tcgccccat gccgccgtcc cgtctgtcgc tgcgctggcc gcgaccggct gcgccagagt      9180
acgacagtgg gacagagctc gaggcgacgc gaatcgctcg ggttgtaagg gtttcaaggg      9240
tcgggcgtcg tcgctgcca aagtgaaaat agtagggggg ggggggggta c      9291

```

<210> 13
 <211> 6219
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> vector pCL0123

10

<400> 13

ES 2 651 313 T3

ctcttatctg cctcgcgccg ttgaccgccg cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc	60
tgccctcgctc gcgcaggcgg gcggggcagt gggtaggtcc gcagccttcc gcgctcgccc	120
gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc	180
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag	240
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgcgc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg	300
gtcccgcgga gcctccgct tagtccccgc cccgcgccgc gcagtcccc gggaggcatc	360
gcgcacctct cgcgccccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct	420
tcgccgcctc cgctcgcggc cgcgtcgccc gcgccccgct ccctatctgc tccccagggg	480
ggcaactccgc accttttgcg cccgctgccg ccgcccgggc cgccccgccg ccctggttct	540
ccccgcgagc gcggccgcgt cgcgcgcaa agactcgccg cgtgccgcc cgagcaacgg	600
gtggcgggcg cgcgggcgcg ggcggggcgc ggcggcgct aggcggggct aggcgccggc	660
taggcgaaac gccgcccccg ggcgccgccg ccgcccgtc cagagcagtc gccgcgccag	720
accgccaacg cagagaccga gaccgaggtc cgtcgcgcc gagcacgcc cgacgcgcgg	780

ES 2 651 313 T3

cagggacgag	gagcacgacg	ccgcgccgcg	ccgcgcgggg	ggggggaggg	agaggcagga	840
cgcgggagcg	agcgtgcatg	tttccgcgcg	agacgacgcc	gcgcgcgctg	gagaggagat	900
aaggcgcttg	gatcgcgaga	gggccagcca	ggctggaggc	gaaaatgggt	ggagaggata	960
gtatcttgcg	tgcttggacg	aggagactga	cgaggaggac	ggatacgtcg	atgatgatgt	1020
gcacagagaa	gaagcagttc	gaaagcgact	actagcaagc	aagggatcca	tgaagttcgc	1080
gacctcggtc	gcaatthttg	ttgtggccaa	catagccacc	gccctcgcgc	agagcgatgg	1140
ctgcaccccc	accgaccaga	cgatggtgag	caagggcgag	gagctgttca	ccggggtggt	1200
gcccatcctg	gtcgagctgg	acggcgacgt	aaacggccac	aagttcagcg	tgtccggcga	1260
ggcgaggggc	gatgccacct	acggcaagct	gaccctgaag	ttcatctgca	ccaccggcaa	1320
gctgccctg	ccctggccca	ccctcgtgac	caccctgacc	tacggcgtgc	agtgcttcag	1380
ccgctacccc	gaccacatga	agcagcacga	cttcttcaag	tccgccatgc	ccgaaggcta	1440
cgccagagag	cgccacctct	tcttcaagga	cgacggcaac	tacaagacc	gcgccgaggt	1500
gaagttcgag	ggcgacaccc	tggtgaaccg	catcgagctg	aagggcacgc	acttcaagga	1560
ggacggcaac	atcctgggac	acaagctgga	gtacaactac	aacagccaca	acgtctatat	1620
catggccgac	aagcagaaga	acggcatcaa	ggtgaacttc	aagatccgcc	acaacatcga	1680
ggacggcagc	gtgcagctcg	ccgaccacta	ccagcagaac	accccatcgc	gcgacggccc	1740
cgctgctgct	cccgacaacc	actacctgag	caccagctcc	gccctgagca	aagaccccaa	1800
cgagaagcgc	gatcacatgg	tcctgctgga	gttcgtgacc	gccgcgggga	tcactctcgg	1860
catggacgag	ctgtacaagc	accaccatca	ccaccactaa	catatgagtt	atgagatccg	1920
aaagtgaacc	ttgtcctaac	ccgacagcga	atggcgggag	ggggcgggct	aaaagatcgt	1980
attacatagt	atthttcccc	tactctttgt	gtttgtcttt	thttthtttt	tgaacgcatt	2040
caagccactt	gtctgggtht	acttgthttg	ttgcttgctt	gcttgcttgc	ttgcctgctt	2100
cttggtcaga	cgccccaaaa	aagggaaaaa	attcattcat	ggcacagata	agaaaaagaa	2160
aaagthtgc	gaccaccgtc	atcagaaagc	aagagaagag	aaacactcgc	gctcacattc	2220
tcgctcgcgt	aagaatotta	gccacgcata	cgaagtaatt	tgtccatctg	gcgaatcttt	2280
acatgagcgt	thtcaagctg	gagcgtgaga	tcataccttt	cttgatcgta	atgthccaac	2340
cttgcatagg	cctcgttgcg	atccgctagc	aatgcgtcgt	actcccgttg	caactgcgcc	2400
atgcctcat	tgtgacgtga	gthcagattc	thctcgagac	cttcgagcgc	tgctaatttc	2460
gcctgacgct	cctththttg	tgcttccatg	acacgccgct	tcaccgtgcg	thccacttht	2520
thctcagaca	tgcccttggc	tgctcgcacc	tgctcggtaa	aacgggcccc	agcacgtgct	2580
acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaaggthg	ggcttcggaa	tcgthttccg	2640
ggacgccggc	tggtatgatcc	thcagcgcgg	ggatctcatg	ctggagthct	tcgccccccc	2700

ES 2 651 313 T3

caacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac 2760
 aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc 2820
 ttatcataca tggtcgacct gcaggaacct gcattaatga atcggccaac ggcgggggag 2880
 aggcggtttg cgtattgggc gctcttcgac ttctctgctc actgactcgc tgcgctcggc 2940
 cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga 3000
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 3060
 taaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctcgc cccctgacg agcatcacia 3120
 aatcgacgc tcaagtcaaa ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accagggcgtt 3180
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccgataacct 3240
 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 3300
 cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggtgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 3360
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 3420
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc 3480
 tacagagttc ttgaagtggc ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat 3540
 ctgctctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 3600
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgagaaa 3660
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga 3720
 aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 3780
 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga 3840
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc 3900
 catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 3960
 ccccagtgct gcaatgatac cgcgagacct acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 4020
 aaaccagcca gccggaaggc ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 4080
 ccagtctatt aattggtgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 4140
 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcaogc tcgtcgtttg gtatggcttc 4200
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 4260
 agcggtagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 4320
 actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgcatccg taagatgctt 4380
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 4440
 ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 4500
 gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 4560
 atccagttcg atgtaacca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 4620
 cagcgtttct gggtagcaaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 4680

ES 2 651 313 T3

gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 4740
 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 4800
 ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 4860
 gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcgggtga 4920
 tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 4980
 ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 5040
 ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccaag cttccaattt 5100
 taggcccccc actgaccgag gtctgtcgat aatccacttt tccattgatt ttccaggttt 5160
 cgttaactca tgccactgag caaaacttcg gtctttccta acaaagctc tcctcacaaa 5220
 gcatggcgcg gcaacggacg tgtcctcata ctccactgcc acacaaggtc gataaactaa 5280
 gctcctcaca aatagaggag aattccactg acaactgaaa acaatgtatg agagacgatc 5340
 accactggag cggcgcggcg gttgggcgcg gaggtcggca gcaaaaaca gcgactcgcc 5400
 gagcaaaccc gaatcagcct tcagacggtc gtgcctaaca acacgccgtt ctaccccgcc 5460
 ttcttcgcgc cccttcgctt ccaagcatcc ttcaagtta tctctctagt tcaacttcaa 5520
 gaagaacaac accaccaaca ccatgatgcc tttgtctcaa gaagaatcca ccctcattga 5580
 aagagcaacg gctacaatca acagcatccc catctctgaa gactacagcg tcgccagcgc 5640
 agctctctct agcagcggcc gcatcttcac tgggttcaat gtatatcatt ttactggggg 5700
 accttgtgca gaactcgtgg tgctgggcac tgctgctgct gcggcagctg gcaacctgac 5760
 ttgtatcgtc gcgatcggaa atgagaacag gggcatcttg agcccctgtg gacggtgccg 5820
 acaggtgctt ctgatctgc atcctgggat caaagccata gtgaaggaca gtgatggaca 5880
 gccgacggca gttgggattc gtgaattgct gccctctggt tatgtgtggg agggctaaca 5940
 cgtgctccgt gctacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg 6000
 gaatogtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cgggatctc atgctggagt 6060
 tcttcgocca ccccaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca 6120
 tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggg ttgtccaac 6180
 tcatcaatgt atcttatcat gtctgaattc ccgggttac 6219

<210> 14
 <211> 10029
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> vector pCL0130

<400> 14

ctcttatctg cctcgcgcgc ttgaccgcgc cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc 60

ES 2 651 313 T3

tgcctcgctc	gcgcaggcgg	gcgggcgagt	gggtgggtcc	gcagccttcc	gcgctcgccc	120
gctagctcgc	tgcgcccgtg	ctgcagccag	cagggcagca	ccgcacggca	ggcaggtccc	180
ggcgcggatc	gatcgatcca	tcgatccatc	gatccatcga	tcgtgcggtc	aaaaagaaag	240
gaagaagaaa	ggaaaaagaa	aggcgtgcg	acccgagtgc	gcgctgagcg	cccgctcgcg	300
gtcccgcgga	gcctccgctg	tagtccccgc	cccgcgccc	gcagtcccc	gggagggcatc	360
gcgcacctct	cgccgcccc	tcgcgccctc	ccgattcccc	gcctccccctt	ttccgcttct	420
tcgcccctc	cgctcgcggc	cgcgtcgccc	gcgccccgct	ccctatctgc	tccccagggg	480
ggcactccgc	accttttgcg	cccgctgccc	ccgcgcgggc	cgcccccgcc	ccctggtttc	540
ccccgcgagc	gcggccgctg	cgccgcgcaa	agactcgccg	cgtgccgccc	cgagcaacgg	600
gtggcggcgg	cgcgggcgcg	ggcggggcgc	ggcggcgcgt	aggcggggct	aggcggccggc	660
taggcgaaac	gccgcccccg	ggcgccgccc	ccgcccgcctc	cagagcagtc	gccgcgccag	720
accgccaacg	cagagaccga	gaccgaggta	cgctcgcccc	gagcacgccc	cgacgcgcgg	780
cagggacgag	gagcacgacg	ccgcgcccgc	ccgcgcgggg	ggggggaggg	agagggcagga	840
cgcgggagcg	agcgtgcatg	tttccgcgcg	agacgacgcc	gcgcgcgctg	gagaggagat	900
aaggcgcttg	gatcgcgaga	ggccagcca	ggctggaggc	gaaaatgggt	ggagaggata	960
gtatcttgcg	tgcttgagcg	aggagactga	cgaggaggac	ggatacgtcg	atgatgatgt	1020
gcacagagaa	gaagcagttc	gaaagcgact	actagcaagc	aagggatcca	tgggcctcga	1080
ggataaccgc	atgggtaagc	gctttgtcaa	cgtagggcag	aagaaggccc	gtagcaccgc	1140
catggccatc	attggtggcc	tcttcgcggc	ctcgggcggc	gtcctcttcg	gctacgacac	1200
cggcactatc	tcgggctca	tgactatgga	ctacgttctc	gcccgtacc	cctccaacia	1260
gcactccttc	accgctgacg	agtcgtcgct	catcgtttcc	attctttcgg	tgggcacctt	1320
cttcggcgcc	ctctgcgccc	cgttcctcaa	cgataccctc	ggccgcccgt	ggtgcctcat	1380
cctcagcgcc	ctcattgtct	ttaacatcgg	cgccatcctc	caggtcattt	ccaccgcat	1440
ccccctgctc	tcgcgggggc	gcgttatcgc	cggtttcggg	gtcggcctca	tttccgccac	1500
catcccgcctc	taccagtccg	agactgctcc	gaagtggatt	cgcgggcgcca	tcgtttcctg	1560
ctaccagtgg	gccatcacta	tcggactttt	cctcgcttcc	tcggtcaaca	agggcaccga	1620
gcacatgacc	aactccggtt	cgtaccgtat	tcctctggcc	atccagtgcc	tctggggcct	1680
catccttggg	attggcatga	ttttcctccc	tgagaccccc	cgcttctgga	tttccaaggg	1740
caaccaggag	aaggccgccc	agtcctcgc	ccgtctccgc	aagctcccc	tcgaccatcc	1800
tgatagcctt	gaggagcttc	gcgatattac	tgccgcctac	gagttcgaga	ccgtctacgg	1860
taagtccagc	tggtcccagg	tcttttccca	caagaacat	cagctcaagc	gcctctttac	1920
cggcggtgcc	attcaggcct	ttcagcagct	caccggagtt	aactttatct	tttactacgg	1980
caccaccttt	tttaagcgcg	ccggagtcaa	cggattcacc	atcagccttg	ccaccaacat	2040

ES 2 651 313 T3

cgtaaacgtc ggcagcacta ttcccggcat tcttctcatg gaggtcctcg gccgccgcaa 2100
 catgctcatg ggcggtgcca ccggcatgtc gctgtcgcag ottatcgtcg ccattgtcgg 2160
 agttgccacg tccgagaaca acaagtcgag ccagtcggtc ctcgtcgctt tctcgtgcat 2220
 ctttatcgct ttttttgccg ccacctgggg tccctgcgcc tgggtcgtcg tcggcgagct 2280
 ctttcccctt cgcactcgcg ctaagtcctt ttccctctgc accgcgtcca actggctctg 2340
 gaactggggc attgcttacg ccacccccta catggtcgac gaggataagg gtaacctcgg 2400
 cagcaacgct ttttttattt ggggaggctt caacctcgtc tgcgtctttt tcgcgtggta 2460
 cttcatttac gagaccaagg gcctttccct cgagcaggct gatgagctct acgagcatgt 2520
 ttcgaaggcg tggaagtcca agggttttgt cccgtccaag cactcctttc gcgagcaggt 2580
 cgaccagcag atggactcca agaccgaggc cattatgagc gaggaggcgt cggtttaaca 2640
 tatgagttat gagatccgaa agtgaacctt gtcctaaccg gacagcgaat ggcgggaggg 2700
 ggcgggctaa aagatcgtat tacatagtat ttttccccta ctctttgtgt ttgtcttttt 2760
 ttttttttg aacgcattca agccacttgt ctgggtttac ttgtttgttt gcttgcttgc 2820
 ttgcttgctt gcctgcttct tggtcagacg gcccaaaaaa gggaaaaaat tcattcatgg 2880
 cacagataag aaaaagaaaa agtttgtcga ccaccgtcat cagaaagcaa gagaagagaa 2940
 aactcgcgc tcacattctc gctcgcgtaa gaatcttagc cacgcatacg aagtaatttg 3000
 tccatctggc gaatctttac atgagcgttt tcaagctgga gcgtgagatc atacctttct 3060
 tgatcgtaat gttccaacct tgcataggcc tcgttgcgat ccgctagcaa tgcgtcgtac 3120
 tcccgttgca actgcgccat cgcctcattg tgacgtgagt tcagattctt ctcgagacct 3180
 tcgagcgtg ctaatttcgc ctgacgctcc ttcttttggt cttccatgac acgccgcttc 3240
 accgtgcgtt ccacttcttc ctgagacatg cccttggtg cctcgacctg ctcggtaaaa 3300
 cgggccccag cacgtgctac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg 3360
 cttcggaatc gttttccggg acgccggctg gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct 3420
 ggagttcttc gcccaacca acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa 3480
 tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgc 3540
 caaactcatc aatgtatctt atcatacatg gtcgacctgc aggaacctgc attaatgaat 3600
 cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt cctcgtcac 3660
 tgactcgtg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcgg 3720
 aatacggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca 3780
 gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgcc 3840
 ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact 3900
 ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacct 3960

ES 2 651 313 T3

gccgcttacc ggataacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag 4020
 ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca 4080
 cgaaccccc gttcagcccc accgctgcbc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa 4140
 cccggttaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc 4200
 gaggtatgta ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag 4260
 aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg 4320
 tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca 4380
 gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggctc 4440
 tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag 4500
 gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata 4560
 tgagtaaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat 4620
 ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg 4680
 ggagggctta ccatctggcc ccagtgtctc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc 4740
 tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc 4800
 aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc 4860
 gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc 4920
 gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc 4980
 ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa 5040
 gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat 5100
 gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata 5160
 gtgtatcggg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca 5220
 tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag 5280
 gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc 5340
 agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc 5400
 aaaaaagga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata 5460
 ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcggg tacatatttg aatgtattta 5520
 gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta 5580
 agaaaccatt attatcatga cattaacctc taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg 5640
 tctcgcgcgt ttcgggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggg 5700
 cacagcttgt ctgtaagcgg atgcogggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg 5760
 tgttgccggg tgtcggggct ggcttaacta tgccgcatca gagcagattg tactgagagt 5820
 gcaccaagct ttgcctcaac gcaactaggc ccagccctac tttcactgtg tcttgtcttg 5880
 ctttcacac cgaccgagtg tgcacaaccg tgttttgca aaagcgcaag atgctcactc 5940

ES 2 651 313 T3

gactgtgaag caaaggttgc gcgcaagcga ctgcgactgc gaggatgagg atgactggca 6000
gcctgttcaa aaactgaaaa tccgcatggg gtcagctgcc attcgcgcat gacgcctgcg 6060
agagacaagt taactcgtgt cactggcatg tcctagcatc tttacgagag caaaattcaa 6120
tcgctttatt ttttcagttt cgtaaccttc tcgcaaccgc gaatcgccgt ttcagcctga 6180
ctaactctgca gctgctggc actgtcagtc agtcagtcag tcgtgctgag tgttccagca 6240
ccgaggtcgc gcgtgcgccc gcctggaccg ctgctgctac tgctagtggc acggcaggtg 6300
ggagcttgtt gccggaacac cagcagccgc cagtcgacgc cagccagggg aaagtccggc 6360
gtcgaagga gaggaaggcg gcgtgtgcaa actaacgttg accactggcg cccgccgaca 6420
cgagcaggaa gcagggcagc gcagagcgcg gcgcgcaagt gcagaatgag cgaaagatcc 6480
acttgcgccc ggcgggcccg cacttgcggg cgcggcggcg aacagtgcgg aaaggagcgg 6540
tgcagacggc gcgcagtgac agtgggcccg aagccgcccg gtaagcagcg gcggggaacg 6600
gtatacgcag tgccgcccgc cgcgcccacac agaagtatac gcgggcccga gtggggcgtc 6660
gcgcgccgga agtgccggaat ggcgggcaag gaaaggagga gacggaaaaga gggcgggaaa 6720
gagagagaga gagagtgaaa aaagaaaaga agaaaagaag aaagaaaaga agctcggagc 6780
cacgccgccc ggagagagag aatgaaaagc acggcacggc aaagcaaacg aaagcagacc 6840
cagccagacc cagccgaggg aggagcggcg gcagaccggc cgcggcggag gagcagcac 6900
ggcgcgcccg cgagcggagc agcagcggcg cgagcggaca aggcttgctg cgagcagatc 6960
agcagcggag cgggaaggat gagcggcacc cgcgcccgca cgaggacagc gcgggcccgt 7020
tcctcggccc tgacgagccc tgtaaacgag cagcagcagc agcagctgag cgtaggcggc 7080
gcgtcggcac ggctggcccg cgcggcggtc tcgtcccgca cgggcccgga cgcggccaag 7140
aaggcggccc cggcggggg gttctccacg ggacggccc ccaacggcag acgagagaag 7200
agctcggctg ccacgggtcca ggcggcggag gacgatggcg gcttcgtcgg cctgaccggc 7260
gcccaaatct ttcagagct catgcccgag caccaggtgg acaccatctt tggctaccct 7320
ggcggcccga ttctgcccgt ttttgatgcc atttttgaga gtgacggcgt tcaagttcat 7380
tctcggctgc cacgagcagg gcgcccggca catggcccag ggctacggcg gcgccacggg 7440
caagcccggc gttgtcctcg tcacctcggg ccctggagcc accaacacca tcaccccgat 7500
catggatgct tacatggagc gtacggcggc gctcgtgttc accggccagg tgcagacctc 7560
tgctgtcggc acggacgctt tccaggagtg tgacattggt ggcatcagcc gcgctgcac 7620
caagtggaac gtcaggttca aggacgtgaa ggagctcccg cgcggcatca atgagccctt 7680
tgagattgcc atgagcggcc gccggggtcc cgtgctcgtc gatcttccta aggatgtgac 7740
cgccgttgag ctcaaggaaa tgcccagcag cccccccag gttgctgtgc gccagaagca 7800
aaaggtcagc cttttccaca aggagcgcag tggcgtcctt ggcacggccc acttcaagct 7860

ES 2 651 313 T3

cattgccgag atgatcaacc gtgcggagcg acccgtcatc tatgctggcc aggggtgcat 7920
gcagagcccg ttgaatggcc cggctgtgct caaggagttc gcggagaagc ccaacattcc 7980
cgtgaccacc accatgcagg gtctcggcgg ctttgacgag cgtagtcccc tctccctcaa 8040
gatgctcggc atgcacggct ctgcctacgc caactactcg atgcagaacg ccgatcttat 8100
cctggcgcctc ggtgcccgct ttgatgatcg tgtgacgggc cgcgttgacg cctttgctcc 8160
ggaggctcgc cgtgccgagc gcgagggccg cggtggcata gttcactttg agatttcccc 8220
caagaacctc cacaaggtcg tccagcccac cgtcgcggtc ctccggcagc tggtcgagaa 8280
cctcgccaac gtcacgcccc acgtgcagcg ccaggagcgc gagccgtggt ttgcgcagat 8340
cgccgattgg aaggagaagc acccttttct gctcagatct gttgattcgg acgacaaggt 8400
tctcaagccg cagcaggtcc tcacggagct taacaagcag attctcagaa ttcaggagaa 8460
ggacgccgac caggaggtct acatcaccac gggcgtcggc agccaccaga tgcaggcagc 8520
gcagttcctt acctggacca agccgcgcca gtggatctcc tcgggtggcg ccggcactat 8580
gggctacggc cttccctcgg ccattggcgc caagattgcc aagcccgatg ctattgttat 8640
tgacatcgat ggtgatgctt cttattogat gaccggtatg gaattgatca cagcagccga 8700
attcaaggtt ggcgtgaaga ttcttctttt gcagaacaac tttcagggca tggtaagaa 8760
cgttcaggat ctcttttacg acaagcgcta ctccggccac cgccatgttc aaccgcgct 8820
tcgacaaggt cgccgatgcg atgcgtgcc aaggctctca ctgcgcgaaa cagtcggagc 8880
tcaaggacaa gatcaaggag tttctogagt acgatgaggg tcccgtctc ctogaggttt 8940
tcgtggacaa ggacacgctc gtcttgccca tggccccgc tggctttccg ctccacgaga 9000
tggctctcga gcctcctaag cccaaggacg cctaagttct tttttccatg gcgggagc 9060
gagcgagcgc gcgagcgcgc aagtgcgcaa gcgccttgc ttgctttgct tcgcttcgct 9120
ttgctttgct tcacacaacc taagtatgaa ttcaagtttt cttgcttgc ggcgatgcct 9180
gcctgccaac cagccagcca tccggccggc cgtccttgac gccttcgctt ccggcgcggc 9240
catcgattca attcaccat ccgatacgtt ccgccccctc acgtccgtct gcgcacgacc 9300
cctgcacgac cacgccaagg ccaacgcgcc gctcagctca gcttgcgac gagtcgcacg 9360
tcacatatct cagatgcatt tggactgtga gtgttattat gccactagca cgcaacgatc 9420
ttcggggctc tcgctcattg catccgttcg ggccctgcag gcgtggacgc gagtcgccgc 9480
cgagacgctg cagcaggccg ctccgacgcg agggctcgag ctccgccgc ccgcgcgatg 9540
tctgcctggc gccgactgat ctctggagcg caaggaagac acggcgacgc gaggaggacc 9600
gaagagagac gctggggtat gcaggatata cccggggcgg gacattcgtt ccgcatacac 9660
tccccattc gagcttgctc gtcttgcca gagccgagcg cgaacggttc cgaacgcggc 9720
aaggattttg gctctggtgg gtggactccg atcgaggcgc aggttctccg caggttctcg 9780
caggccggca gtggtcgta gaaatagga gtgccggagt cttgacgcgc cttagctcac 9840

ES 2 651 313 T3

```
tctccgcca cgcgcgcac gccgccatgc cgccgtcccg tctgtcgctg cgctggccgc 9900
gaccggctgc gccagagtac gacagtggga cagagctcga ggcgacgcga atcgctcggg 9960
ttgtaagggt ttcaagggtc gggcgtcgtc gcgtgccaaa gtgaaaatag tagggggggg 10020
gggggggtac 10029
```

<210> 15
<211> 9972
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> vector pCL0131

<400> 15

ES 2 651 313 T3

ctcttatctg cctcgcgccg ttgaccgccg cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc	60
tgcctcgctc gcgcagggcg gcgggcgagt gggtaggtcc gcagccttcc gcgctcgccc	120
gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc	180
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag	240
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgctc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg	300
gtcccgcgga gcctccgct tagtccccgc cccgcgccgc gcagtcccc gggaggcatc	360
gcgcacctct cgcgccccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct	420
tcgcgcctc cgctcgcggc cgcgtcgccc gcgccccgct ccctatctgc tccccagggg	480
ggcactccgc accttttgcg cccgctgccg ccgcccggc cgcgccgccg ccctggtttc	540
ccccgcgagc gcggcccgct cgcgcgcaa agactcgccg cgtgccgcc cgcgcaacgg	600
gtggcggcgg cgcggcggcg ggcggggcgc ggcggcgcgt aggcggggct aggcgccggc	660
taggcgaaac gccgcccccg ggcgccgccg ccgcccgctc cagagcagtc gccgcgccag	720
accgccaacg cagagaccga gaccgaggtc cgtcgcgcc gagcacgcc cgcgcgcgg	780
cagggacgag gagcacgacg ccgcgcccg ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga	840
cgcgggagcg agcgtgcatg tttccgcgcg agacgacgcc gcgcgcgctg gagaggagat	900
aaggcgttg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata	960
gtatcttgcg tgcttgacg aggagactga cgaggaggac ggatacgtc atgatgatgt	1020
gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgact actagcaagc aagggatcca tggccctcga	1080
ccctgagcag cagcagccca tttcctccgt gtcgcgcgag tttggtaagt cgtccggtga	1140
gatctcccc gagcgtgagc ctctcattaa ggagaaccac gtccccgaga actactccgt	1200
tgttgccgcc atcctcccct tcctcttccc ggccctgggt ggctccttt acggttacga	1260
gattggcgct acgtcgtgcg ctacgatttc ccttcagtcc ccctccctct ccggcatctc	1320
ctggtacaac ctctcctccg tcgatgttg cctcgtcact tccggttccc tctacggtgc	1380

ES 2 651 313 T3

tctgtttggc tccattgttg ccttcacccat tgccgacggt attggccgct gcaaggagct 1440
tatacctcgt gctctcctct acctcgtcgg tgccctcgtt accgctctcg cccctacgta 1500
ctccgttctc atcatcggcc gtgtcattta cgggttttcc gtcggtcttg ccatgcatgc 1560
tgcccctatg tacatcgcgg agaccgcccc gtcccccatc cgcggccagc tcgtttccct 1620
caaggagttt ttcacggttc tcggtatggt cggcggatac ggcattggtt ccctcaccgt 1680
caacgtccac tccggttggc gctacatgta cgctacctcc gttcccctcg ctgtgatcat 1740
gggcattggc atgtggtggc ttctgcctc cccccgttgg ctctcctcc gcgtcattca 1800
gggtaagggt aacggtgaga accagcgcga ggctgccatt aagtccctct gctgcctccg 1860
tggtcctgcc ttcgtcgact cggccgccga gcaggtcaac gagattctcg ccgagcttac 1920
cttcggttggc gaggataagg aggtcacctt cggcgcgctc ttccagggaa agtgcctcaa 1980
ggccctcatt atcggcggcg gccttgttct ctttcagcag atcaccggtc agccttcggt 2040
ccttactac gccccctcga tcctccagac tgccggcttc tccgccgccg gcgatgctac 2100
ccgcgtttcc attcttctcg gcctcctcaa gctcattatg accggtgtcg ccgtcgtcgt 2160
tatcgatcgt ctccggcgtc gccctctcct cctcggcggg gtcggtggtg tggttgtttc 2220
gctctttctc cttggctcgt actacctttt cttcagcgtc tccccctcg tcgccgttgt 2280
cgccctcctt ctctacgtgg gttgctacca gctctccttt ggccccattg gctggcttat 2340
gatttccgag atttttcccc tcaagctccg tggtcgcgga ctctcccttg ccgtgcttgt 2400
caactttggt gccaacgccc tcgtcaoctt tgccctttcc cctctcaagg agctcctcgg 2460
cgccggcatc ctgttttgcg gctttggcgt tatctcgcgt ctctcccttg ttttatctt 2520
ttttatcgtc ccggagacta agggcctcac gctcgcggag atcgcggcga agtgcctcta 2580
acatatgagt tatgagatcc gaaagtgaac cttgtcctaa cccgacagcg aatggcggga 2640
gggggcgggc taaaagatcg tattacatag tatttttccc ctactctttg tgtttgtctt 2700
tttttttttt ttgaacgcat tcaagccact tgtctggggt tacttgtttg tttgcttgc 2760
tgcttgcttg cttgcctgct tcttggtcag acggcccaaa aaagggaata aattcattca 2820
tggcacagat aagaaaaaga aaaagtttgt cgaccaccgt catcagaaag caagagaaga 2880
gaaacactcg cgctcacatt ctgcctcgcg taagaatctt agccacgcat acgaagtaat 2940
ttgtccatct ggcgaaatctt tacatgagcg ttttcaagct ggagcgtgag atcatacctt 3000
tcttgatcgt aatgttccaa ccttgcatag gcctcgttgc gatccgctag caatgcgtcg 3060
tactcccgtt gcaactgccc catcgcctca ttgtgacgtg agttcagatt cttctcgaga 3120
ccttcgagcg ctgctaattt cgctgacgc tccttctttt gtgcttccat gacacgccgc 3180
ttcacctgct gttccacttc ttctcagac atgcccttgg ctgcctcgac ctgctcggta 3240
aaacgggccc cagcacgtgc tacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaagggt 3300
gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat 3360

ES 2 651 313 T3

gctggagttc ttcgcccacc ccaacttggt tattgcagct tataatgggt acaaataaag 3420
caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggttt 3480
gtccaaactc atcaatgtat cttatcatac atggtcgacc tgcaggaacc tgcattaatg 3540
aatcgcccaa cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct 3600
cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc 3660
ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 3720
ccagcaaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 3780
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtacg aggtggcgaa acccgacagg 3840
actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagtcacctc gtgcgctctc ctgttccgac 3900
cctgccgctt accggatacc tgtccgctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca 3960
tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 4020
gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 4080
caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 4140
agcgaggtat gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 4200
tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 4260
tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa 4320
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 4380
gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggatcatga gattatcaaa 4440
aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 4500
atatgagtaa acttggctctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 4560
gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat 4620
acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc 4680
ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgttcc 4740
tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag 4800
ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgtcacg 4860
ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 4920
atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttcgggt cctccgatcg ttgtcagaag 4980
taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 5040
catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga 5100
atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca atacgggata ataccgcgcc 5160
acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc 5220
aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc 5280

ES 2 651 313 T3

ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc 5340
 cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca 5400
 atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat 5460
 ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt 5520
 ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaaat aggcgtatca cgaggccctt 5580
 tcgtctcgcg cgtttcggtg atgacggtga aaacctctga cacatgcagc tcccggagac 5640
 ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc 5700
 ggggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatcgggca tcagagcaga ttgtactgag 5760
 agtgcaccaa gctttgcctc aacgcaacta ggcccaggcc tactttcact gtgtcttgtc 5820
 ttgcctttca caccgaccga gtgtgcacaa ccgtgttttg caciaagcgc aagatgctca 5880
 ctcgactgtg aagcaaaggt tgcgcgcaag cgactcgcac tgcgaggatg aggatgactg 5940
 gcagcctgtt caaaaactga aatccgcga tgggtcagct gccattcgcg catgacgcct 6000
 gcgagagaca agttaactcg tgtcactggc atgtcctagc atctttacgc gagcaaaatt 6060
 caatcgcttt attttttcag tttogtaacc ttctcgcaac cgcaatcgc cgtttcagcc 6120
 tgactaatct gcagctgctt ggcactgtca gtcagtcagt cagtcgtgcg cgctgttcca 6180
 gcaccgaggt cgcgcgtcgc cgcgcctgga ccgctgctgc tactgctagt ggcacggcag 6240
 gtaggagctt gttgccgga caccagcagc cgccagtcga cgccagccag gggaaagtcc 6300
 ggcgtcgaag ggagaggaag gcggcgtgtg caaactaacg ttgaccactg gcgcccgcg 6360
 acacgagcag gaagcaggca gctgcagagc gcagcgcgca agtgcagaat gcgcaaaga 6420
 tccacttgcg cgcggcgggc gcgcacttgc gggcgcggcg cggaacagtg cggaaaggag 6480
 cgggtcagac ggcgcgcagt gacagtgggc gcaaagccgc gcagtaagca gcggcgggga 6540
 acggtatacg cagtgccgcg ggccgcgcga cacagaagta tacgcgggcc gaagtggggc 6600
 gtcgcgcgcg ggaagtgcgg aatggcgggc aaggaaagga ggagacgga agagggcggg 6660
 aaagagagag agagagagtg aaaaaagaaa gaaagaaaga aagaaagaaa gaaagctcgg 6720
 agccacgccg cggggagaga gagaaatgaa agcacggcac ggcaaagcaa agcaaagcag 6780
 acccagccag acccagccga gggaggagcg cgcgcaggac ccgcgcgcg agcgagcgag 6840
 cacggcgcgc gagcgagcga gcgagcgagc gcgcgagcga gcaaggcttg ctgagcga 6900
 tcgagcgagc gagcgggaag gatgagcgcg acccgcgcg cgacgaggac agcggcggcg 6960
 ctgtcctcgg cgctgacgac gcctgtaaag cagcagcagc agcagcagct gcgctaggc 7020
 gcggcgtcgg cacggctggc ggccgcggcg ttctcgtccg gcacgggcgg agacgcggcc 7080
 aagaaggcgg ccgcgcgag ggcgttctcc acgggacgcg gccccaacgc gacacgcgag 7140
 aagagctcgc tggccacggc ccaggcggcg acggacgatg cgcgcttcgt cggcctgacc 7200
 ggcgccaaa tctttcatga gctcatgcbc gagcaccagg tggacaccat ctttggctac 7260

ES 2 651 313 T3

cctggcggcg ccattctgcc cgtttttgat gccatthtttg agagtgcgcg gcttcaagtt 7320
cattctcgct cgccacgagc agggcgccgg ccacatggcc gagggctacg cgcgcgccac 7380
gggcaagccc ggcgttgacc tcgtcacctc gggccctgga gccaccaaca ccatcacccc 7440
gatcatggat gottacatgg acggtacgcc gctgctcgtg ttcaccggcc aggtgcagac 7500
ctctgctgtc ggcacggacg ctttccagga gtgtgacatt gttggcatca gccgcgctg 7560
caccaagtgg aacgtcatgg tcaaggacgt gaaggagctc ccgcgccgca tcaatgaggc 7620
ctttgagatt gccatgagcg gccgcccggg tcccgtgctc gtcgatcttc ctaaggatgt 7680
gaccgccgtt gagctcaagg aatgcccga cagctcccc caggttgctg tgcgccagaa 7740
gcaaaaagtc gagcttttcc acaaggagcg cattggcgct cctggcacgg ccgacttcaa 7800
gctcattgcc gagatgatca accgtgcgga gcgaccctc atctatgctg gccagggtgt 7860
catgcagagc ccgttgaatg gcccggtctg gctcaaggag ttcgcggaga aggccaacat 7920
tcccgtgacc accaccatgc aggtctcgg cggtttgac gagcgtagtc ccctctccct 7980
caagatgctc ggcattgcac gctctgccta cgccaactac tcgatgcaga acgccgatct 8040
tatcctggcg ctcggtgcc gctttgatga tcgtgtgacg ggccgcgctt acgcctttgc 8100
tccggaggct cgcctgccc agcgcgaggg ccgcggtggc atcgttcact ttgagatttc 8160
ccccagaac ctccacaagg tcgtccagcc caccgtcgcg gtcctcggcg acgtggtcga 8220
gaacctcgcc aacgtcacgc ccacgtgca gcgccaggag cgcgagccgt ggtttgcgca 8280
gatcgccgat tggaaggaga agcaccctt tctgctcgag tctggtgatt cggacgacaa 8340
ggttctcaag ccgcagcagc tcctcacgga gcttaacaag cagattctcg agattcagga 8400
gaaggacgcc gaccaggagg tctacatcac cacgggcgctc ggaagccacc agatgcaggc 8460
agcgcagttc cttacctgga ccaagccgcg ccagtggatc tcctcgggtg gcgcccgcac 8520
tatgggctac ggccttccct cggccattgg cgccaagatt gccaaagccc atgctattgt 8580
tattgacatc gatggtgatg cttcttattc gatgaccggt atggaattga tcacagcagc 8640
cgaattcaag gttggcgtga agattcttct tttgcagaac aactttcagg gcatggtcaa 8700
gaacgttcag gatctctttt acgacaagcg ctactogggc caccgccatg ttcaaccgca 8760
gcttcgacaa ggtcgccgat gcgatgcgtg ccaagggctc ctactgcgcg aacagtcgg 8820
agctcaagga caagatcaag gagtttctcg agtacgatga gggccccgct ctccctgagg 8880
ttttcgtgga caaggacacg ctcgtcttgc ccattggtccc cgctggcttt ccgctccacg 8940
agatggtcct cgagcctcct aagcccgaag acgcctaagt tcttttttcc atggcggggcg 9000
agcgcgagcgc gcgcgcgagc gcgaagtgcg caagcgcctt gccttgcttt gcttcgcttc 9060
gctttgcttt gcttcacaca acctaagtat gaattcaagt tttcttgctt gtcggcgatg 9120
cctgcctgcc aaccagccag ccatccggcc ggccgtcctt gacgccttcg cttccggcgc 9180

ES 2 651 313 T3

```

ggccatogat tcaattcacc catccgatac gttccgcccc ctcacgtccg tctgcgcacg      9240
accocctgcac gaccacgcca aggccaacgc gccgctcagc tcagcttgtc gacgagtcgc      9300
acgtcacata tctcagatgc atttgactg tgagtgttat tatgccacta gcacgcaacg      9360
atcttcgggg tcctcgctca ttgcatccgt tcgggccctg caggcgtgga cgcgagtcgc      9420
cgccgagacg ctgcagcagg ccgctccgac gcgagggctc gagctcgccg cgcccgcgcg      9480
atgtctgcct ggcgccgact gatctctgga gcgcaaggaa gacacggcga cgcgaggagg      9540
accgaagaga gacgctgggg tatgcaggat ataccggggg cgggacattc gttccgcata      9600
cactcccca ttcgagcttg ctcgctcctg gcagagccga gcgccaacgg ttccgaacgc      9660
ggcaaggatt ttggctctgg tgggtggact ccgatcgagg cgcaggttct ccgaggttc      9720
tcgcaggccg gcagtggtcg ttagaaatag ggagtgccgg agtcttgacg cgccttagct      9780
cactctccgc ccacgcgcgc atcggcccca tgccgccgtc ccgtctgtcg ctgcgctggc      9840
cgcgaccggc tgcgccagag tacgacagtg ggacagagct cgaggcgacg cgaatcgctc      9900
gggttgtaag ggtttcaagg gtcgggcgtc gtcgcgtgcc aaagtgaaaa tagtaggggg      9960
gggggggggt ac                                                                9972

```

<210> 16
<211> 6634
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> vector pCL0132

10

<400> 16

ES 2 651 313 T3

ctcttatctg cctcgcgccg ttgaccgccg cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc	60
tgcctcgctc gcgcagggcg gcggggcagc gggcgggtcc gcagccttcc gcgctcgccc	120
gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc	180
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag	240
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgcgc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg	300
gtcccgcgga gcctccgcgt tagtccccgc cccgcgccgc gcagtcccc gggaggcatc	360
gcgcacctct cgccgcccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct	420
tcgcccctc cgctcgcggc cgcgtcgccc gcgccccgct ccctatctgc tccccagggg	480
ggcactccgc accttttgcg cccgctgccg ccgcgcgggc cgcgccgccg ccctggtttc	540
ccccgcgagc gcggccgcgt cgccgcgcaa agactcgccg cgtgccgcc cgcagcaacgg	600
gtggcggcgg cgcgggcgcg ggcggggcgc ggcggcgcgt aggcggggct aggcgccggc	660
taggcgaaac gccgcccccg ggcgcgcccg ccgcccgctc cagagcagtc gccgcgccag	720
accgccaacg cagagaccga gaccgaggtc cgtcgcgcc gagcacgcc cgacgcgcgg	780
cagggacgag gagcacgacg ccgcgccgcg ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga	840

ES 2 651 313 T3

cgcgggagcg	agcgtgcatg	tttccgcgcg	agacgacgcc	gcgcgcgctg	gagaggagat	900
aaggcgcttg	gatcgcgaga	gggccagcca	ggctggaggc	gaaaatgggt	ggagaggata	960
gtatcttgcg	tgcttgagcg	aggagactga	cgaggaggac	ggatacgtcg	atgatgatgt	1020
gcacagagaa	gaagcagttc	gaaagcgact	actagcaagc	aagggatcca	tggctaagga	1080
gtacttcccc	cagatccaga	agattaagtt	cgagggtaag	gacagcaaga	acccgctcgc	1140
ctttcattac	tacgacgccg	agaaggaggt	gatgggcaag	aagatgaagg	actggcttcg	1200
ctttgctatg	gcttggtggc	acactctctg	cgctgagggc	gcgaccagt	ttggcgcgcg	1260
tacgaagagc	tttccgtgga	acgagggcac	tgacgctatt	gagattgcta	agcagaaggt	1320
tgacgctggt	ttcgagatta	tgcagaagct	cggtattccg	tactactgct	ttcacgatgt	1380
cgacctcgtt	tccgagggca	actcgatcga	ggagtacgag	togaacctca	aggctgtggt	1440
tgacctacctc	aaggagaagc	agaaggagac	cggaatcaag	ctcctctgga	gcaccgccaa	1500
cgttttcggc	cacaagcgct	acatgaacgg	cgctccacc	aacctgact	tcgatgttgt	1560
tgcccgcgct	attgtccaga	ttaagaacgc	catcgacgct	ggtatcgagc	tcggagccga	1620
gaactacgtt	ttttggggcg	gacgcgaggg	ttacatgtcc	ctcctcaaca	ccgaccagaa	1680
gcgtgagaag	gagcacatgg	ccactatgct	tacatggcc	cgcgactacg	cccgcagcaa	1740
gggttttaag	ggtacttttc	tcattgagcc	gaagccatg	gagccgacca	agcaccagta	1800
cgacgtcgac	accgagaccg	ccattggctt	ccttaaggcc	cacaaccttg	acaaggattt	1860
taaggtgaac	atcgaggtta	accacgctac	gcttgccggc	cacaccttg	agcatgagct	1920
cgctgcgct	gttgacgccg	gaatgcttgg	ttccattgac	gccaaccgcg	gcgactacca	1980
gaacggctgg	gacaccgacc	agtttccgat	tgaccagtac	gagctcgtcc	aggcctggat	2040
ggagatcatc	cgtaggtggag	gctttgttac	cggtggtacg	aacttcgacg	ccaagacgcg	2100
ccgtaacagc	acggacctcg	aggacatcat	cattgctcat	gtgtcgggca	tggacgccat	2160
ggctcgcgcc	cttgagaacg	ctgctaagct	cctccaggag	agcccctaca	cgaagatgaa	2220
gaaggagcgc	tacgcgtcgt	ttgacagcgg	aatcgtaag	gacttcgagg	atggcaagct	2280
caccttgag	caggtgtaag	agtacggtaa	gaagaacggc	gagccgaagc	agaccagcgg	2340
caagcaggag	ctctacgagg	ccattgtcgc	catgtaccag	tagcatatga	gttatgagat	2400
ccgaaagtga	accttgtcct	aacctgacag	cgaatggcgg	gagggggcgg	gctaaaagat	2460
cgtattacat	agtatTTTTc	ccctactctt	tgtgtttgtc	TTTTTTTTT	TTTTgaacgc	2520
attcaagcca	cttgtctggg	tttacttgtt	tgtttgtctg	cttgtctgct	tgcttgctcg	2580
cttcttggtc	agacggccca	aaaaaggaa	aaaattcatt	catggcacag	ataagaaaa	2640
gaaaaagtgt	gtcgaccacc	gtcatcagaa	agcaagagaa	gagaaacact	cgcgctcaca	2700
ttctcgctcg	cgtaagaatc	ttagccacgc	atacgaagta	atttgtccat	ctggcgaatc	2760

ES 2 651 313 T3

ttacatgag cgttttcaag ctggagcgtg agatcatacc tttcttgatc gtaatgttcc 2820
 aaccttgcat aggcctcgtt gcgatccgct agcaatgcgt cgtactcccg ttgcaactgc 2880
 gccatcgctt cattgtgacg tgagttcaga ttcttctoga gaccttcgag cgctgctaata 2940
 ttgcctgac gctccttctt ttgtgcttcc atgacacgcc gcttcaccgt gcgttccact 3000
 tcttcctcag acatgccctt ggctgcctcg acctgctcgg taaaacgggc cccagcacgt 3060
 gctacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 3120
 ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgccc 3180
 ccccaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt 3240
 cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt 3300
 atcttatcat acatggtcga cctgcaggaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgctgg 3360
 gagaggcgtt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctog ctactgact cgctgcgctc 3420
 ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaaag gcgtaatac ggttatccac 3480
 agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 3540
 ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca 3600
 caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc 3660
 gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata 3720
 cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta 3780
 tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctcaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca 3840
 gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga 3900
 cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg 3960
 tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg 4020
 tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cgaaaaaga gttggtagct cttgatccgg 4080
 caaacaacc accgctggta gcggtggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 4140
 aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctcgcg ctcaagtggaa 4200
 cgaaaactca cgttaaggga ttttggctcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 4260
 ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc 4320
 tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc 4380
 atccatagtt goctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 4440
 tggccccagt gctgcaatga tacccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc 4500
 aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc 4560
 catccagtct attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 4620
 gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc 4680
 ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tgttgtgcaa 4740

ES 2 651 313 T3

aaaagcggtt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt 4800
 atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg 4860
 cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtga tgcggcgacc 4920
 gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa 4980
 agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 5040
 gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt 5100
 caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag 5160
 ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta 5220
 tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 5280
 aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat 5340
 catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg 5400
 tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta 5460
 agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg 5520
 gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc aagcttgagg 5580
 tctgtcgata atccactttt ccattgattt tccaggtttc gttaactcat gccactgagc 5640
 aaaacttcgg tctttcctaa caaaagctct cctcaciaag catggcgcgg caacggacgt 5700
 gtctcatac tccactgcca cacaaggctg ataaactaag ctctcacia atagaggaga 5760
 attccactga caactgaaaa caatgtatga gagacgatca ccactggagc ggcgcggcgg 5820
 ttgggcgcgg aggtcggcag caaaaacaag cgactcgcgg agcaaaccgg aatcagcctt 5880
 cagacggtcg tgcctaacia cacgccgttc taccgccct tcttcgcgcc ccttcgcgtc 5940
 caagcatcct tcaagtttat ctctctagtt caacttcaag aagaacaaca ccaccaacac 6000
 catggccaag ttgaccagtg ccgttccggg gctcaccgcg cgcgacgtcg ccggagcggg 6060
 cgagttctgg accgaccggc tcgggttctc ccgggacttc gtggaggacg acttcgccgg 6120
 tgtggtccgg gacgacgtga ccctgttcat cagcgcggtc caggaccagg tgggtccgga 6180
 caacaccctg gcctgggtgt ggggtgcgcg cctggacgag ctgtacgccg agtgggtcgg 6240
 ggtcgtgtcc acgaacttc gggacgcctc cgggccggcc atgaccgaga tcggcgagca 6300
 gccgtggggg cgggagttcg ccctgcgcga cccggccggc aactgcgtgc acttcgtggc 6360
 cgaggagcag gactgacacg tgctacgaga tttcgattcc accgccct tctatgaaag 6420
 gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atoctccagc gcggggatct 6480
 catgctggag ttcttogccc accccaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata 6540
 aagcaatagc atcaciaaatt tcaciaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgg 6600
 tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatcg gtac 6634

ES 2 651 313 T3

<210> 17
<211> 6277
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> vector pCL0133

10

<400> 17

ES 2 651 313 T3

ctcttatctg cctcgcgccg ttgaccgccg cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc 60
tgcctcgctc gcgcaggcgg gcgggagagt ggggtgggtcc gcagccttcc gcgctcgccc 120
gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc 180
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag 240
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgctc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg 300
gtcccgcgga gcctccgctg tagtccccgc cccgcgccgc gcagtcccc gggaggcatc 360
gcgcacctct cgccgcccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct 420
tcgccgcctc cgctcgcggc cgcgtcgccc gcgccccgct ccctatctgc tccccagggg 480
ggcactccgc accttttgcg cccgctgccg ccgcccgggc cgccccgccg ccctggtttc 540
ccccgcgagc gcggcccgct cgccgcgcaa agactcgccg cgtgccgcc cgagcaacgg 600
gtggcggcgg cgcgccggcg ggcggggcgc ggcggcgcgt aggcggggct aggcgccggc 660
taggcgaaac gccgcccccg ggcgccgccg ccgcccgctc cagagcagtc gccgcgccag 720
accgccaacg cagagaccga gaccgaggtc cgtcgcgcc gagcacgcc cgacgcgcgg 780
cagggacgag gagcacgacg ccgcgccgcg ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga 840
cgcgggagcg agcgtgcatg tttccgcgcg agacgacgcc gcgcgcgctg gagaggagat 900
aaggcgcttg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata 960
gtatcttgcg tgcttgacg aggagactga cgaggaggac ggatacgtc atgatgatgt 1020
gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgact actagcaagc aagggatcca tgccctccat 1080
taagctcaac tccggttacg atatgcccgc cgtcggtttt ggttgctgga aggtggacgt 1140
cgacacttgc tcggagcaga tttaccgcgc cattaagacc ggataccgcc tctttgacgg 1200
tgccgaggac tacgccaacg agaagctggt cggagccggc gtcaagaagg ccattgatga 1260
gggaattgtc aagcgcgagg acctctttct cacctccaag ctctggaaca actaccacca 1320
ccccgataac gtcgagaagg ctcttaaccg taccctcagc gatctccagg tcgactacgt 1380
cgatcttttt cttattcact tcctgtcac gttcaagttt gtccctcttg aggagaagta 1440
cccccccgga ttctactgcg gaaagggcga taactttgac tacgaggacg ttcctattct 1500
ggagacttgg aaggctctcg agaagctcgt caagccggc aagattcgca gcatcggcgt 1560
cagcaacttt cctggagctc tcctcctgga cctccttcgc ggagccacca tcaagccttc 1620
ggttcttcag gtcgagcacc atccttacct tcagcagccc cgtctcatcg agtttgccca 1680

ES 2 651 313 T3

gtcccgcggt	attgccgtca	cggcctacag	ctccttcggc	cctcagtcct	ttgtcgagct	1740
caaccagggt	cgcgcctta	acaccagccc	cctccttcgag	aacgagacca	ttaaggccat	1800
cgctgctaag	cacggtaagt	ccccgcCCA	ggtcctcctc	cgttggagct	cgcagcgcgg	1860
aatcgccatc	atcctaaga	gcaacaccgt	ccctcgcctt	cttgagaaca	aggatgtcaa	1920
ctccttcgac	ctcogatgagc	aggatttcgc	cgacattgcc	aagctcgata	ttaacctccg	1980
cttcaacgac	ccctgggact	gggataagat	ccctatcttt	gtctaacata	tgagttatga	2040
gatccgaaag	tgaaccttgt	cctaaccCGA	cagcgaatgg	cgggaggggg	cgggctaaaa	2100
gatcgtatta	catagtattt	ttcccctact	ctttgtgttt	gtcttttttt	tttttttgaa	2160
cgcattcaag	ccacttgtct	gggtttactt	gtttgtttgc	ttgcttgctt	gcttgcttgc	2220
ctgcttcttg	gtcagacggc	ccaaaaaagg	gaaaaaattc	attcatggca	cagataagaa	2280
aaagaaaaag	tttgtcgacc	accgtcatca	gaaagcaaga	gaagagaaac	actcgcgctc	2340
acattctcgc	tcgcgtaaga	atcttagcca	cgcatacga	gtaatttgtc	catctggcga	2400
atctttacat	gagcgttttc	aagctggagc	gtgagatcat	acctttcttg	atcgtaatgt	2460
tccaaccttg	cataggcctc	gttgcgatcc	gctagcaatg	cgctcgtactc	ccgttgcaac	2520
tgcgccatcg	cctcattgtg	acgtgagttc	agattcttct	cgagaccttc	gagcgtgct	2580
aatttcgcct	gacgctcctt	cttttgtgct	tccatgacac	gccgcttcac	cgtgcgttcc	2640
acttcttctc	cagacatgcc	cttggctgcc	tcgacctgct	cggtaaaacg	ggccccagca	2700
cgtgctacga	gatttcgatt	ccaccgccgc	cttctatgaa	aggttgggct	tcggaatcgt	2760
tttccgggac	gccggctgga	tgatcctcca	gcgcggggat	ctcatgctgg	agttcttcgc	2820
ccacccaac	ttgtttattg	cagcttataa	tggttacaaa	taaagcaata	gcatcacaaa	2880
tttcacaaat	aaagcatttt	tttactgca	ttctagttgt	ggtttgtcca	aactcatcaa	2940
tgtatcttat	catacatggg	cgacctgcag	gaacctgcat	taatgaatcg	gccaacgcgc	3000
ggggagaggc	ggtttgcgta	ttgggcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	actcgtgcg	3060
ctcggtcggt	cggctgcggc	gagcggatc	agctcactca	aaggcggtaa	tacggttatc	3120
cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	3180
gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	3240
tcacaaaaat	cgacgctcaa	gtcagaggtg	gcgaaaccCG	acaggactat	aaagatacca	3300
ggcgtttccc	cctggaagct	ccctcgtcgc	ctctcctggt	ccgaccctgc	cgcttaccgg	3360
atacctgtcc	gcctttctcc	cttcgggaag	cgtggcgctt	tctcatagct	cacgctgtag	3420
gtatctcagt	tcgggtgtagg	tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	aacccccgt	3480
tcagccccgac	cgctgogcct	tatccggtaa	ctatcgtctt	gagccaacc	cggtaagaca	3540
cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	ggtatgtagg	3600

ES 2 651 313 T3

cggtgctaca	gagttcttga	agtgggtggcc	taactacggc	tacactagaa	gaacagtatt	3660
tggtatctgc	gctctgctga	agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	3720
cggcaaacia	accaccgctg	gtagcgggtg	tttttttggt	tgcaagcagc	agattacgcg	3780
cagaaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	gatcttttct	acggggtctg	acgctcagtg	3840
gaacgaaaaac	tcacgttaag	ggattttggt	catgagatta	tcaaaaagga	tcttcaccta	3900
gatcctttta	aattaaat	gaagttttaa	atcaatctaa	agtatatatg	agtaaacttg	3960
gtctgacagt	taccaatgct	taatcagtga	ggcacctatc	tcagcgatct	gtctatttcg	4020
ttcatccata	gttgcctgac	tcccgcgtg	gtagataact	acgatacggg	agggcttacc	4080
atctggcccc	agtgctgcaa	tgataccgcg	agacccaogc	tcaccggctc	cagatttatc	4140
agcaataaac	cagccagccg	gaagggccga	gcgcagaagt	ggctctgcaa	ctttatccgc	4200
ctccatccag	tctattaatt	gttgccggga	agctagagta	agtagttcgc	cagttaatag	4260
tttgcgcaac	gttggtgcca	ttgctacagg	catcgtggtg	tcacgctcgt	cgtttggtat	4320
ggcttcattc	agctccggtt	cccaacgatc	aaggcgagtt	acatgatccc	ccatgttgtg	4380
caaaaaagcg	gtagctcct	tcggtcctcc	gatcgttgtc	agaagtaagt	tggccgcagt	4440
gttatcactc	atggttatgg	cagcactgca	taattctctt	actgtcatgc	catccgtaag	4500
atgcttttct	gtgactggtg	agtactcaac	caagtcattc	tgagaatagt	gtatgcggcg	4560
accgagttgc	tcttgcccgg	cgtcaatagc	ggataatacc	gcgccacata	gcagaacttt	4620
aaaagtgtc	atcattggaa	aacgttcttc	ggggcgaaaa	ctctcaagga	tcttaccgct	4680
gttgagatcc	agttcgatgt	aaccactcgc	tgacccaac	tgatcttcag	catcttttac	4740
tttcaccagc	gtttctgggt	gagcaaaaaac	aggaaggcaa	aatgccgcaa	aaaagggaaat	4800
aagggcgaca	cggaaatggt	gaatactcat	actcttctct	tttcaatatt	attgaagcat	4860
ttatcaggt	tattgtctca	tgagcggata	catatttgaa	tgtatttaga	aaaataaaca	4920
aataggggtt	ccgcgacat	ttcccggaaa	agtgccacct	gacgtctaag	aaaccattat	4980
tatcatgaca	ttaacctata	aaaataggcg	tatcacgagg	ccctttcgtc	tcgcgcgttt	5040
cggatgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacggtca	cagcttgtct	5100
gtaagcggat	gcccggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	ttggcgggtg	5160
tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	accaagcttg	5220
aggtctgtcg	ataatccact	tttccattga	ttttccaggt	ttcgttaact	catgccactg	5280
agcaaaaactt	cggctctttcc	taacaaaagc	tctcctcaca	aagcatggcg	cggcaacgga	5340
cgtgtcctca	tactccactg	ccacacaagg	tcgataaact	aagctcctca	caaatagagg	5400
agaattccac	tgacaactga	aaacaatgta	tgagagacga	tcaccaactgg	agcggcgcg	5460
cggttggcg	cggaggtcgg	cagcaaaaaac	aagcgaactc	ccgagcaaac	ccgaatcagc	5520
cttcagacgg	tcgtgcctaa	caacacgccc	ttctacccc	ccttcttcgc	gcccttcgc	5580

ES 2 651 313 T3

```

gtccaagcat ccttcaagtt tatctctcta gttcaacttc aagaagaaca acaccaccaa 5640
caccatggcc aagttgacca gtgccgttcc ggtgctcacc gcgcgcgacg tcgccggagc 5700
ggtcgagttc tggaccgacc ggctcggggtt ctcccgggac ttcgtggagg acgacttcgc 5760
cgggtgtggtc cgggacgacg tgaccctggt catcagcgcg gtccaggacc aggtggtgcc 5820
ggacaacacc ctggcctggg tgtgggtgcg cggcctggac gagctgtacg ccgagtggtc 5880
ggaggtcgtg tccacgaact tccgggacgc ctccgggccg gccatgaccg agatcggcga 5940
gcagccgtgg gggcgggagt tcgccctgcg cgacccggcc ggcaactgcg tgcacttcgt 6000
ggccgaggag caggactgac acgtgctacg agatttcgat tccaccgccg ccttctatga 6060
aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg atgatcctcc agcgcgggga 6120
tctcatgctg gagttcttcg cccaccccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia 6180
ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc attctagttg 6240
tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcggtac 6277

```

<210> 18
 <211> 6456
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> vector pCL0134

10

<400> 18

ES 2 651 313 T3

ctcttatctg cctcgcgccg ttgaccgccg cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc	60
tgcctcgctc gcgcagggcg gcgggcgagt gggtaggtcc gcagccttcc gcgctcgccc	120
gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc	180
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag	240
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgcbc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg	300
gtcccgcgga gcctccgct tagtccccgc cccgcgccgc gcagtcccc gggaggcatc	360
gcgcacctct cgcgccccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct	420
tcgcccctc cgctcgcggc cgcgtcgccc gcgccccgct ccctatctgc tccccagggg	480
ggcaactcgc accttttgcg cccgctgccg ccgcccgcgc cgcgccgccg ccctggtttc	540
ccccgcgagc gcggccgcgt cgcgcgcaa agactcgccg cgtgccgcc cgagcaacgg	600
gtggcgggcg gcgcggcggc ggcggggcgc ggcggcgct aggcggggct aggcgccggc	660
taggcgaaac gccgcccccg ggcgccgccg ccgcccgctc cagagcagtc gccgcgccag	720
accgccaacg cagagaccga gaccgaggta cgtcgcgcc gagcacgcc cgacgcgcgg	780
cagggacgag gagcacgacg ccgcgccgcg ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga	840
cgcgggagcg agcgtgcatg tttccgcgcg agacgacgcc gcgcgcgctg gagaggagat	900

ES 2 651 313 T3

aaggcgcttg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata	960
gtatcttgcg tgcttgacg aggagactga cgaggaggac ggatacgtcg atgatgatgt	1020
gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgact actagcaagc aagggatcca tgaccgcca	1080
cccgagcctc gtccttaaca agatcgacga tatttccttc gagacctacg acgccccga	1140
gatcagcgag cccaccgatg tcctcgcca ggtaagaag accggcatct gcggttccga	1200
tattcacttt tacgctcacg gacgcattgg aaactttgtc ctactaagc ctatggttct	1260
gggtcacgag tccgccgta ctgtcgttca ggtggaaag ggtgttacgt cgcttaaggt	1320
cggagacaac gttgccatcg agcccggcat cccagccgc tttccgatg agtacaagtc	1380
cggtcactac aacctctgcc cccacatggc tttcgcgcc accccaact ccaaggagg	1440
cgagcctaac cccccggca ccctctgca gtactttaag tccccgagg attttctcgt	1500
caagctcccc gaccacgtct cgcttgagct gggcgccctc gtcgagcccc tgtccgtcgg	1560
agttcacgcc agcaagctcg gtagcgttgc ctttggcgac tacgtggccg ttttggcgc	1620
gggtcctgtc ggccttctcg ccgcccgtgt ggccaagacc tttggagcca agggcgttat	1680
cgtcgtcgac atttttgaca acaagctcaa gatggctaag gatattggcg ccgctactca	1740
tacctttaac tocaagaccg gcggttccga ggagcttatc aaggcctttg gcggtaacgt	1800
cccgaacgtt gtcctcgagt gcaccggagc cgagccctgc attaagctcg gagtggatgc	1860
catcgcccct ggtggacgct ttgtccaggt tggtaacgcc gccggtcccg tcagcttccc	1920
gatcaccgtt ttcgctatga aggagctcac cctcttcggc agcttccgtt acggctttaa	1980
cgactacaag accgccgtgg gcatctttga caccaactac cagaacggac gtgagaacgc	2040
ccctatcgat tttgagcagc tgattacca ccgttacaag ttaaggacg ccattgaggc	2100
ctacgacctc gtcgcgctg gcaagggagc cgtcaagtgc ctcatcgatg gtcccgatg	2160
acatatgagt tatgagatcc gaaagtgaac cttgtcctaa cccgacagcg aatggcggga	2220
ggggcgggc taaaagatcg tattacatag tatttttccc ctactctttg tgtttgtctt	2280
ttttttttt ttgaacgcat tcaagccact tgtctgggtt tacttgttg tttgcttgct	2340
tgcttgcttg cttgcctgct tcttggtcag acggccaaa aaagggaaa aattcattca	2400
tggcacagat aagaaaaaga aaaagtttgt cgaccaccgt catcagaaag caagagaaga	2460
gaaacactcg cgctcacatt ctgctcgcg taagaatctt agccacgcat acgaagtaat	2520
ttgtccatct ggcgaatctt tacatgagcg tttcaagct ggagcgtgag atcatacctt	2580
tcttgatcgt aatgttccaa ccttgcatag gcctcgttgc gatccactag caatgcgtcg	2640
tactccggtt gcaactgcg catgcctca ttgtgacgtg agttcagatt cttctcgaga	2700
ccttcgagcg ctgctaattt cgctgacgc tccttctttt gtgcttccat gacacgccgc	2760
ttcaccgtgc gttccacttc ttctcagac atgcccttgg ctgcctcgac ctgctcggta	2820
aaacgggcc cagcacgtgc tacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt	2880

ES 2 651 313 T3

gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat 2940
 gctggagttc ttgcccacc ccaacttggt tattgcagct tataatgggt acaaataaag 3000
 caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggttt 3060
 gtccaaactc atcaatgtat cttatcatac atggtcgacc tgcaggaacc tgcattaatg 3120
 aatcggccaa cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct 3180
 cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc 3240
 ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 3300
 ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 3360
 cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtacg aggtggcgaa acccgacagg 3420
 actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 3480
 cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttog ggaagcgtgg cgctttctca 3540
 tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt 3600
 gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 3660
 caccccgta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 3720
 agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 3780
 tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 3840
 tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttcaa 3900
 gcagcagatt acgocgagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 3960
 gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggatcatga gattatcaaa 4020
 aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 4080
 atatgagtaa acttggctctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 4140
 gatctgtcta tttogttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat 4200
 acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgagagacc cacgctcacc 4260
 ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgtcc 4320
 tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattggtgc cgggaagcta gagtaagtag 4380
 ttgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg 4440
 ctgctcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 4500
 atccccatg ttgtgcaaaa aagcggtag ctccctcggg cctccgatcg ttgtcagaag 4560
 taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 4620
 catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga 4680
 atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca atacgggata ataccgcgcc 4740
 acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc 4800

ES 2 651 313 T3

aaggatctta cgcgtgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc 4860
 ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc 4920
 cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca 4980
 atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgat 5040
 ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt 5100
 ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgatca cgaggcctt 5160
 tcgtctcgcg cgtttcgggtg atgacgggtg aaacctctga cacatgcagc tcccggagac 5220
 ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgctcagc 5280
 ggggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag 5340
 agtgcaccaa gcttgaggtc tgtcgataat ccacttttcc attgattttc caggtttcgt 5400
 taactcatgc cactgagcaa aacttcggtc tttcctaaca aaagctctcc tcacaaagca 5460
 tggcgcggca acggacgtgt cctcatactc cactgccaca caagtcgat aaactaagct 5520
 cctcacaaat agaggagaat tccactgaca actgaaaaca atgtatgaga gacgatcacc 5580
 actggagcgg cgcgccggtt gggcgcggag gtcggcagca aaaacaagcg actcgccgag 5640
 caaaccgaa tcagccttca gacggtcgtg cctaacaaca cgccgttcta cccgccttc 5700
 ttcgcgcccc ttcgcgtcca agcatccttc aagtttatct ctctagttca acttcaagaa 5760
 gaacaacacc accaacacca tgatgccttt gtctcaagaa gaatccacc tcattgaaag 5820
 agcaacggct acaatcaaca gcatccccat ctctgaagac tacagcgtcg ccagcgcagc 5880
 tctctctagc gacggccgca tcttcaactg tgtcaatgta tatcatttta ctgggggacc 5940
 ttgtgcagaa ctcgtggtgc tgggcaactgc tgctgctgcg gcagctggca acctgacttg 6000
 tatcgtcgcg atcggaaatg agaacagggg catcttgagc ccctgtggac ggtgccgaca 6060
 ggtgcttctc gatctgcatc ctgggatcaa agccatagtg aaggacagtg atggacagcc 6120
 gacggcagtt gggattcgtg aattgctgcc ctctggttat gtgtgggagg gctaacacgt 6180
 gctccgtgct acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcgaa 6240
 tcgttttccg ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg g gatctcatg ctggagtct 6300
 tcgcccacc caacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca 6360
 caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca 6420
 tcaatgtatc ttatcatgtc tgaattcccg gggtagc 6456

<210> 19
 <211> 7628
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> vector pCL0135

<400> 19

5

ES 2 651 313 T3

ctcttatctg cctcgcgccg ttgaccgccg cttgactott ggcgcttgcc gctcgcaccc 60
 tgcctcgcctc gcgcagggcg gcgggagagt ggggtgggtcc gcagccttcc gcgctcgcgc 120
 gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc 180
 ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatoga tcgtgcggtc aaaaagaaag 240
 gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgcgc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg 300
 gtcccgcgga gcctccgcgt tagtccccgc cccgcgccgc gcagtcccc gggaggtatc 360
 gcgcacctct cgcgccccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct 420
 tcgccgcctc cgctcgcggc cgcgtcgcgc gcgccccgct ccctatctgc tccccagggg 480
 ggcaactccgc accttttgcg cccgctgccg ccgcgcgggc cgcgccgccg ccctggtttc 540
 cccgcgcgagc gcggccgcgt cgcgcgcgca agactcgcgc cgtgccgccg cgagcaacgg 600
 gtggcggcgg gcggcggcg ggcggggcgc ggcggcgcgt aggcggggct aggcgcggc 660
 taggcgaaac gccgccccg ggcgcgcgcg ccgcccgcctc cagagcagtc gccgcgccag 720
 accccaacg cagagaccga gaccgaggtc cgtcgcgccg gagcacgccg cgacgcgcgg 780
 cagggacgag gagcacgacg ccgcgcgcgc ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga 840
 cgcgggagcg agcgtgcatg tttccgcgcg agacgacgcc gcgcgcgcctg gagaggagat 900
 aaggcgcctg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata 960
 gtatcttgcg tgcttgagc aggagactga cgaggaggac ggatacgtcg atgatgatgt 1020
 gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgact actagcaagc aagggatcca tgactactac 1080
 gccgtttgac gctcccgaca agctctttct tggttcgat ctctccacc agcagcttaa 1140
 gattatcgtc actgacgaga acctcgcgc tctcaagacc tacaacgtcg agtttgatag 1200
 cattaactcc agcgtccaga aggtgtgat cgcattaac gatgagatca gcaagggagc 1260
 catcatcagc ccggtctaca tgtggctcga cgctctgat cacgtcttcg aggatatgaa 1320
 gaaggacggt tccccctta acaaggtggt cggaatctcc ggctcgtgcc agcagcacgg 1380
 ttcggctac tggtcgcgca ctgctgagaa ggttctctcc gagcttgacg ccgagtcctc 1440
 cctctcgtcc cagatgcgct ccgcctttac tttcaagcac gcccccaact ggcaggacca 1500
 ctcgaccggc aaggagctcg aggagtttga gcgcgctatc ggcgcgcgac ccctcgtga 1560
 catctccggt agccgcgcc actaccgctt tactggcctt cagattcgca agctctcgac 1620
 ccgttttaag cccgagaagt acaaccgcac ggcccgcatt tccttggtct ccagcttcgt 1680
 cgcttccgtc cttctgggtc gcattacgtc catcgaggag gctgacgctt gcggcatgaa 1740
 cctctacgac atcgagaagc gcgagttcaa cgaggagctt ctcgccattg cggttggtgt 1800
 ccaccccag ctggacggtg tcgagcagga cggtgagatc taccgcgccg gtattaacga 1860
 gctcaagcgt aagctcggcc ctgtcaagcc catcacctac gagtccgagg gagacatcgc 1920

ES 2 651 313 T3

ctctacttc gtcacccgct acggttttaa ccctgactgc aagatctact cgtttactgg 1980
 agacaacctc gccaccatca tctcccttcc tcttgccccg aacgacgccc tcatcagcct 2040
 tggcacctcc accaccgtgc ttatcatcac caagaactac gccccgtcgt cccagtacca 2100
 cctctttaag cacccgacga tgcccgacca ctacatggga atgatttgct actgcaacgg 2160
 ctccctcgcc cgtgagaagg ttcgcgacga ggtaaacgag aagtttaacg tcgaggacaa 2220
 gaagtcgtgg gacaagttta acgagatcct cgacaagagc accgatttta acaacaagct 2280
 cggcatctac ttcccgtcgc gagagattgt ccctaacgct gcggcccaga ttaagcgtc 2340
 ggtcctaac tcgaagaacg agatcgtcga cgtcgagctc ggagataaga actggcagcc 2400
 tgaggacgat gtgagcagca ttggtgagtc ccagaccctt tcgtgccgcc tccgcacggg 2460
 cccgatgctc tccaagtccg gtgattcctc cgcttcgtcg tccgcctcgc cccagcccga 2520
 gggagatggc acggacctcc acaaggttta ccaggacctc gttaagaagt tcggcgacct 2580
 cttcaccgat ggtaagaagc agacttttga gtccctcacc gcccgccca accgctgcta 2640
 ctacgtcggc ggcgccagca acaacggctc gatcatcctc aagatgggca gcattctcgc 2700
 ccctgtgaac ggtaactaca aggtcgatat cccgaacgcg tgcgcccttg gcggagctta 2760
 caaggcgtcg tggagctacg agtgcgaggc caagaaggag tggattggct acgatcagta 2820
 cattaaccgc cttttcgagg tgtccgatga gatgaacagc tttgaggta aggacaagtg 2880
 gctcgagtac gctaacggcg tgggcatgct cgccaagatg gagtccgagc tcaagcactg 2940
 acatagagt tatgagatcc gaaagtgaac cttgtcctaa cccgacagcg aatggcgagg 3000
 gggggcgggc taaaagatcg tattacatag tatttttccc ctactctttg tgtttgtctt 3060
 tttttttttt ttgaacgat tcaagccact tgtctgggtt tacttgtttg tttgcttgct 3120
 tgcttgcttg cttgcctgct tcttggtcag acggcccaaa aaagggaaaa aattcattca 3180
 tggcacagat aagaaaaaga aaaagtttgt cgaccaccgt catcagaaag caagagaaga 3240
 gaaacactcg cgctcacatt ctcgctcgcg taagaatctt agccacgcat acgaagtaat 3300
 ttgtccatct ggccaatctt tacatgagcg ttttcaagct ggagcgtgag atcatacctt 3360
 tcttgatcgt aatgttccaa ccttgcatag gcctcgttgc gatccgctag caatgcgtcg 3420
 tactcccgtt gcaactgctc catcgctca ttgtgacgtg agttcagatt cttctcgaga 3480
 ccttcgagcg ctgctaattt cgctgacgc tccttctttt gtgcttccat gacacgccgc 3540
 ttaccgtgc gttccacttc ttcctcagac atgcccttgg ctgcctcgac ctgctcggtta 3600
 aaacgggccc cagcacgtgc tacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt 3660
 gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat 3720
 gctggagttc ttcgcccacc ccaacttggt tattgcagct tataatggtt acaataaag 3780
 caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggttt 3840
 gtccaaactc atcaatgat cttatcatac atggtcgacc tgcaggaacc tgcattaatg 3900

ES 2 651 313 T3

aatcggccaa	cgcgcgggga	gaggcggttt	gcgtattggg	cgctcttccg	cttcctcgct	3960
cactgactcg	ctcgctcgg	tcgttcggct	gcggcgagcg	gtatcagctc	actcaaaggc	4020
ggtaatacgg	ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	aagaacatgt	gagcaaaagg	4080
ccagcaaaag	gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgcgttgctg	gcgtttttcc	ataggctccg	4140
ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcat	aggtggcgaa	acccgacagg	4200
actataaaga	taccaggcgt	ttccccctgg	aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	4260
cctgccgctt	accggatacc	tgtccgcctt	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgctttctca	4320
tagctcacgc	tgtaggtatc	tcagttcggg	gtaggtcgtt	cgctccaagc	tgggctgtgt	4380
gcacgaacct	cccggtcagc	ccgaccgctg	cgcttatcc	ggtaactatc	gtcttgagtc	4440
caaccggtg	agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	4500
agcgaggtat	gtaggcggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	4560
tagaagaaca	gtatttggta	tctgcgctct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	4620
tggtagctct	tgatccggca	aacaaaccac	cgctggtagc	ggtggttttt	ttgtttgcaa	4680
gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	4740
gtctgacgct	cagtggaacg	aaaactcacg	ttaagggatt	ttggtcatga	gattatcaaa	4800
aaggatcttc	acctagatcc	ttttaaatta	aaaatgaagt	tttaaataca	tctaaagtat	4860
atatgagtaa	acttggctctg	acagttacca	atgcttaatc	agtgaggcac	ctatctcagc	4920
gatctgtcta	tttcgttcat	ccatagttgc	ctgactcccc	gtcgtgtaga	taactacgat	4980
acgggagggc	ttaccatctg	gccccagtgc	tgcaatgata	ccgcgagacc	cacgctcacc	5040
ggctccagat	ttatcagcaa	taaaccagcc	agccggaagg	gccgagcgca	gaagtggctc	5100
tgcaacttta	tccgcctoca	tccagtctat	taattgttgc	cggggaagcta	gagtaagtag	5160
ttcgccagtt	aatagtttgc	gcaacgttgt	tgccattgct	acaggcatcg	tgggtgtcacg	5220
ctcgtcgttt	ggtatggctt	cattcagctc	cggttcccaa	cgatcaaggc	gagttacatg	5280
atccccatg	ttgtgcaaaa	aagcggttag	ctccttcggt	cctccgatcg	ttgtcagaag	5340
taagttggcc	gcagtgttat	cactcatggg	tatggcagca	ctgcataatt	ctcttactgt	5400
catgccatcc	gtaagatgct	tttctgtgac	tggtgagtac	tcaaccaagt	cattctgaga	5460
atagtgtatg	cggcgaccga	gttgctcttg	cccggcgtca	atacgggata	ataccgcgcc	5520
acatagcaga	actttaaaag	tgctcatcat	tggaaaacgt	tcttcggggc	gaaaactctc	5580
aaggatctta	ccgctgttga	gatccagttc	gatgtaacct	actcgtgcac	ccaactgatc	5640
ttcagcatct	tttactttca	ccagcgtttc	tgggtgagca	aaaacaggaa	ggcaaaatgc	5700
cgcaaaaaag	ggaataaggg	cgacacggaa	atggtgaata	ctcatactct	tcctttttca	5760
atattattga	agcatttatc	agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	5820

ES 2 651 313 T3

ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcg	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	5880
ctaagaaacc	attattatca	tgacattaac	ctataaaaaat	aggcgtatca	cgaggccctt	5940
tcgtctcgcg	cgtttcggtg	atgacggtga	aaacctctga	cacatgcagc	tcccggagac	6000
ggtcacagct	tgtctgtaag	cggatgccgg	gagcagacaa	gcccgtcagg	gcgcgtcagc	6060
gggtgttggc	gggtgtcggg	gctggcttaa	ctatgcggca	tcagagcaga	ttgtactgag	6120
agtgcaccaa	gcttgaggtc	tgtcgataat	ccacttttcc	attgattttc	caggtttcgt	6180
taactcatgc	cactgagcaa	aacttcggtc	tttcctaaca	aaagctctcc	tcacaaagca	6240
tggcgcggca	acggacgtgt	cctcactctc	caactgccaca	caaggtcgat	aaactaagct	6300
cctcacaaat	agaggagaat	tccactgaca	actgaaaaca	atgtatgaga	gacgatcacc	6360
actggagcgg	cgcggcggtt	gggcgcggag	gtcggcagca	aaaacaagcg	actcgcgag	6420
caaaccgaa	tcagccttca	gacggtcgtg	cctaacaaca	cgccgttcta	ccccgccttc	6480
ttcgcgcccc	ttcgcgtcca	agcatccttc	aagtttatct	ctctagttca	acttcaagaa	6540
gaacaacacc	accaacacca	tgattgaaca	agatggattg	cacgcagggt	ctccggccgc	6600
ttgggtggag	aggctattcg	gctatgactg	ggcacaacag	acaatcggct	gctctgatgc	6660
cgccgtgttc	cggctgtcag	cgcaggggcg	cccggttctt	tttgtcaaga	ccgacctgtc	6720
cggtgccctg	aatgaactgc	aggacgaggc	agcgcggcta	tcgtggctgg	ccacgacggg	6780
cgttccttgc	gcagctgtgc	tcgacgttgt	cactgaagcg	ggaagggact	ggctgctatt	6840
gggcaagtgc	ccggggcagc	atctcctgtc	atctcacctt	gctcctgccg	agaaagtatc	6900
catcatggct	gatgcaatgc	ggcggctgca	tacgcttgat	ccggctacct	gcccattoga	6960
ccaccaagcg	aaacatcgca	tcgagcgagc	acgtactcgg	atggaagccg	gtcttgtoga	7020
tcaggatgat	ctggacgaag	agcatcaggc	gctcgcgcca	gccgaactgt	tcgccaggct	7080
caaggcgcgc	atgcccgacg	gcgatgatct	cgtcgtgacc	catggcgatg	cctgcttgcc	7140
gaatatcatg	gtggaaaatg	gccgcttttc	tggattcatc	gactgtggcc	ggctgggtgt	7200
ggcggaccgc	tatcaggaca	tagcgttggc	taccctgat	attgctgaag	agcttggcgg	7260
cgaatgggct	gaccgcttcc	tcgtgcttta	cggtatcgcc	gctcccatt	cgcagcgc	7320
cgccttctat	cgccttcttg	acgagttctt	ctgacacgtg	ctacgagatt	tcgattccac	7380
cgccgccttc	tatgaaaggt	tgggcttcgg	aatcgttttc	cgggacgccg	gctggatgat	7440
cctccagcgc	ggggatctca	tgctggagtt	cttcgcccac	cccaacttgt	ttattgcagc	7500
ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	catttttttc	7560
actgcattct	agttgtggtt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	tctgaattcc	7620
cgggtac						7628

ES 2 651 313 T3

<210> 20
<211> 7241
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> vector pCL0136

10

<400> 20

ES 2 651 313 T3

ctcttatctg cctcgcgcgcg ttgaccgccc cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc 60
tgcctcgctc gcgcagggcg gcggggcgagt ggggtgggtcc gcagccttcc gcgctcgccc 120
gctagctcgc tcgcgcgcgt ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc 180
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag 240
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgcgc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg 300
gtcccgcgga gcctccgct tagtccccgc cccgcgcccgc gcagtcccc gggaggcatc 360
gcgcacctct cgccgcccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct 420
tcgcccctc cgctcgcggc cgcgtcgccc gcgccccgct ccctatctgc tccccagggg 480
ggcactccgc accttttgcg cccgctgccc ccgcccgggc cgccccgccc ccctggtttc 540
ccccgcgagc gcggcccgct cgccgcgcaa agactcgccc cgtgccgccc cgagcaacgg 600
gtggcggcg gcgcccggcg ggcggggcg gcgcccgcgt aggcggggct aggcgccggc 660
taggcgaaac gccgccccgc ggcgcccgc ccgcccgctc cagagcagtc gccgcgccag 720
accgccaacg cagagaccga gaccgaggtc cgtcgcgccc gagcacgccc cgacgcgcgg 780
cagggacgag gagcacgacg ccgcgcccgc ccgcgcccgg ggggggaggg agaggcagga 840
cgccgggagc agcgtgcatg tttccgcgcg agacgacgcc gcgcgcgctg gagaggagat 900
aaggcgcttg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata 960
gtatcttgcg tgcttgagc aggagactga cgaggaggac ggatacgtcg atgatgatgt 1020
gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgact actagcaagc aagggatcca tgaagaccgt 1080
cgccggcatc gatcttgaa cccagtcac gaaggttgc atttacgact acgagaagaa 1140
ggagatcatc gagtccgct cgtgccctat ggagctcatt agcgagtcgg acggaacccc 1200
cgagcagacg actgagtgg ttgacaaggg tctcgaggtg tgctttgaa agctctccgc 1260
tgataacaag aagaccattg aggcgattgg catctccggc cagctccacg gcttcgtccc 1320
tctcgatgcg aacggaaagg cgctctaaa catcaagctc tgggtgcgaca ccgccactgt 1380
ggaggagtgc aagatcatta ctgaccccgc cggcggcgac aaggctgtca tcgacgcgct 1440
cggcaacctc atgctcaccg gattcaccgc cccgaagatt ctctggctca agcgcaaaa 1500
gcccgaggcc tttgctaacc tcaagtacat tatgctgccc cacgattacc tcaactggaa 1560
gctgactgga gactacgtca tggagtacgg cgacgcctcc ggcaccgccc tttttgattc 1620
gaagaaccgc tgctggtoga agaagatttg cgacattatt gatcctaagc tgctcgacct 1680
tctccctaag ctattgagc cctcggcccc cgccggtaag gtcaacgacg aggccgccaa 1740

ES 2 651 313 T3

ggcgtacggc attcccgcg gaatccccgt ttccgctggc ggcggtgata acatgatggg 1800
 tgcggtcggg actggcaccg tcgctgacgg attcctcacc atgagcatgg gcacctccgg 1860
 aactctttac ggctactcgg acaagcctat ttccgacccg gctaaccggcc tcagcggctt 1920
 ctgcagctcc acgggcggtt ggcttcccct cctttgcacc atgaactgca ccgtcggcac 1980
 cgagttcgtc cgcaaccttt ttcagatgga tatcaaggag ctgaacgtcg aggctgctaa 2040
 gtccccctgc ggcagcggg gcgttcttgt cattcctttc ttcaacggcg agcgcacccc 2100
 gaacctcccc aacggccgcg cctcgattac cggcctcacc tccgcgaaca cgtcccgcgc 2160
 caacatcgct cgcgcctcct ttgagtcggc cgtctttgcc atgcgcggtg gcctcgatgc 2220
 gtttcgtaag ctcgattcc agcccaagga gattcgcctc atcggcggtg gttcgaagt 2280
 cgacctctgg cgccagatcg ctgctgacat tatgaaacct cccatccgtg tcccccttct 2340
 cgaggaggcc gccgccctcg gcgagctgt ccaggccctt tggcgcctta agaaccagtc 2400
 cggtaagtgc gacatcgtcg agctttgcaa ggagcatatc aagattgacg agtccaagaa 2460
 cgccaacccg attgccgaga acgtcgccgt gtacgataag gcctacgatg agtactgcaa 2520
 ggtcgttaac acgctcagcc ctctgtacgc ctaacatag agttatgaga tccgaaagt 2580
 aacctgtcc taaccgcaca gcgaatggcg ggagggggcg ggctaaaaga tcgtattaca 2640
 tagtattttt cccctactct ttgtgtttgt cttttttttt tttttgaaag cattcaagcc 2700
 acttgtctgg gtttacttgt ttgtttgctt gcttgcttgc ttgcttgccct gcttcttgg 2760
 cagacggccc aaaaaaggga aaaaattcat tcatggcaca gataagaaa agaaaaagtt 2820
 tgtcgaccac cgtcatcaga aagcaagaga agagaaacac tcgcgctcac attctcgctc 2880
 gcgtaagaat cttagccacg catacgaagt aatttgtcca tctggcgaat ctttacctga 2940
 gcgttttcaa gctggagcgt gagatcatac ctttcttgat cgtaatgttc caaccttgca 3000
 taggcctcgt tgcgatccgc tagcaatgcg tcgtactccc gttgcaactg cgccatcgcc 3060
 tcattgtgac gtgagttcag attcttctcg agaccttcca gcgctgctaa tttcgcctga 3120
 cgctccttct tttgtgcttc catgacacgc cgcttcaccg tgcgttcacc ttcttctca 3180
 gacatgccct tggctgcctc gacctgctcg gtaaaacggg cccagcacg tgctacgaga 3240
 tttcgattcc accgccgcct tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc 3300
 cggctggatg atcctccagc gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accccaactt 3360
 gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaatt tcacaaataa 3420
 agcatttttt tcaactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca 3480
 tacatggtcg acctgcagga acctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg 3540
 tttcgtatt gggcgctctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgtcg 3600
 gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg 3660
 ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 3720

ES 2 651 313 T3

ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcadc acaaaaaatcg 3780
 acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 3840
 tggaagctcc ctcgtgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc 3900
 ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggc atctcagttc 3960
 ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc agcccgaccg 4020
 ctgctcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc 4080
 actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 4140
 gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc 4200
 tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac 4260
 caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 4320
 atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 4380
 acgtaagggt attttggca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaa 4440
 ttaaaaatga agttttaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta 4500
 ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt 4560
 tgctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 4620
 tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggctcca gatttatcag caataaacca 4680
 gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgct ccatccagtc 4740
 tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 4800
 tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgct acgctcgtcg tttgggatgg cttcattcag 4860
 ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggc 4920
 tagctccttc ggtcctccga tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 4980
 ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 5040
 gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcccgcac cgagttgctc 5100
 ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat 5160
 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 5220
 ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 5280
 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 5340
 gaaatgttga atactcatac tcttctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 5400
 ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc 5460
 ggcacatctt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt 5520
 aacctataa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc gcgctttcg gtgatgacgg 5580
 tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc 5640

ES 2 651 313 T3

cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtggt gccgggtgtc ggggctggct 5700
 taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac caagcttgag gtctgtcgat 5760
 aatccacttt tccattgatt ttccaggttt cgtaaactca tgccactgag caaaacttcg 5820
 gtctttccta acaaaagctc tcttcacaaa gcatggcgcg gcaacggacg tgtcctcata 5880
 ctccactgcc acacaaggtc gataaactaa gtcctcaca aatagaggag aattccactg 5940
 acaactgaaa acaatgtatg agagacgatc accactggag cggcgcggcg gttgggcgcg 6000
 gaggtcggca gcaaaaacaa gcgactcgcc gagcaaacc gaatcagcct tcagacggtc 6060
 gtgcctaaca acacgcggtt ctaccccgcc ttcttcgcgc cccttcgcgt ccaagcatcc 6120
 ttcaagttta tctctctagt tcaacttcaa gaagaacaac accaccaaca ccatgattga 6180
 acaagatgga ttgcacgcag gttctccggc cgcttgggtg gagaggctat tcggctatga 6240
 ctgggcacaa cagacaatcg gctgctctga tgccgccgtg ttccggctgt cagcgcaggg 6300
 gcgcccgggt ctttttgtca agaccgacct gtccggtgcc ctgaatgaac tgcaggacga 6360
 ggcagcgcgg ctatcgtggc tggccacgac gggcgttcct tgcgcagctg tgctcgacgt 6420
 tgtcactgaa gcgggaaggg actggctgct attgggcgaa gtgccggggc aggatctcct 6480
 gtcactctac cttgctcctg ccgagaaagt atccatcatg gctgatgcaa tgcggcggct 6540
 gcatacgctt gatccggcta cctgcccatt cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg 6600
 agcacgtact cggatggaag ccggtcttgt cgatcaggat gatctggacg aagagcatca 6660
 ggggctcgcg ccagccgaac tgttcgccag gctcaaggcg cgcacgcccg acggcgatga 6720
 tctcgtcgtg acccatggcg atgcctgctt gccgaatata atggtggaaa atggccgctt 6780
 ttctggattc atcgactgtg gccggctggg tgtggcggac cgctatcagg acatagcgtt 6840
 ggctaccctg gatattgctg aagagcttgg cggcgaatgg gctgaccgct tctcgtgct 6900
 ttacggtatc gccgctcccg attcgcagcg catcgccttc tatcgccttc ttgacgagtt 6960
 cttctgacac gtgctacgag atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt 7020
 cggaatcgtt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga 7080
 gttcttcgcc caccccaact tgtttattgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag 7140
 catcacaat ttcaacaata aagcattttt ttactgcat tctagttgtg gtttgtccaa 7200
 actcatcaat gtatcttata atgtctgaat tcccggggta c 7241

<210> 21
 <211> 957
 <212> ADN
 <213> *Pichia stipitis*

<220>
 <223> reductasa de xilosa (X59465), codones optimizados

5

10

ES 2 651 313 T3

<400> 21

atgccctcca ttaagctcaa ctccggttac gatatgcccg ccgtcggttt tggttgctgg	60
aaggtggacg tcgacacttg ctccggagcag atttaccgcg ccattaagac cggataccgc	120
ctctttgacg gtgccgagga ctacgccaac gagaagctgg tcggagccgg cgtcaagaag	180
gccattgatg agggaattgt caagcgcgag gacctctttc tcacctcaa gctctggaac	240
aactaccacc accccgataa cgtcgagaag gctcttaacc gtaccctcag cgatctccag	300
gtcgactacg tcgatctttt tcttattcac ttccctgtca cgttcaagtt tgtccctctt	360
gaggagaagt acccccccggtt attctactgc ggaaagggcg ataactttga ctacgaggac	420
gttcctattc tggagacttg gaaggctctc gagaagctcg tcaaggccgg caagattcgc	480
agcatcggcg tcagcaactt tcttgagct ctctcctgg acctccttcg cggagccacc	540
atcaagcctt cggttcttca ggtcgagcac catccttacc ttcagcagcc ccgtctcatc	600
gagtttgccc agtcccgcgg tattgcccgc acggcctaca gtccttcgg ccctcagtcc	660
tttgctgagc tcaaccaggg tcgcgccctt aacaccagcc ccctcttcga gaacgagacc	720
attaaggcca tcgctgctaa gcacggtaag tccccgcgcc aggtcctcct ccgttggagc	780
tcgcagcgcg gaatcgccat catccctaag agcaacaccg tcctcgcct tcttgagaac	840
aaggatgtca actccttcga cctcgatgag caggatttcg ccgacattgc caagctcgat	900
attaacctcc gcttcaacga ccctggggac tgggataaga tcctatctt tgtctaa	957

5 <210> 22
 <211> 1872
 <212> ADN
 <213> *Pichia stipitis*

10 <220>
 <223> cinasa de xilulosa (AF127802), codones optimizados

<400> 22

ES 2 651 313 T3

atgactacta	cgccgtttga	cgctcccgc	aagctctttc	ttggcttcga	tctctccacc	60
cagcagctta	agattatcgt	cactgacgag	aacctcgcgc	ctctcaagac	ctacaacgtc	120
gagtttgata	gcattaactc	cagcgtccag	aaggggtgta	tcgccattaa	cgatgagatc	180
agcaagggag	ccatcatcag	cccggcttac	atgtggctcg	acgctctcga	tcacgtcttc	240
gaggatatga	agaaggacgg	tttccccttt	aacaaggtgg	tcggaatctc	cggtcctgtc	300
cagcagcacg	gttcggctca	ctggctcgcg	actgctgaga	aggttctctc	cgagcttgac	360
gccgagtcct	ccctctcgtc	ccagatgcgc	tccgccttta	ctttcaagca	cgcccccaac	420
tggcaggacc	actcgcaccg	caaggagctc	gaggagtttg	agcgcgtcat	cggtcgcgac	480
gccctcgtcg	acatctccgg	tagccgcgcc	cactaccgct	ttactggcct	tcagattcgc	540
aagctctcga	cccgttttaa	gcccgagaag	tacaaccgca	cgccccgcat	ttccctggtc	600
tccagcttcg	tcgcttcogt	ccttctgggt	cgcattacgt	ccatcgagga	ggctgacgct	660
tgcggcatga	acctctacga	catcgagaag	cgcgagttca	acgaggagct	tctcgccatt	720
gcggctggtg	tccaccccga	gctggacggt	gtcgcgacg	acggtgagat	ctaccgcgcc	780
ggtattaacg	agctcaagcg	taagctcggc	cctgtcaagc	ccatcaccta	cgagtcggag	840
ggagacatcg	cctcctactt	cgtaaccgcg	tacggtttta	accctgactg	caagatctac	900
tcgtttactg	gagacaacct	cgccaccatc	atctcccttc	ctcttgcccc	gaacgacgcc	960
ctcatcagcc	ttggcacctc	caccaccgtg	cttatcatca	ccaagaacta	cgccccgtcg	1020
tcccagtacc	acctctttaa	gcacccgacg	atgcccgacc	actacatggg	aatgatttgc	1080
tactgcaacg	gctccctcgc	ccgtgagaag	gttcgcgacg	aggtaacga	gaagttaaac	1140
gtcgcaggaca	agaagtcgtg	ggacaagttt	aacgagatcc	tcgacaagag	caccgatttt	1200
aacaacaagc	tcggcatcta	cttcccgcct	ggagagattg	tcctaacgc	tgccgcccag	1260
attaagcgct	cggtccttaa	ctcgaagaac	gagatcgtcg	acgtcgagct	cggagataag	1320
aactggcagc	ctgaggacga	tgtgagcagc	attgttgagt	cccagaccct	ttcgtgccgc	1380
ctccgcacgg	gcccgatgct	ctccaagtcc	ggtgattcct	ccgcttcgtc	gtccgcctcg	1440
ccccagcccg	aggagatgg	cacggacctc	cacaaggttt	accaggacct	cgtaagaag	1500
ttcggcgacc	tcttcaccga	tggttaagaag	cagacttttg	agtccctcac	cgcccccccc	1560
aaccgctgct	actacgtcgg	tggcgccagc	aacaacggct	cgatcatcct	caagatgggc	1620
agcattctcg	cccctgtgaa	cggttaactac	aaggtcgata	tcccgaacgc	gtgcgccctt	1680
ggcggagctt	acaaggcgtc	gtggagctac	gagtgcgagg	ccaagaagga	gtggattggc	1740
tacgatcagt	acattaaccg	ccttttcgag	gtgtccgatg	agatgaacag	ctttgaggtc	1800
aaggacaagt	ggctcgagta	cgctaaccgc	gtgggcatgc	tcgccaagat	ggagtcggag	1860
ctcaagcact	ga					1872

ES 2 651 313 T3

<210> 23
 <211> 1092
 <212> ADN
 <213> *Pichia stipitis*

5

<220>
 <223> Xilitol deshidrogenasa (X55392), codones optimizados

<400> 23

10

```

atgaccgcca acccgagcct cgtccttaac aagatcgacg atatttcctt cgagacctac      60
gacgcccccg agatcagcga gccaccgat gtcctcgtcc aggttaagaa gaccggcatc      120
tgcggttccg atattcactt ttacgctcac ggacgcattg gaaactttgt cctcactaag      180
cctatggttc tgggtcacga gtccgccggt actgtcgttc aggtgggaaa ggggtgttacg      240
tcgcttaagg tcggagacaa cgttgccatc gagcccggca tccccagccg cttttccgat      300
gagtacaagt ccggtcacta caacctctgc ccccatatgg ctttcgccgc ccccccaac      360
tccaaggagg gcgagcctaa cccccccggc accctctgca agtactttaa gtcccccgag      420

gattttctcg tcaagctccc cgaccacgtc tcgcttgagc tgggcgccct cgtcagagccc      480
ctgtccgtcg gagttcacgc cagcaagctc ggtagcgttg cctttggcga ctacgtggcc      540
gtttttggcg cgggtcctgt cggccttctc gccgccgctg tggccaagac ctttgagacc      600
aagggcgtta tcgtcgtcga catttttgac aacaagctca agatggctaa ggatattggc      660
gccgctactc atacctttaa ctccaagacc ggcggttccg aggagcttat caaggccttt      720
ggcggtaacg tcccgaacgt tgtcctcgag tgcaccggag ccgagccctg cattaagctc      780
ggagtggatg ccatcgcccc tgggtggacgc tttgtccagg ttggtaacgc cgccggtccc      840
gtcagcttcc cgatcaccgt tttcgctatg aaggagctca ccctcttcgg cagcttccgt      900
tacggcttta acgactacaa gaccgccgtg ggcatctttg acaccaacta ccagaacgga      960
cgtgagaacg cccctatcga ttttgagcag ctgattaccc accgttataa gtttaaggac     1020
gccattgagg cctacgacct cgtccgcgct ggcaaggag ccgtcaagtg cctcatcgat     1080
ggtcccagat ga                                                                1092
    
```

<210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Péptido sintético

20

<400> 24

ES 2 651 313 T3

Arg Leu Arg Lys Leu Pro Ile Asp His Pro Asp Ser Leu Glu Glu Leu
1 5 10 15

Arg Asp

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 25

Glu Thr Lys Gly Leu Thr Leu Glu Glu Ile Glu Ala Lys Cys Leu
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un cultivo celular de traustocáritidos, que comprende:
 - 5 a. transformar una célula de traustocáritidos con moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador heterólogo de xilosa, una isomerasa heteróloga de xilosa y una cinasa heteróloga de xilulosa; o con moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador heterólogo de xilosa, una cinasa heteróloga de xilulosa, una reductasa heteróloga de xilosa y una xilitol deshidrogenasa heteróloga; en el que los genes heterólogos tienen los codones optimizados para su expresión en la célula de traustocáritidos, y los genes heterólogos están bajo el control de cualquier secuencia promotora, cualquier secuencia terminadora y/o cualquier otra secuencia reguladora que sea funcional en una célula de traustocáritidos; y
 - 10 b. cultivar la célula de traustocáritidos transformada en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono.
- 15 2. La célula de traustocáritido transformada definida en la reivindicación 1, en la que la secuencia polinucleotídica que codifica el transportador heterólogo de xilosa es al menos un 90 % idéntica a una secuencia seleccionada de la secuencia polinucleotídica del n.º de acceso AJ875406, BT015128, AF127802, AJ249910, X59465 o X55392; una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos del n.º de acceso CAB76571; la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23; y combinaciones de las mismas.
- 20 3. La célula de traustocáritidos transformada definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el traustocáritido es un *Schizochytrium* o un *Thraustochytrium*.
- 25 4. Un cultivo de traustocáritidos que comprende:
 - a. la célula de traustocáritidos definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y
 - 30 b. un medio de cultivo celular que comprende xilosa como fuente de carbono.
- 35 5. Un método de producción de una biomasa de traustocáritidos, que comprende:
 - a. cultivar la célula de traustocáritidos definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono, y
 - 40 b. recoger a biomasa del medio de cultivo.
- 45 6. Un método de producción de un aceite microbiano, que comprende:
 - a. cultivar la célula de traustocáritidos definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono para producir una biomasa, y
 - 50 b. extraer un aceite de la biomasa.
- 55 7. Un método de producción de un producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica para un animal o ser humano, que comprende:
 - a. cultivar la célula de traustocáritidos definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono,
 - b. recoger una biomasa del medio de cultivo y
 - 60 c. preparar el producto alimenticio, cosmético, composición industria o composición farmacéutica de la biomasa.
8. El método de la reivindicación 7, que comprende además extraer un aceite de la biomasa y preparar el producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica del aceite.
9. El método de la reivindicación 7 o reivindicación 8, en el que el producto alimenticio se selecciona de (a) una fórmula infantil, (b) leche, (c) una bebida, (d) una bebida terapéutica, (e) una bebida nutritiva, (f) un aditivo para alimentos de animales o seres humanos, (g) suplemento nutritivo, (h) pienso para animales e (i) una combinación de (b), (c), (d) y/o (e).
10. El método de las reivindicación 9, en el que el pienso para animales se selecciona de (a) un pienso de acuicultura, (b) un pienso para animales domésticos, (c) un pienso para animales de zoológico, (d) un pienso para animales de trabajo, (e) un pienso para ganado y (f) una combinación de (b), (c), (d) y/o (e).

11. Un método para producir un biocombustible, que comprende:

- 5
- a. cultivar la célula de traustóquitridos definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un medio de cultivo que comprende xilosa como fuente de carbono para producir una biomasa,
 - b. extraer un aceite de la biomasa, y
 - c. producir un biocombustible transesterificando el aceite, craqueando el aceite, procesando el aceite por despolimerización térmica, añadiendo el aceite a un proceso de refinado del petróleo o una combinación de los mismos.

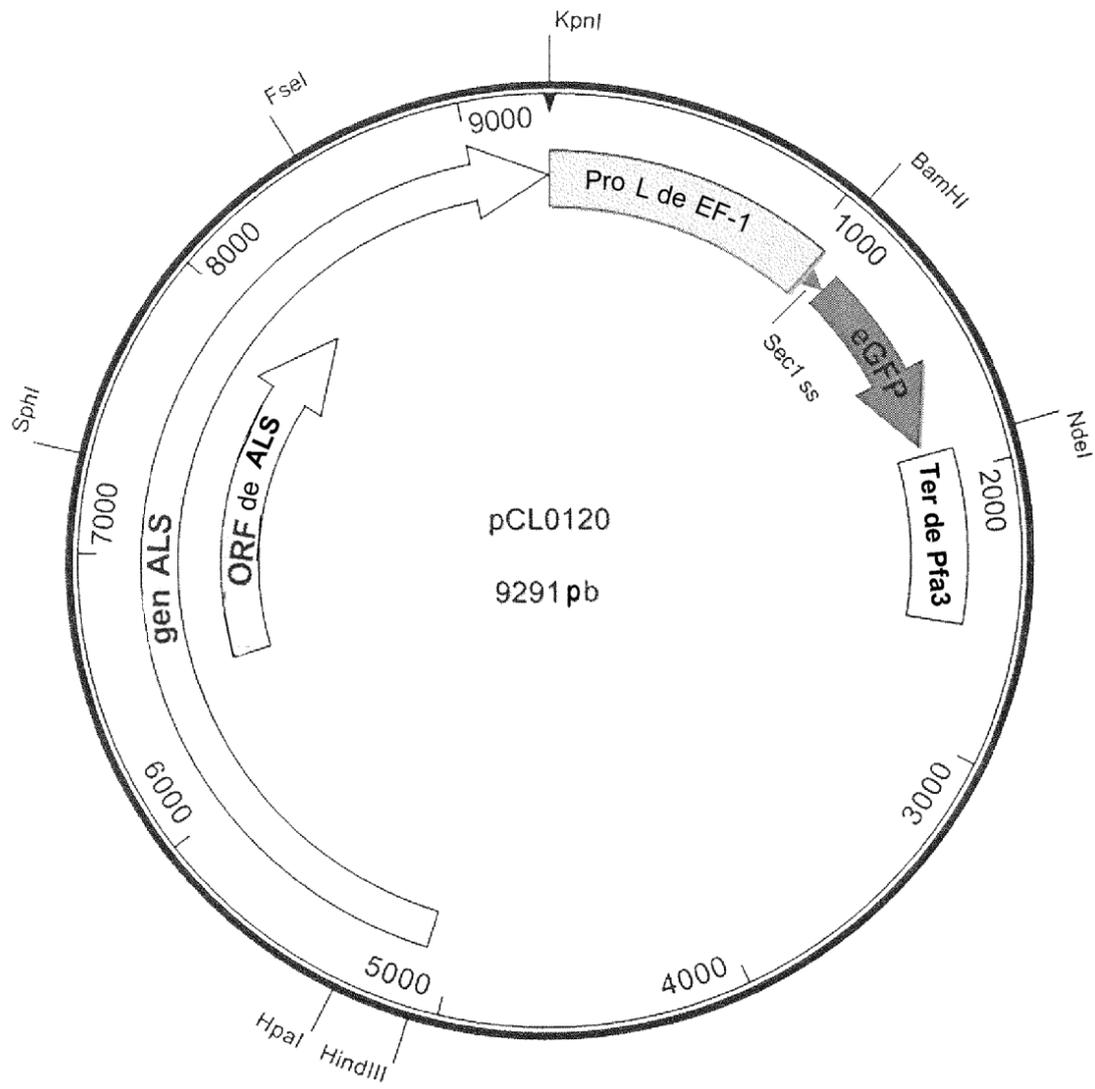


FIG. 1

AA*	Codón	Fracción	AA*	Codón	Fracción	AA*	Codón	Fracción	AA*	Codón	Fracción	AA*	Codón	Fracción
Ala	GCC	0,64	Final	TAA	0,34	Leu	CTT	0,16	Ser	TCG	0,33	Ser	TCG	0,33
Ala	GCA	0,03	Final	TGA	0,33	Leu	TTG	0,02	Ser	TCC	0,31	Ser	TCC	0,31
Ala	GCT	0,18	Final	TAG	0,33	Leu	CTG	0,12	Ser	AGT	0,03	Ser	AGT	0,03
Ala	GCG	0,16	Gln	CAA	0,08	Leu	CTC	0,69	Ser	TCA	0	Ser	TCA	0
Arg	CGG	0,01	Gln	CAG	0,92	Leu	TTA	0	Ser	TCT	0,09	Ser	TCT	0,09
Arg	AGA	0	Glu	GAA	0,09	Leu	CTA	0	Thr	ACG	0,3	Thr	ACG	0,3
Arg	CGC	0,8	Glu	GAG	0,91	Lys	AAA	0,04	Thr	ACC	0,54	Thr	ACC	0,54
Arg	CGA	0,01	Gly	GGA	0,1	Lys	AAG	0,96	Thr	ACA	0,02	Thr	ACA	0,02
Arg	AGG	0	Gly	GGT	0,2	Met	ATG	1	Thr	ACT	0,14	Thr	ACT	0,14
Arg	CGT	0,17	Gly	GGG	0	Phe	TTT	0,45	Trp	TGG	1	Trp	TGG	1
Asn	AAC	0,94	Gly	GGC	0,7	Phe	TTC	0,55	Tyr	TAC	0,94	Tyr	TAC	0,94
Asn	AAT	0,06	His	CAC	0,83	Pro	CCT	0,21	Tyr	TAT	0,06	Tyr	TAT	0,06
Asp	GAT	0,24	His	CAT	0,17	Pro	CCG	0,34	Val	GTC	0,62	Val	GTC	0,62
Asp	GAC	0,76	Ile	ATC	0,7	Pro	CCC	0,43	Val	GTA	0	Val	GTA	0
Cys	TGC	0,95	Ile	ATA	0	Pro	CCA	0,02	Val	GTT	0,14	Val	GTT	0,14
Cys	TGT	0,05	Ile	ATT	0,3	Ser	AGC	0,24	Val	GTG	0,24	Val	GTG	0,24

* AA = aminoácido

FIG. 2

ES 2 651 313 T3

ATGGGCCTCGAGGATAACCGCATGGTTAAGCGCTTTGTCAACGTGGGCGAGAAGAAGGCCGGTAGCACCGC
CATGGCCATCATTGTTGGCCTCTTCGCGGCCTCGGGCGGCCTCCTCTTCGGCTACGACACCGGCACTATCTCG
GGCGTCATGACTATGGACTACGTTCTCGCCCGCTACCCCTCCAACAAGCACTCCTTCACCGCTGACGAGTCGTC
GCTCATCGTTTCCATTCTTTCGGTTCGGCACCTTCTTCGGCGCCCTCTGCGCCCCGTTCTCAACGATACCCTCGG
CCGCCGCTGGTGCCTCATCCTCAGCGCCCTCATTGTCTTTAACATCGGCGCCATCCTCCAGGTCATTTCCACCGC
CATCCCCCTGCTCTGCGCGGGCCGCGTTATCGCCGTTTCGGTGTGCGGCCTCATTTCGCCACCATCCCGCTCT
ACCAGTCCGAGACTGCTCCGAAGTGGATTGCGGCGCCATCGTTTCCTGCTACCAGTGGGCCATCACTATCGG
ACTTTTCTCGCTTCTGCGTCAACAAGGGCACCGAGCACATGACCAACTCCGGTTCGTACCGTATTCTCTGG
CCATCCAGTGCCTCTGGGGCCTCATCCTTGGTATTGGCATGATTTTCTCCCTGAGACCCCCGCTTCTGGATTT
CGAAGGGCAACCAGGAGAAGGCCGCCGAGTCCCTCGCCCGTCTCCGCAAGCTCCCATCGACCATCCTGATA
GCCTTGAGGAGCTTCGCGATATTACTGCCGCCTACGAGTTCGAGACCGTCTACGGTAAGTCCAGCTGGTCCCA
GGTCTTTTCCACAAGAACCATCAGCTCAAGCGCCTCTTTACCGGCGTTGCCATTACGGCCTTTCAGCAGCTCA
CCGGAGTTAACTTTATCTTTTACTACGGCACCACTTTTTTAAAGCGCGCCGGAGTCAACGGATTACCATCAGC
CTTGCCACCAACATCGTTAACGTGCGCAGCACTATCCCGGCATTCTTCTCATGGAGGTCCTCGGCCGCCGCAA
CATGCTCATGGGCGGTGCCACCGGCATGTCGCTGTCGCAGCTTATCGTCGCCATTGTCGGAGTTGCCACGTCG
GAGAACAACAAGTCGAGCCAGTCGGTCCTCGTCGCTTCTCGTGCATCTTTATCGCTTTTTTTGCCGCCACCTG
GGGTCCCTGCGCCTGGGTGCTGTCGCGGAGCTTTTTCCCTTCGCACTCGCGCTAAGTCCGTTTCCCTCTGCA
CCGCGTCCAACCTGGCTCTGGAACCTGGGGCATTGCTTACGCCACCCCTACATGGTCGACGAGGATAAGGGTA
ACCTCGGCAGCAACGTTTTTTTTATTTGGGGAGGCTTCAACCTCGCTTGCCTTTTTTCGCGTGGTACTTCATT
ACGAGACCAAGGGCCTTTCCCTCGAGCAGTTGATGAGCTCTACGAGCATGTTTCGAAGGCGTGGAAGTCCA
AGGGTTTTGTCCCGTCCAAGCACTCCTTTCGCGAGCAGGTCGACCAGCAGATGGACTCCAAGACCGAGGCCAT
T A T G A G C G A G G A G G C G T C G G T T T A A

(SEQ ID NO: 2)

FIG. 3

ES 2 651 313 T3

ATGGCCCTCGACCCTGAGCAGCAGCAGCCCATTTCTCCGTGTCGCGCGAGTTTGGTAAGTCGTCCGGTGAGA
TCTCCCCGAGCGTGAGCCTCTCATTAAAGGAGAACCACGTCCCCGAGAACTACTCCGTTGTTGCCGCCATCCTC
CCCTTCTCTTCCCGGCCCTGGGTGGCCTCCTTTACGGTTACGAGATTGGCGCTACGTCGTGCGCTACGATTTT
CCTTACAGTCCCCCTCCCTCTCCGGCATCTCCTGGTACAACCTCTCCTCCGTGATGTTGGCCTCGTCACTTCCGG
TTCCCTCTACGGTGCTCTGTTTGGCTCCATTGTTGCCTTACCATTGCCGACGTTATTGGCCGTGCAAGGAGCT
TATCCTCGCTGCTCTCCTCTACCTCGTCGGTGCCCTCGTTACCGCTCTCGCCCCTACGTACTCCGTTCTCATCATC
GGCCGTGTCATTTACGGTGTTTCCGTGCGTCTTGCCATGCATGCTGCCCTATGTACATCGCGGAGACCGCCCC
GTCCCCATCCGCGGCCAGCTCGTTTTCCCTCAAGGAGTTTTTCATCGTTCTCGGTATGGTCGGCGGATACGGCA
TTGGTCCCTCACCGTCAACGTCCAACCTCCGGTTGGCGCTACATGTACGCTACCTCCGTTCCCTCGCTGTGATCA
TGGGCATTGGCATGTGGTGGCTTCCCTGCCTCCCCCGTTGGCTCCTCCTCCGCGTCATTACAGGGTAAGGGTAA
CGTTGAGAACCAGCGCGAGGCTGCCATTAAGTCCCTCTGCTGCCTCCGTGGTCCCTGCCTTCGTGCGACTCGGCC
GCCGAGCAGGTCAACGAGATTCTCGCCGAGCTTACCTTCGTTGGCGAGGATAAGGAGGTCACCTTCGGCGAG
CTCTTCCAGGGAAAGTGCCTCAAGGCCCTCATTATCGGCGGGCGGCTTGTCTCTTTACGAGATACCCGGTCA
GCCTTCGGTCTCTACTACGCCCCCTCGATCCTCCAGACTGCGGGCTTCTCCGCCCGGGCGATGCTACCCGCG
TTCCATTCTTCTCGGCCTCCTCAAGCTCATTATGACCGGTGTCGCCGTGTCGTTATCGATCGTCTCGGCCGTC
GCCCTCCTCCTCGGCGGAGTCGGTGGTATGTTTGGTCTTTCTCCTTGGCTCGTACTACCTTTTCTTCA
GCGCTTCCCCGTCGTCGCCGTTGTCGCCCTCCTTCTCTACGTGGGTTGCTACCAGCTCTCCTTTGGCCCCATTG
GCTGGCTTATGATTTCCGAGATTTTTCCCTCAAGCTCCGTGGTCGCGGACTCTCCCTTGGCGTGCTTGTCAACT
TTGGTGCCAACGCCCTCGTACCTTTGCCTTTTCCCTCTCAAGGAGCTCCTCGGCGCCGGCATCCTGTTTTGCG
GCTTTGGCGTTATCTGCGTTCTCTCCCTTGTTTTTATCTTTTTATCGTCCCGGAGACTAAGGGCCTCACGCTCG
AGGAGATCGAGGCGAAGTGCCTCTAA

(SEQ ID NO: 3)

FIG. 4

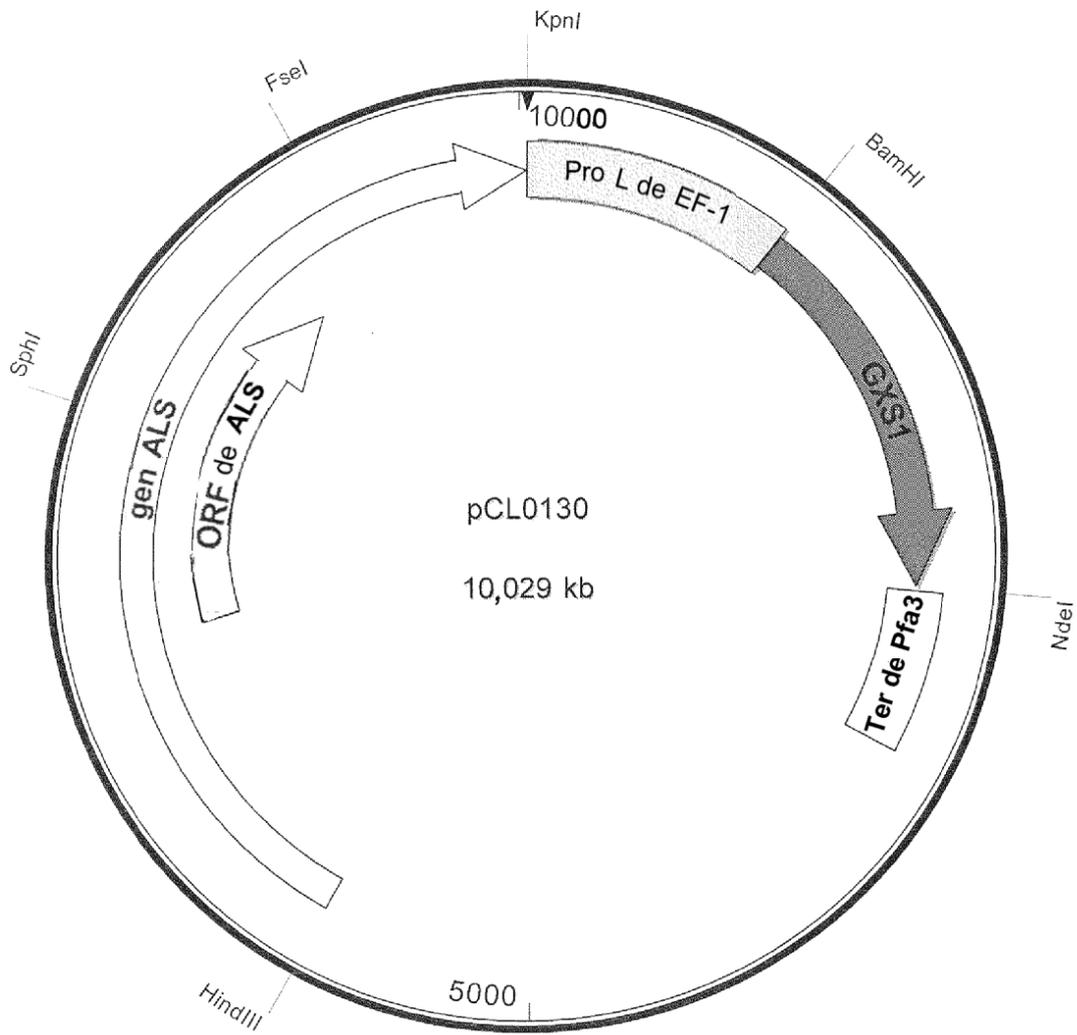


FIG. 5

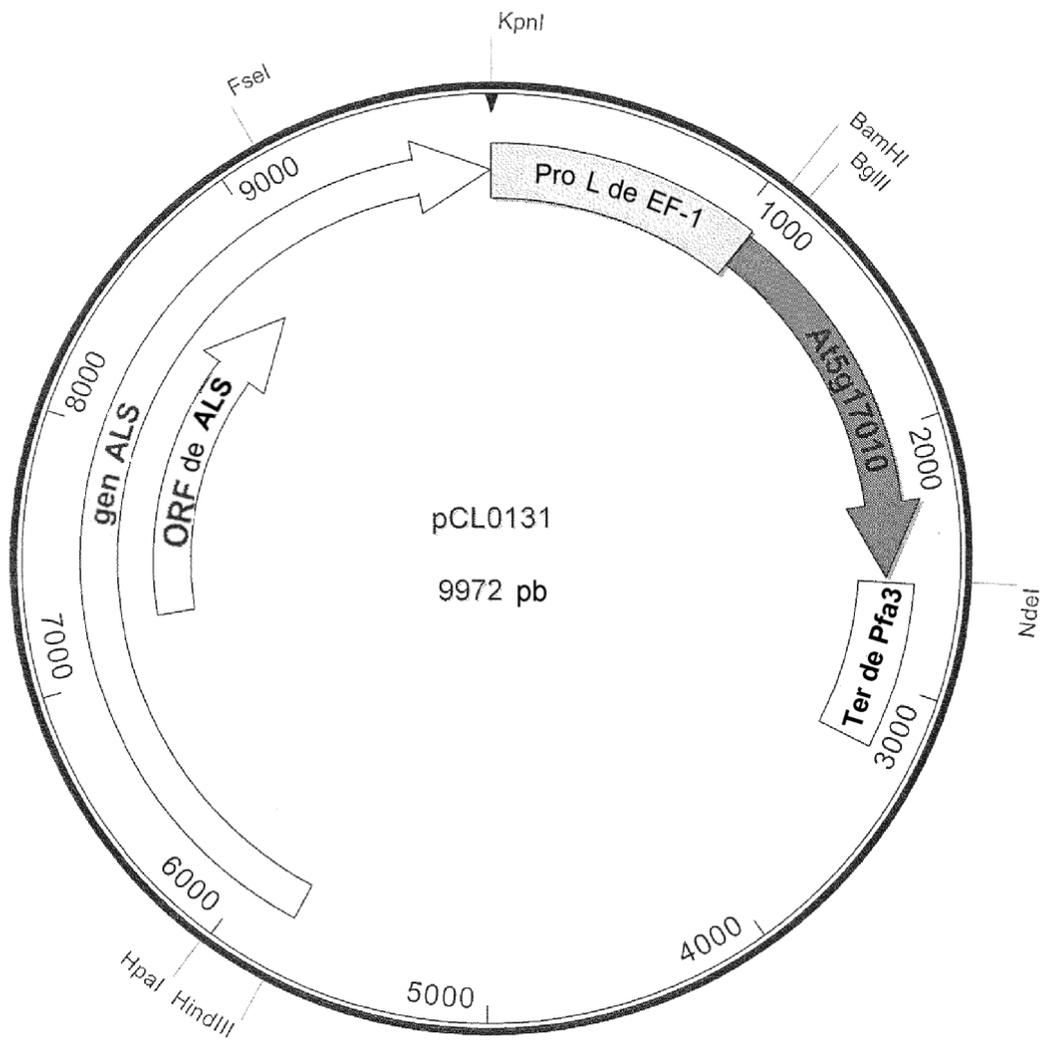


FIG. 6

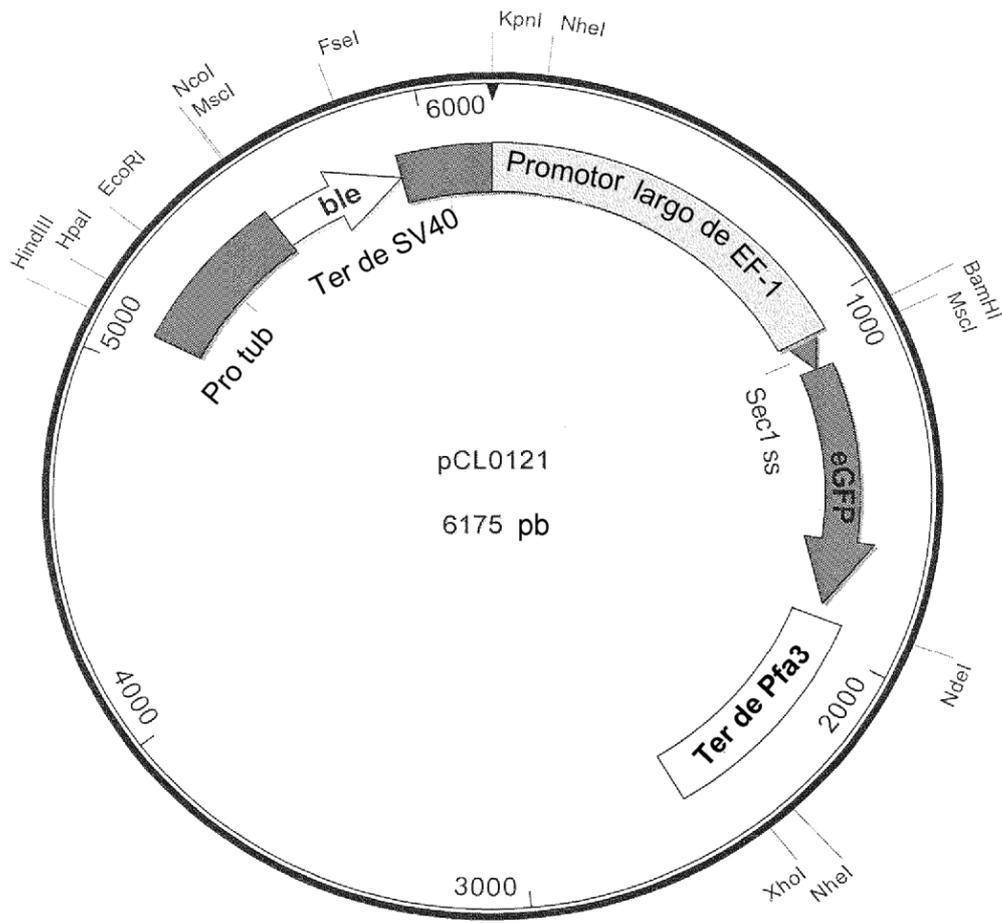


FIG. 9

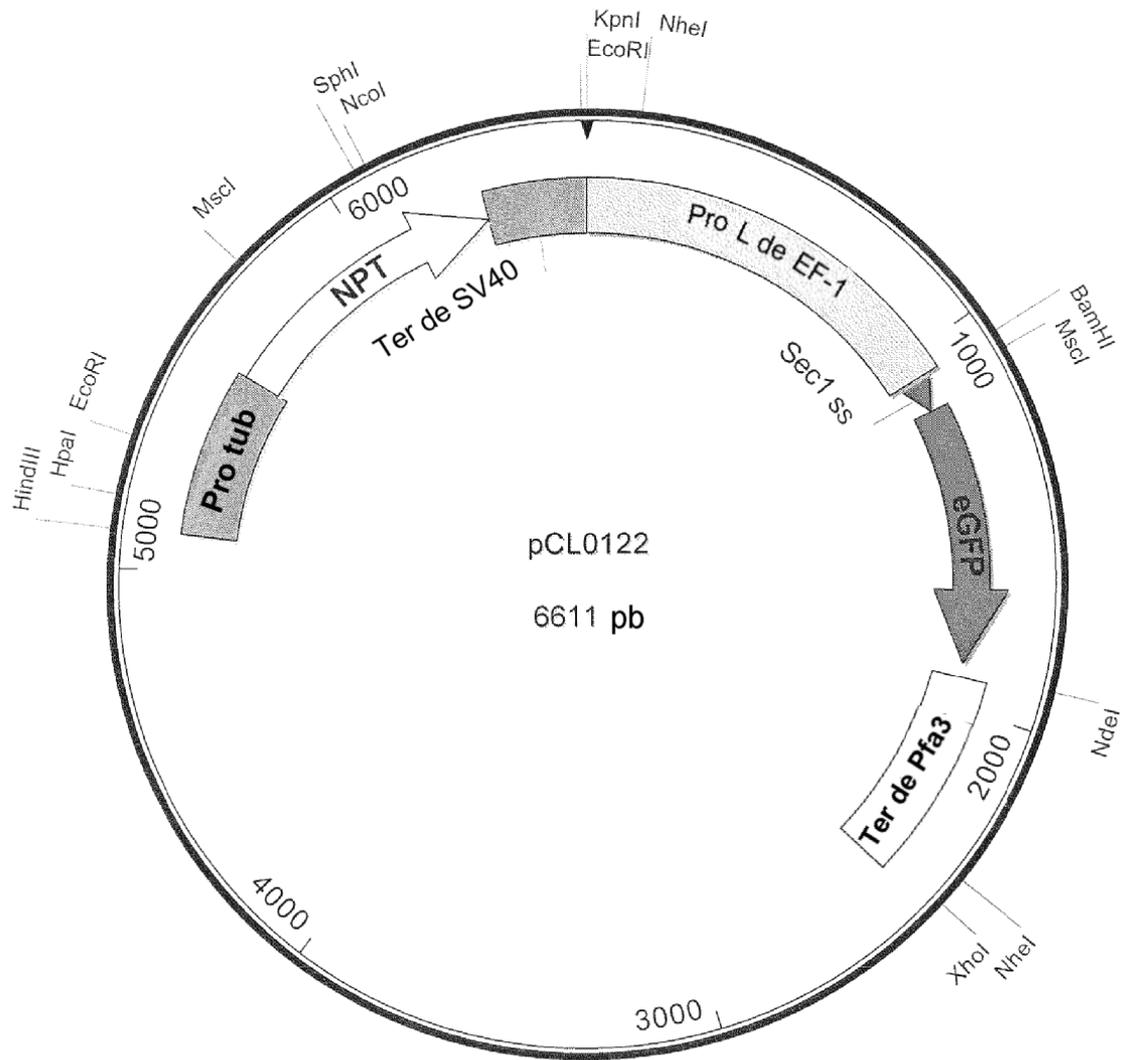


FIG. 10

ES 2 651 313 T3

ATGGCTAAGGAGTACTTCCCCAGATCCAGAAGATTAAGTTCGAGGGTAAGGACAGCAAGAACCCGCTCGCC
TTTCATTACTACGACGCCGAGAAGGAGGTGATGGGCAAGAAGATGAAGGACTGGCTTCGCTTTGCTATGGCT
TGGTGGCACACTCTCTGCGCTGAGGGCGCGGACCAGTTTGGCGGCGGTACGAAGAGCTTCCGTGGAACGAG
GGCACTGACGCTATTGAGATTGCTAAGCAGAAGGTTGACGCTGGTTTCGAGATTATGCAGAAGCTCGGTATTC
CGTACTACTGCTTTCACGATGTCGACCTCGTTTCCGAGGGCAACTCGATCGAGGAGTACGAGTCGAACCTCAA
GGCTGTGGTTGCTACCTCAAGGAGAAGCAGAAGGAGACCCGGAATCAAGCTCCTCTGGAGCACCAGCAACGT
TTTCGGCCACAAGCGCTACATGAACGGCGCCTCCACCAACCCTGACTTCGATGTTGTTGCCCGCGCTATTGTCC
AGATTAAGAACGCCATCGACGCTGGTATCGAGCTCGGAGCCGAGAACTACGTTTTTGGGGCGGACGCGAGG
GTTACATGTCCCTCCTCAACACCGACCAGAAGCGTGAGAAGGAGCACATGGCCACTATGCTTACCATGGCCCCG
CGACTACGCCCCGAGCAAGGGTTTTAAGGGTACTTTTTCTCATTGAGCCGAAGCCCATGGAGCCGACCAAGCAC
CAGTACGACGTCGACACCGAGACCGCCATTGGCTTCCTTAAGGCCACAACCTTGACAAGGATTTTAAGGTGA
ACATCGAGGTTAACCACGCTACGCTTGCCGGCCACACCTTTGAGCATGAGCTCGCCTGCGCTGTTGACGCCGG
AATGCTTGGTTCCATTGACGCCAACCAGCGCGACTACCAGAACGGCTGGGACACCGACCAGTTTCCGATTGAC
CAGTACGAGCTCGTCCAGGCCTGGATGGAGATCATCCGTGGTGGAGGCTTTGTTACCGGTGGTACGAATTC
GACGCCAAGACGCGCCGTAACAGCACGGACCTCGAGGACATCATCATTGCTCATGTGTCGGGCATGGACGCC
ATGGCTCGCGCCCTTGAGAACGCTGCTAAGCTCCTCCAGGAGAGCCCCTACACGAAGATGAAGAAGGAGCGC
TACGCGTCGTTTGACAGCGGAATCGGTAAGGACTTCGAGGATGGCAAGCTCACCTGGAGCAGGTGTACGAG
TACGGTAAGAAGAACGGCGAGCCGAAGCAGACCAGCGGCAAGCAGGAGCTCTACGAGGCCATTGTCGCCAT
GTACCAGTAG

(SEQ ID NO: 6)

FIG. 11

ES 2 651 313 T3

ATGAAGACCGTCGCCGGCATCGATCTTGAACCCAGTCCATGAAGGTTGTCATTTACGACTACGAGAAGAAG
GAGATCATCGAGTCCGCCTCGTGCCCTATGGAGCTCATTAGCGAGTCGGACGGAACCCGCGAGCAGACGACT
GAGTGGTTTGACAAGGGTCTCGAGGTGTGCTTTGGAAAGCTCTCCGCTGATAACAAGAAGACCATTGAGGCG
ATTGGCATCTCCGGCCAGCTCCACGGCTTCGTCCCTCTCGATGCGAACGGAAAGGCGCTCTACAACATCAAGC
TCTGGTGCACACCCGCACTGTGGAGGAGTGCAAGATCATTACTGACGCCGCCGGCGGCGACAAGGCTGTCA
TCGACGCGCTCGGCAACCTCATGCTCACCGGATTCACCGCCCCGAAGATTCTCTGGCTCAAGCGCAACAAGCC
CGAGGCCTTTGCTAACCTCAAGTACATTATGCTGCCCCACGATTACCTCAACTGGAAGCTGACTGGAGACTAC
GTCATGGAGTACGGCGACGCCTCCGGCACCGCCCTTTTTGATTGGAAGAACCGCTGCTGGTGAAGAAGATTT
GCGACATTATTGATCCTAAGCTGCTCGACCTTCTCCCTAAGCTCATTGAGCCCTCGGCCCCCGCCGGTAAGGTC
AACGACGAGGCCGCAAGGCGTACGGCATTCCCGCCGGAATCCCCGTTTCCGCTGGCGGCGGTGATAACATG
ATGGGTGCGGTGCGTACTGGCACCGTGCCTGACGGATTCCCTACGATGAGCATGGGCACCTCCGGAACCTTTT
ACGGCTACTCGGACAAGCCTATTTCCGACCCGGCTAACGGCCTCAGCGGCTTCTGCAGCTCCACGGGCGGCTG
GCTTCCCCTCCTTTGCACCATGAACTGCACCGTCGCCACCGAGTTCGTCCGCAACCTTTTTTTCAGATGGATATCAA
GGAGCTGAACGTCGAGGCTGCTAAGTCCCCCTGCGGCAGCGAGGGCGTTCTTGTATTCTTTCTTCAACGGC
GAGCGCACCCCGAACCTCCCCAACGGCCGCGCTCGATTACCGGCCTCACCTCCGCGAACACGTCCCGCGCCA
ACATCGCTCGCGCTCCTTTGAGTCGGCCGTCTTTGCCATGCGCGGTGGCCTCGATGCGTTTCGTAAGCTCGG
ATTCCAGCCCAAGGAGATTGCCTCATCGGCGGTGGTTGGAAGTCCGACCTCTGGCGCCAGATCGCTGCTGAC
ATTATGAACCTCCCATCCGTGTCCCCTTCTCGAGGAGGCCGCCCTCGGCGGAGCTGTCCAGGCCCTTTG
GTGCCTTAAGAACCAGTCCGGTAAGTGCACATCGTCGAGCTTTGCAAGGAGCATATCAAGATTGACGAGTC
CAAGAACGCCAACCCGATTGCCGAGAACGTGCGCGTGTACGATAAGGCCTACGATGAGTACTGCAAGGTCGT
TAACACGCTCAGCCCTCTGTACGCCTAA

(SEQ ID NO: 7)

FIG. 12

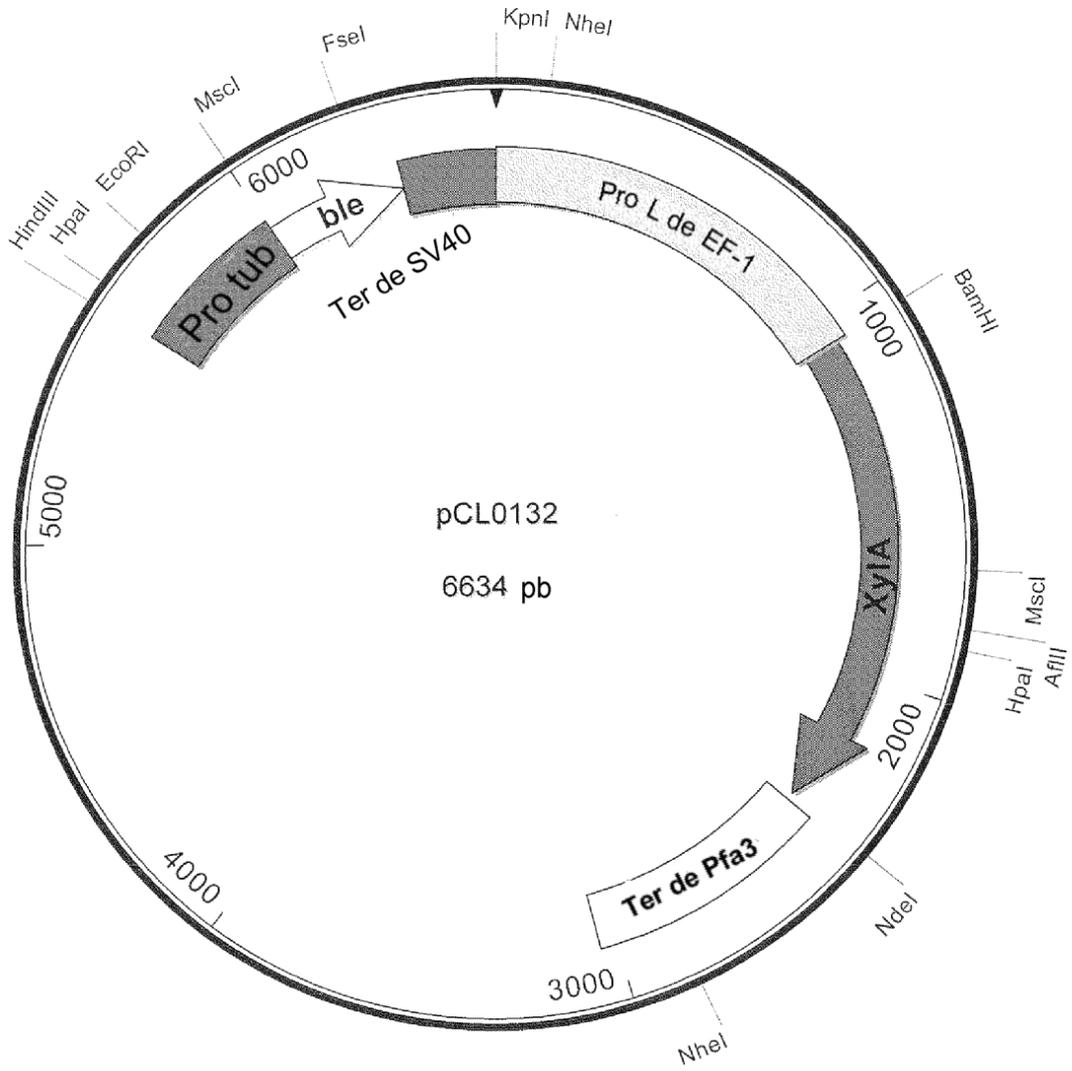


FIG. 13

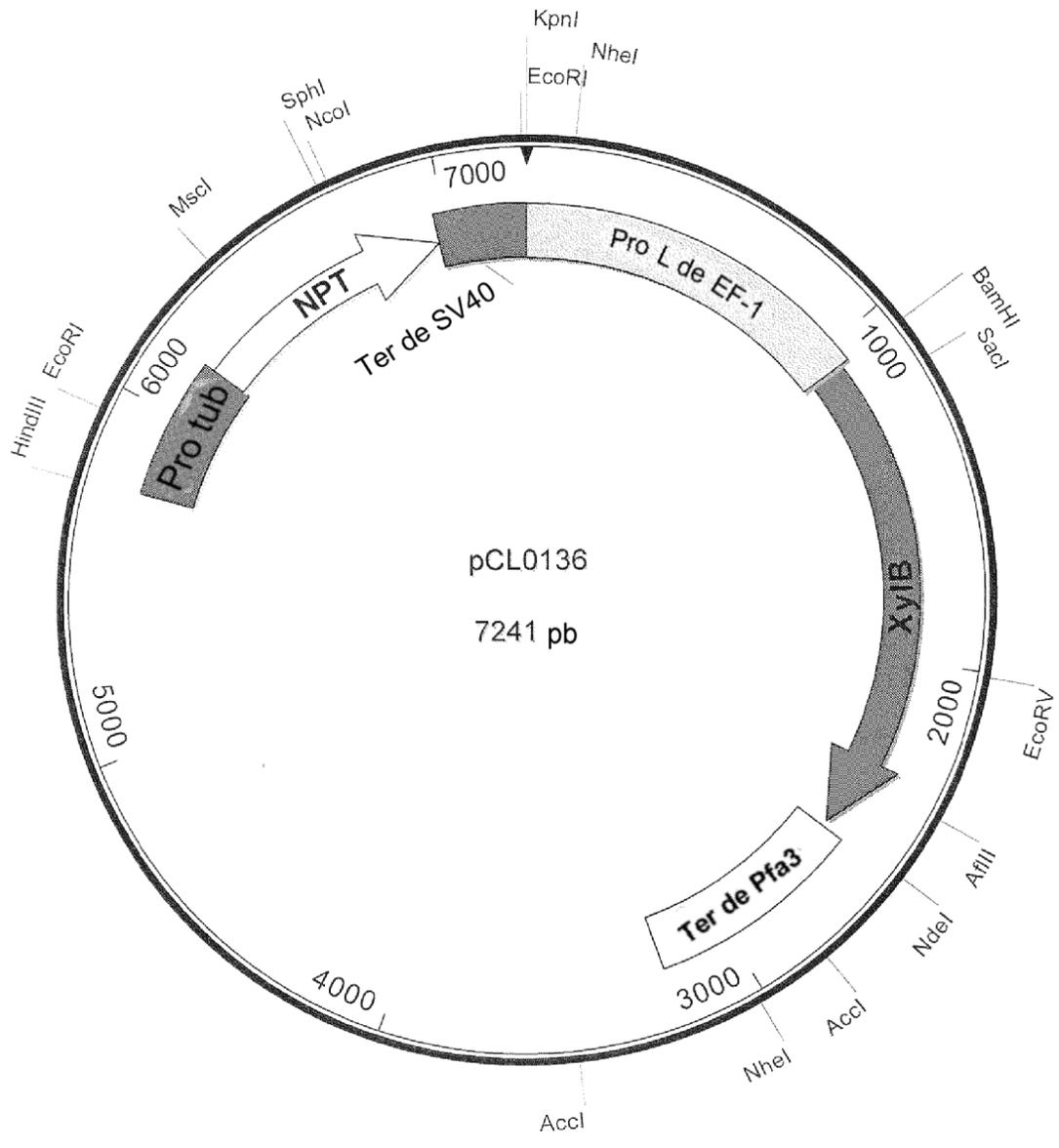


FIG. 14

ES 2 651 313 T3

atgccctccattaagctcaactccggttacgatatgcccgcgcgctcggttttgggt
gctggaaggtggacgtcgacacttgctcggagcagatttaccgcgccattaagac
cggataccgcctctttgacgggtgccgaggactacgccaacgagaagctggtcgga
gccggcgtcaagaaggccattgatgaggaattgtcaagcgcgaggacctcttc
tcacctccaagctctggaacaactaccaccaccccgataacgtcgagaaggctct
taaccgtaccctcagcgatctccaggctcactacgtcgatctttttcttattcac
ttccctgtcacgttcaagtttgctccctcttgaggagaagtaccccccggtattct
actgcggaaagggcgataaactttgactacgaggacgttcttattctggagacttg
gaaggctctcgagaagctcgtcaaggccggcaagattcgcagcatcggcgtcagc
aactttcctggagctctcctcctggacctccttcgcggagccaccatcaagcctt
cggttcttcaggctcgagcaccatccttaccttcagcagccccgtctcatcgagtt
tgcccagtcccgcggtattgccgtcacggcctacagctccttcggccctcagtc
tttgctcgagctcaaccagggctcgcgcccttaacaccagccccctcttcgagaacg
agaccattaaggccatcgtgctaagcacggtaagtccccgcgccaggctctcct
ccgttgagctcgcagcgcggaatcgccatcatccctaagagcaaacaccgtcctt
cgcttcttgagaacaaggatgtcaactccttcgacctcgatgagcaggatttcg
ccgacattgccaaagctcgatattaacctccgcttcaacgacccccgggactggga
taagatccctatctttgtctaa

(SEQ ID NO:21)

FIG. 15

ES 2 651 313 T3

atgactactacgccggttgacgctcccgacaagctctttcttggcttcgatctctcc
accagcagcttaagattatcgtcactgacgagaacctcgccgctctcaagacctac
aacgtcgagtttgatagcattaactccagcgtccagaagggtgtgatcgccattaac
gatgagatcagcaaggagccatcatcagcccgggtctacatgtgggtcgacgctctc
gatcacgtcttcgaggatatgaagaaggacgggttcccctttaacaagggtggtcgga
atctccggctcgtgccagcagcagcgggttcgggtctactggtcgcgcactgctgagaag
gttctctccgagcttgacgccgagtcctccctctcgtcccagatgcgctccgcttt
actttcaagcacgcccccaactggcaggaccactcgaccggcaaggagctcgaggag
tttgagcgcgctcatcggcgccgacgccctcgctgacatctccggtagccgccccac
taccgctttactggccttcagattcgcaagctctcgaaccttttaagcccgagaag
tacaaccgcacggcccgcatttccctgggtctccagcttcgtcgttccgctctctg
ggtcgcattacgtccatcgaggaggctgacgcttgccgcatgaacctctacgacatc
gagaagcgcgagttcaacgaggagcttctcgccattgcgggtgggtgtccaccccgag
ctggacgggtgtcgagcaggacgggtgagatctaccgcgccggtattaacgagctcaag
cgtaagctcggccctgtcaagcccatcacctacgagtcggaggagacatcgccctcc
tacttcgtcaccgcgtacgggttttaaccctgactgcaagatctactcgtttactgga
gacaacctcgccaccatcatctcccttctcttgccccgaacgacgccctcatcagc
cttggcacctccaccaccgtgcttatcatcaccaagaactacgccccgctcgtcccag
taccacctctttaagcaccgcgacgatgcccgaccactacatgggaatgatttgctac
tgcaacgggtccctcgcccggtgagaagggttcgcgacgaggttaacgagaagttaac
gtcgaggacaagaagtctgtgggacaagtttaacgagatcctcgacaagagcaccgat
tttaacaacaagctcggcatctacttcccgtcggagagattgtccctaacgctgcg
gcccagattaagcgtcgggtccttaactcgaagaacgagatcgtcgacgctcgagctc
ggagataagaactggcagcctgaggacgatgtgagcagcattggttgagtcccagacc
ctttcgtgccgctccgcacgggcccgatgctctccaagtcgggtgatctctccgct
tcgtcgtccgctcgccccagcccgaggagatggcacggacctccacaaggtttac
caggacctcgttaagaagttcggcgacctcttcaccgatggtaagaagcagactttt
gagtcctcaccgccccgccccaacgctgctactacgtcgggtggcgccagcaacaac
ggctcgatcatcctcaagatgggcagcattctcgcccctgtgaacggtaactacaag
gtcgatatcccgaacgcgtgcgcccttggcggagcttacaaggcgtcgtggagctac
gagtgcgaggccaagaaggagtggattggctacgatcagtacattaaccgcttttc
gagggtgtccgatgagatgaacagctttgagggtcaaggacaagtggtcagagtacgct
aacggcgtgggcatgctcgccaagatggagtccgagctcaagcactga

(SEQ ID NO: 22)

FIG. 16

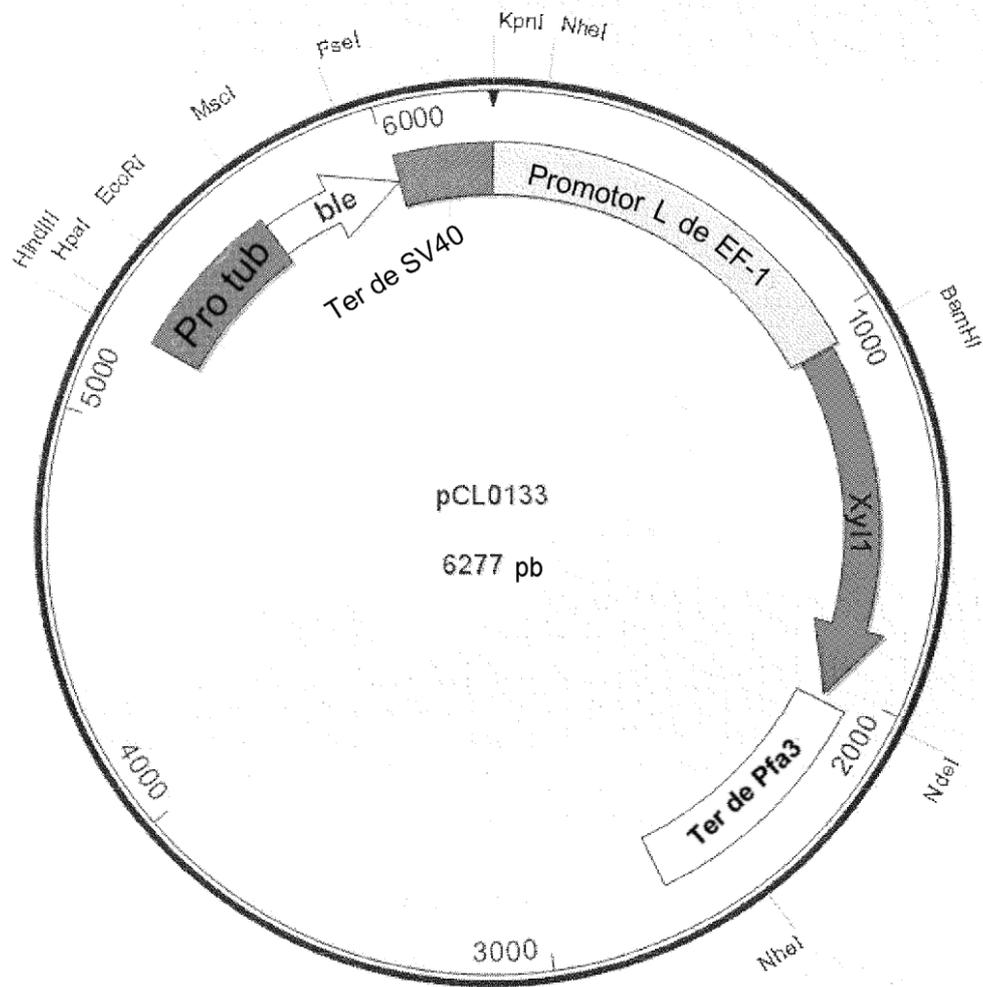


FIG. 17

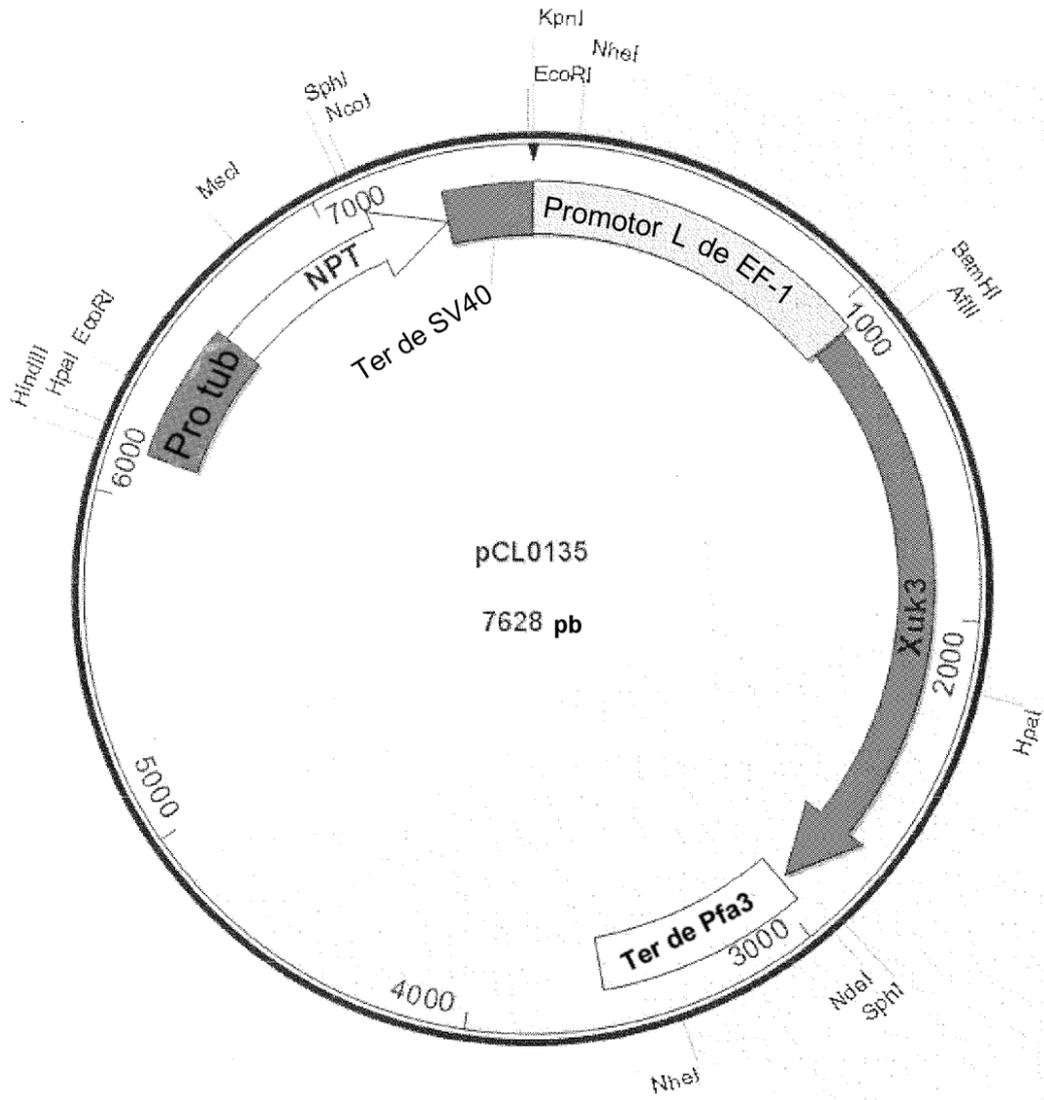


FIG. 18

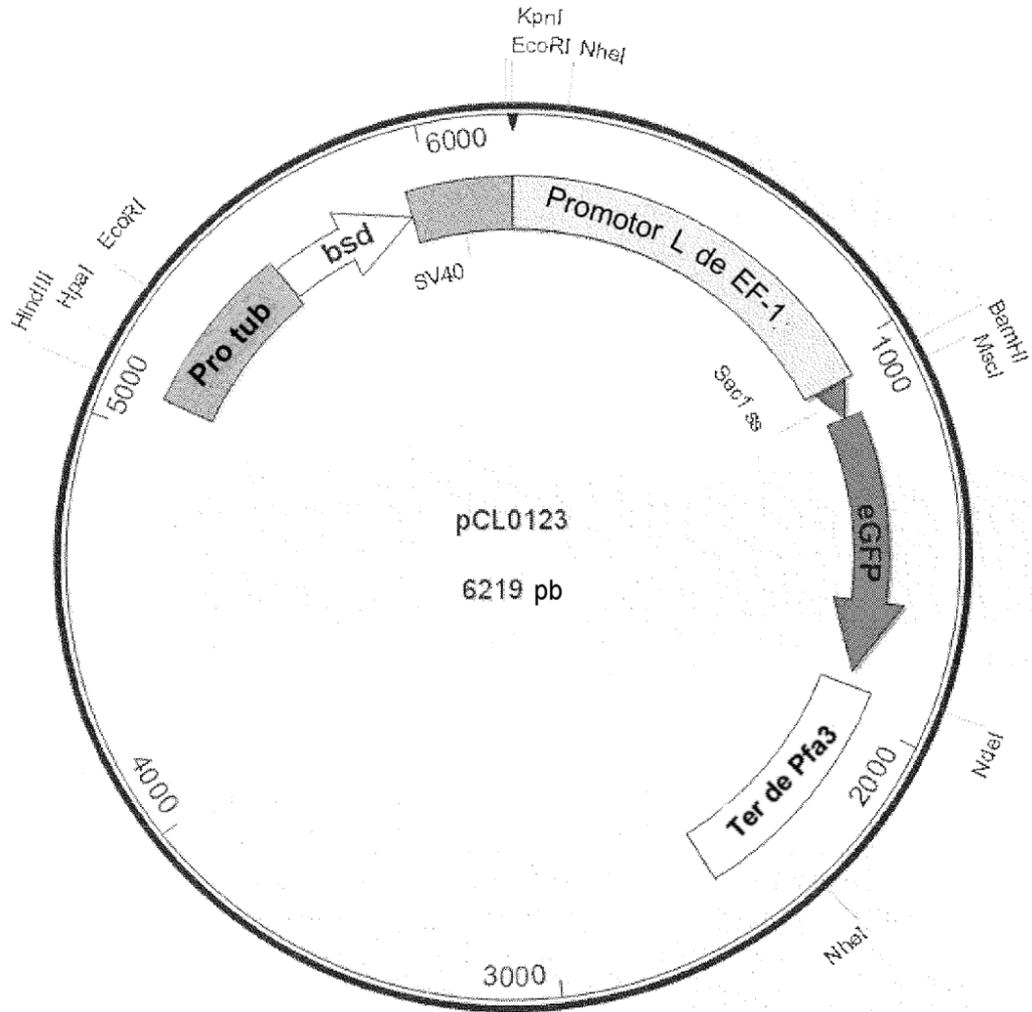


FIG. 19

ES 2 651 313 T3

atgaccgccaacccgagcctcgtccttaacaagatcgacgatatttccttcga
gacctacgacgccccgagatcagcgagcccaccgatgtcctcgtccaggtta
agaagaccggcatctgcggttccgatattcacttttacgctcacggaacgatt
ggaaactttgtcctcactaagcctatgggtctctgggtcacgagtcgcccggta
tgtcgttcagggtgggaaaggggttacgctcgcttaaggtcggagacaacgctg
ccatcgagcccggcatccccagccgctttccgatgagtacaagtcgggtcac
tacaacctctgccccacatggctttcgccgcccacccccaaactccaaggagg
cgagcctaaccccccgggcacctctgcaagtactttaagtccccgaggatt
ttctcgtcaagctccccgaccacgtctcgtctgagctgggcccctcgtcgag
cccctgtcgtcggagttcacgccagcaagctcggtagcgttgccctttggcga
ctacgtggccgctttttggcgccgggtcctgtcggccttctcgccgcccgtgtg
ccaagacctttggagccaagggcgctatcgtcgtcgacatttttgacaacaag
ctcaagatggctaaggatattggcgccgctactcatacctttaactccaagac
cggcgggttccgaggagcttatcaaggcctttggcggtaacgtcccgaacgctg
tctcagagtgcaccggagccgagccctgcattaaagctcggagtggtatgccatc
gcccctggtggacgctttgtccagggtggtaacgccgcccgggtcccgtcagctt
cccgatcacgcttttcgctatgaaggagctcaccctcttcggcagcttccgctt
acggctttaacgactacaagaccgcccgtgggcatctttgacaccaactaccag
aacggacgtgagaacgcccctatcgattttgagcagctgattaccacacgctta
caagtttaaggacgccattgaggcctacgacctcgtccgcccgtggcaagggag
ccgtcaagtgcctcatcgatgggtcccagtgga

(SEQ ID NO:23)

FIG. 20

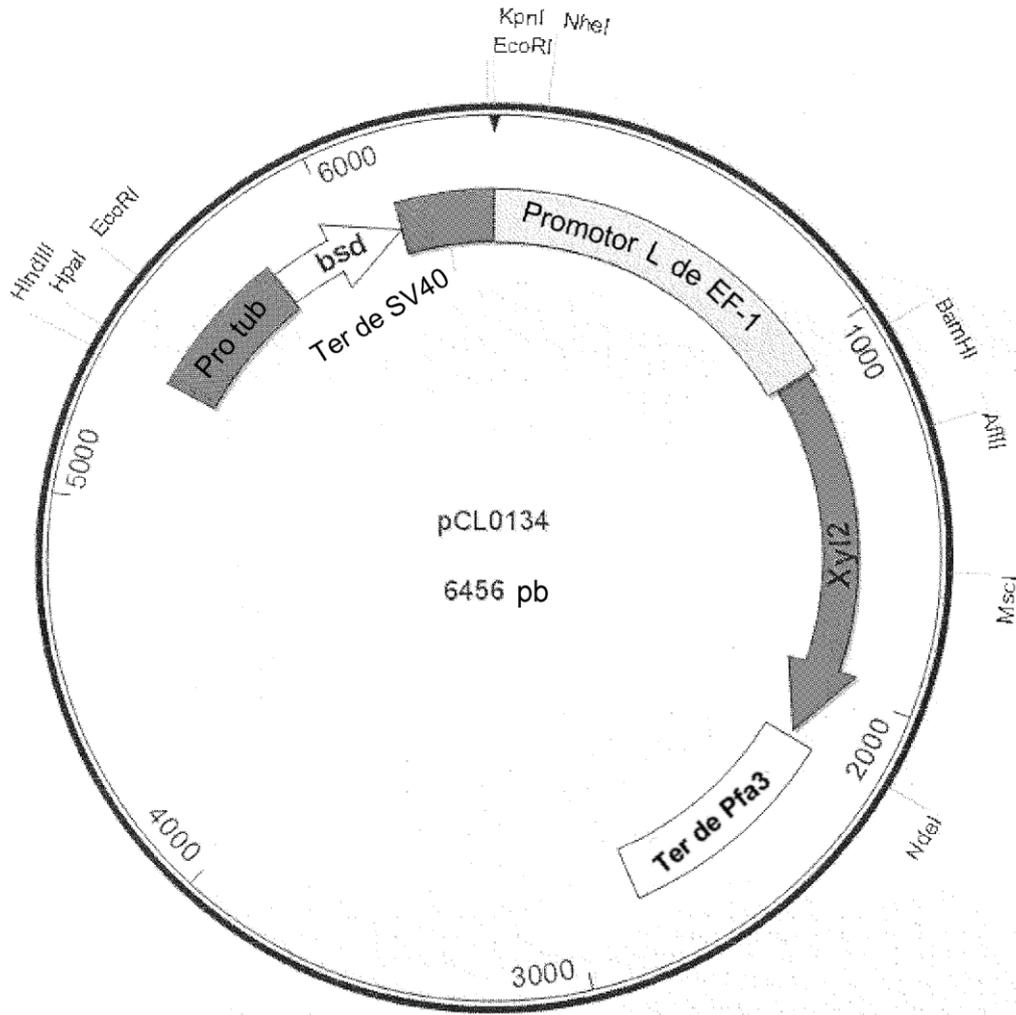


FIG. 21

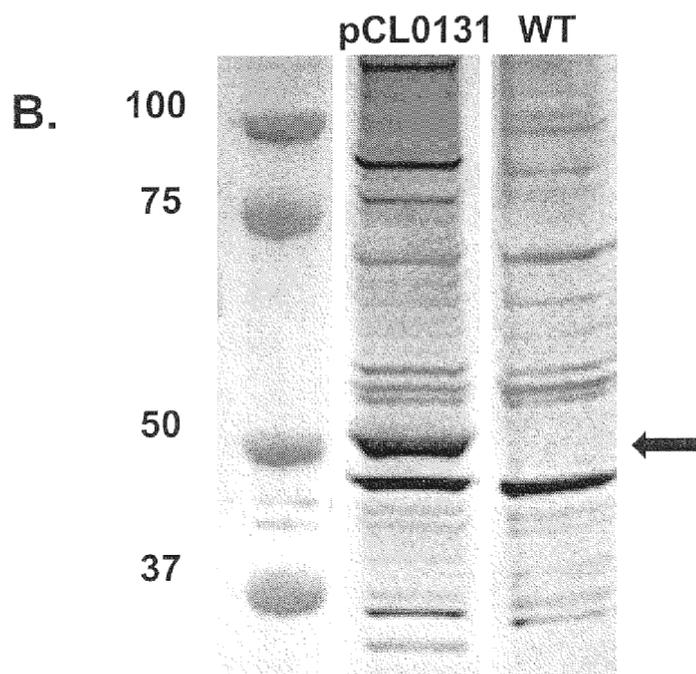
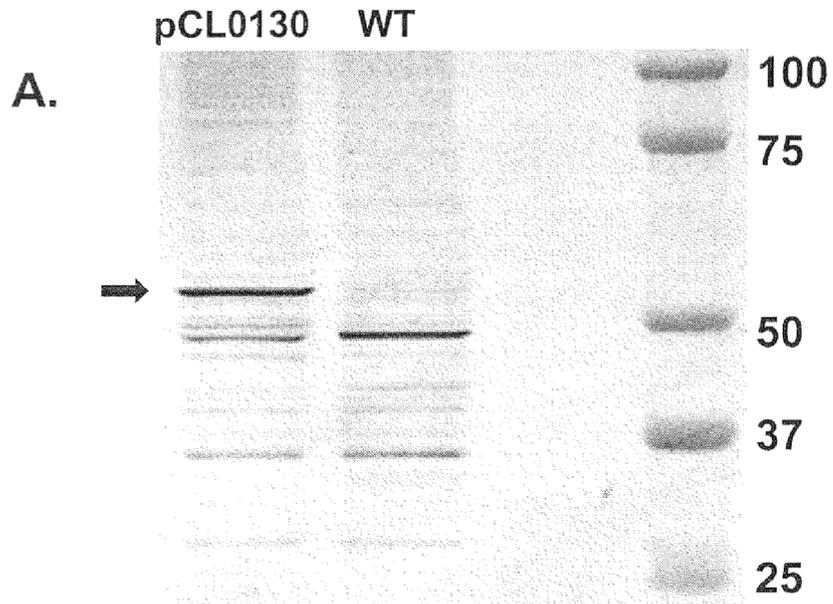


FIG. 22