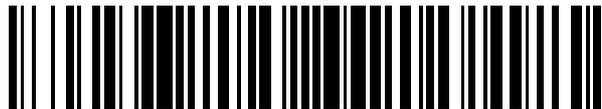


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 892**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12P 17/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2013 PCT/KR2013/000030**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13103246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2013 E 13733832 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2801612**

54 Título: **Microorganismo recombinante que produce ácido quinolínico y procedimiento de producción de ácido quinolínico mediante su uso**

30 Prioridad:

06.01.2012 KR 20120001845

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

28.02.2018

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
330 Dongho-ro Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**SHIN, YONG UK;
KIM, SO YOUNG;
HEO, IN KYUNG;
KIM, JU EUN;
SON, SUNG KWANG;
LEE, JAE HEE;
LEE, JI HYUN y
KIM, CHANG GYEOM**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 656 892 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

Microorganismo recombinante que produce ácido quinolínico y procedimiento de producción de ácido quinolínico mediante su uso

Antecedentes de la invención**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante que produce ácido quinolínico y un procedimiento para producir ácido quinolínico mediante su uso.

Descripción de la técnica relacionada

10 El ácido quinolínico, también denominado ácido 2,3-piridindicarboxílico, tiene una gran diversidad de aplicaciones como precursor de sustancias químicas sintéticas en la producción de productos medicinales o agrícolas, colorantes o similares.

15 El ácido quinolínico se puede preparar a través de procedimientos de síntesis química o biológica. Dado el uso de materiales no renovables derivados del petróleo como materia prima, los procedimientos de síntesis química están asociados a problemas medioambientales, los precios del petróleo, así como los costes unitarios de la extracción del petróleo.

20 Como ejemplo de un procedimiento de síntesis biológica representativo, se desvela un procedimiento para producir ácido quinolínico en una cepa de *E. coli* en la que se potencia la expresión de genes que codifican L-aspartato oxidasa (NadB) y quinolinato sintasa (NadA) clonando un plásmido que tiene diferentes números de copias de los dos genes en *E. coli*, del que se elimina la actividad quinolinato fosforibosiltransferasa (Eur. J. Biochem. 175, 221-228 (1988), DE3826041). A este respecto, la concentración de ácido quinolínico producido es tan solo 500 mg/l o menos. La primera razón de esta baja producción de ácido quinolínico es la supresión transcripcional mediante NadR, que es un represor transcripcional relacionado con NAD de nadB que codifica L-aspartato oxidasa y nadA que codifica quinolinato sintasa. La segunda razón es la inhibición por retroalimentación de L-aspartato oxidasa, proteína NadB mediante NAD. Y la tercera razón es una ruta de biosíntesis débil para las fuentes de carbono para dar ácido L-aspártico en *E.coli*.

30 Para resolver la primera razón, en la patente coreana abierta No. 10-2012-0082673, se utiliza una cepa de microorganismo para aumentar la producción de ácido quinolínico a 5,5 g/l, en la que se sustituyen las regiones promotoras de L-aspartato oxidasa (NadB) y quinolinato sintasa (NadA), que son los genes de síntesis de quinolinato suprimidos al nivel transcripcional, por un promotor constitutivo y se potencia la ruta de biosíntesis de ácido L-aspártico.

La solicitud de patente europea No. 88101442.7 desvela un proceso para la preparación de ácido quinolínico utilizando microorganismos modificados por ingeniería genética. Para este fin, se aíslan y determinan primero secuencias de ADN que codifican para la correspondiente biosíntesis. Estas secuencias de ADN se insertan a continuación en plásmidos y los plásmidos así obtenidos se incorporan en organismos huésped.

35 La ruta de biosíntesis de ácido quinolínico a partir de ácido L-aspártico a través de un procedimiento de síntesis biológica es tal como se muestra en el siguiente esquema de reacción:

1) L-aspartato oxidasa (NadB)



2) quinolinato sintasa (NadA)

40 $\alpha\text{-iminosuccinato} + \text{dihidroxiacetona fosfato} \rightleftharpoons \text{ácido quinolínico} + \text{fosfato} + 2\text{H}_2\text{O}$

45 $\alpha\text{-iminosuccinato}$ como producto intermedio de la ruta de biosíntesis de ácido quinolínico es una sustancia inestable y se convierte en oxaloacetato a través de una reacción de desaminación natural en las células (THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 257, No. 2, publicación del 25 de enero. pp. 626-632, 1982). En general, cuando se utiliza un metabolito intermedio inestable como sustrato, la baja frecuencia de colisión entre el sustrato y la enzima produce una gran cantidad de subproductos. Sin embargo, hasta ahora, no ha habido ninguna tentativa para resolver dicho problema en relación con la producción de ácido quinolínico.

50 Por otra parte, se ha empleado para diversos fines una tecnología de proteínas de fusión con la unión de enzimas o proteínas heterogéneas a través de un engarce de aminoácido para expresar una única proteína, como por ejemplo aumentando el nivel expresión de la proteína uniendo una proteína que presenta un bajo nivel de expresión con una proteína que presenta un alto nivel de expresión, aumentando el rendimiento de purificación de proteína preparando una proteína de fusión unida con una etiqueta o similar.

Se sabe que el diseño del engarce es importante en la preparación de proteínas de fusión. En general, se ha venido utilizando frecuentemente un engarce helicoidal que tiene una estructura en hélice alfa o un engarce flexible que tiene flexibilidad estructural y, por ejemplo, se pueden diseñar y utilizar diversos engarces por combinación de los dos engarces de acuerdo con las características de la proteína de fusión que se vaya a conseguir.

5 Los autores de la presente invención han tratado de resolver la menor reacción debido a metabolitos inestables mediante la expresión de una proteína de fusión de NadB y NadA unidos a través de diversos tipos de engarces aminoácido y, en consecuencia, han observado que el ácido quinolínico se puede producir en un alto rendimiento por expresión de la proteína de fusión, en comparación con el rendimiento del procedimiento de producción biológica convencional, en virtud de lo cual han completado la presente invención.

10 **Sumario de la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo recombinante que produce ácido quinolínico, que expresa una proteína de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidas a través de un engarce.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir ácido quinolínico, que incluye las etapas de cultivar el microorganismo recombinante y recuperar el ácido quinolínico producido durante el cultivo.

15 **Breve descripción de los dibujos**

FIG. 1 presenta la estructura de una proteína de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa de acuerdo con una realización específica de la presente invención;

FIG. 2 presenta una estructura de plásmido pPro-NBA, pNBHL1A, pNBHL2A, pNBHL3A, pNBHL4A, pNBHL5A, pNBFL3A o pNBFL4A; y

20 FIG. 3 presenta una estructura de pCPA que es un plásmido que expresa genes que codifican fosfoenolpiruvato carboxilasa y L-aspartato aminotransferasa.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

25 En uno de sus aspectos, la presente invención proporciona un microorganismo recombinante que produce ácido quinolínico, que expresa una proteína de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidas a través de un engarce.

La L-aspartato oxidasa (en adelante, se hace referencia a ella como 'NadB') es una enzima que tiene actividad para oxidar ácido L-aspartico en ácido iminosuccínico y puede tener una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 42 o una secuencia de aminoácidos que tiene una alta homología con ella.

[Actividad de L-aspartato oxidasa]

30 Ácido L-aspartico + fumarato \Leftrightarrow α -iminosuccinato + succinato + H⁺

o

Ácido L-aspartico + oxígeno \Leftrightarrow peróxido de hidrógeno + α -iminosuccinato + H⁺

35 La secuencia del gen nadB que codifica esta enzima se puede obtener a partir de la secuencia del genoma de *Escherichia coli* (GI: 89109380) tal como se publica en la bibliografía (Mol Syst Biol. 2006;2:2006.0007. Epub 2006 Feb 21) o la base de datos disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) o el Banco de datos de ADN de Japón (DDBJ).

La quinolinato sintasa (en adelante se hace referencia a ella como 'NadA') es una enzima que tiene actividad para sintetizar ácido quinolínico a partir de ácido iminosuccínico y puede tener una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 43 o una secuencia de aminoácidos que tiene una alta homología con ella.

40 [Actividad de quinolinato sintasa]

α -iminosuccinato + dihidroxiacetona fosfato \Leftrightarrow ácido quinolínico + fosfato + 2H₂O

La secuencia del gen nadA que codifica esta enzima se puede obtener de la secuencia del genoma de *Escherichia coli* (gi: GI: 89109380) tal como se publica en la bibliografía (Mol Syst Biol. 2006; 2:2006.0007. Epub 2006 Feb 21) o la base de datos disponible en el NCBI o DDBJ.

45 Si se potencian las actividades de NadB y NadA, puede aumentar la acumulación de α -iminosuccinato como el precursor de ácido quinolínico y la biosíntesis de ácido quinolínico a partir de α -iminosuccinato en las células, aumentando así la producción de ácido quinolínico. Sin embargo, aunque se aumentan las actividades y los niveles de expresión de las dos enzimas (NadB y NadA), la baja frecuencia de colisión entre el sustrato y la enzima produce una gran cantidad de productos secundarios ya que α -iminosuccinato es un metabolito inestable. En consecuencia, es difícil producir eficientemente ácido quinolínico, según lo esperado. Para resolver este problema, en la presente

invención, se unen NadB y NadA entre sí a través de un engarce y se expresan en una cepa en forma de una proteína de fusión, produciendo así ácido quinolínico en un alto rendimiento.

5 NadB y NadA pueden tener una secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO. 42 y 43, respectivamente. Sin embargo, dependiendo de la especie o la cepa del microorganismo, puede haber diferencias en la secuencia de aminoácidos de proteínas que presentan la actividad y, por tanto, no se limitan a ellas. Es decir, siempre y cuando se proporcione NadB y NadA en forma de una proteína de fusión preparada por la unión entre sí a través de un engarce para contribuir a un aumento de la productividad de ácido quinolínico, pueden ser variantes mutantes o artificiales que tienen una secuencia de aminoácidos modificada como resultado de sustitución, delección, inserción o adición de un aminoácido o varios aminoácidos en una o más posiciones de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO. 42 y 43. En el presente documento, el término "varios" puede variar dependiendo del tipo o posiciones de restos de aminoácido en la estructura tridimensional de la proteína y en los detalles. Puede ser de 2 a 20, específicamente de 2 a 10 y, más específicamente, de 2 a 5. Asimismo, las sustituciones, delecciones, inserciones, adiciones o inversiones de aminoácidos pueden incluir mutantes de origen natural o variantes artificiales sobre la base de diferencias individuales y/o las diferencias ente especies del microorganismo que expresa el polipéptido.

10 Los polinucleótidos que codifican las enzimas NadB y NadA pueden ser polinucleótidos que codifican las proteínas que tienen 80 % o más de homología, específicamente 90 % o más de homología, más específicamente 95 % o más de homología, mucho más específicamente 97 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO. 42 y 43, siempre y cuando tengan actividades enzimáticas de NadB y NadA, tal como se muestra en el Esquema de Reacción anterior. Sobre todo, específicamente, los polinucleótidos pueden tener secuencias de polinucleótidos representadas por SEQ ID NO. 27 y SEQ ID NO. 28, respectivamente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "homología" se refiere a la semejanza entre dos secuencias de aminoácidos y se puede determinar a través de un procedimiento ampliamente conocido entre las personas especializadas en la técnica, BLAST 2.0, que calcula parámetros como la puntuación, la semejanza y la similitud.

25 La secuencia de polinucleótidos que codifica la enzima NadB o NadA puede ser la secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO. 27 o SEQ ID NO. 28 o hibridarse con una sonda que se puede preparar a partir de la secuencia de polinucleótidos en "condiciones rigurosas" y puede ser una variante que codifica una proteína que funciona normalmente.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "condiciones rigurosas" significa condiciones que permiten hibridación específica entre polinucleótidos. En Molecular Cloning (A Laboratory Manual, J. Sambrook y col., Editors, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) o Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., Editors, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York) se desvela una descripción detallada y, por ejemplo, hibridación en un tampón de hibridación (3,5 x SSC, 0,02% Ficoll, 0,02% polivinilpirrolidona, 0,02% albúmina de suero bovino, 2,5 mM NaH₂PO₄ (pH 7), 0,5% SDS, 2 mM EDTA) a 65 °C. SSC es cloruro sódico 0,15 M / citrato sódico 0,15 M a pH 7. Tras la hibridación, se lava la membrana a la que se ha transferido el ADN con 2 x SSC a temperatura ambiente y después se lava con 0,1 a 0,5 x SSC/0,1 x SDS a 68 °C.

35 La proteína de fusión de la presente invención es un polipéptido, en el que se unen L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa que tienen diferentes actividades entre sí a través de un engarce de aminoácido y que tiene actividad de biosíntesis de ácido quinolínico a partir de ácido L-aspartico, tal como se expone en el siguiente Esquema de Reacción.

[Actividad de proteína de fusión]

Ácido L-aspartico + oxígeno + dihidroxiacetona fosfato \Leftrightarrow ácido quinolínico + fosfato + 2H₂O + peróxido de hidrógeno

45 Si se potencia la actividad de la proteína de fusión, se mejora el índice de conversión de ácido quinolínico a partir de α -iminosuccinato, metabolito intermedio, produciendo así ácido quinolínico con una productividad mucho más alta que la productividad conseguida con la potenciación de las actividades de NadB y NadA por separado.

50 La proteína de fusión puede ser un polipéptido preparado por unión del término N de L-aspartato oxidasa y el término C de quinolinato sintasa a través de un engarce o un polipéptido preparado por unión del término C de L-aspartato oxidasa y el término N de quinolinato sintasa a través de un engarce y, específicamente, la proteína de fusión puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO. 47, 48, 49, 50, 51, 52 y 53.

55 El engarce está situado entre los polipéptidos NadB y NadA o entre los genes que los codifican y puede ser un engarce helicoidal o flexible. Por otra parte, como engarce, el engarce helicoidal o flexible puede utilizarse en solitario o en combinación. Como engarce helicoidal, se puede utilizar "EAAAK" o "EAAAR" y como engarce flexible, se pueden utilizar "GGSGGS", "GGGS", "GGSG" o "GS" pero no se limitan a ellos.

El engarce puede estar compuesto por 5 a 30 secuencia de aminoácidos y el engarce helicoidal o flexible puede

utilizarse de forma simple o repetida.

De acuerdo con una realización específica, un engarce que contiene un engarce helicoidal puede ser LA(EAAAK)_nAAA y un engarce que contiene el engarce flexible puede ser L(GGGS)_nAAA. Preferentemente, n puede ser un número entero de 1 a 5.

- 5 De acuerdo con una realización específica, el engarce puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO. 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 60 o una secuencia de aminoácidos que tiene una alta homología con ella, pero no se limita a ellas.

10 El "microorganismo recombinante que produce ácido quinolínico" de la presente invención es un microorganismo que puede producir y acumular ácido quinolínico desde una fuente de carbono en un medio y expresa la proteína de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidas a través de un engarce, produciendo así ácido quinolínico con una alta productividad.

El microorganismo recombinante de la presente invención se puede preparar para expresar una proteína de fusión introduciendo un polinucleótido que codifica la proteína de fusión.

15 De acuerdo con una realización específica, el microorganismo recombinante de la presente invención puede prepararse por transformación utilizando un vector recombinante que comprende el polinucleótido que codifica la proteína de fusión.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "transformación" significa que se introduce un gen en una célula huésped de manera que pueda expresarse en la célula huésped. El gen transformado puede localizarse en cualquier lugar sin limitación, ya se inserte en el cromosoma de una célula huésped o esté localizado fuera del cromosoma, siempre y cuando pueda expresarse en la célula huésped. Asimismo, puede introducirse el gen en cualquier forma, siempre y cuando pueda introducirse y expresarse en una célula huésped. Por ejemplo es posible introducir el gen en una célula huésped en forma de un casete de expresión que es una estructura de polinucleótido que incluye todos los elementos requeridos para auto-expresión. El casete de expresión comprende generalmente un promotor unido operativamente con el gen, una señal de terminación de la transcripción, un sitio de unión a ribosoma y una señal de terminación de la traducción. El casete de expresión puede presentarse en forma de un vector de expresión auto-replicable. Asimismo, es posible introducir el gen en una célula huésped en forma de una estructura de polinucleótido y puede estar unido operativamente a una secuencia requerida para la expresión en la célula huésped.

30 El vector recombinante es un medio para expresar la proteína de fusión introduciendo un ADN en una célula huésped para preparar un microorganismo que expresa la proteína de fusión de la presente invención y se puede utilizar un vector de expresión conocido, como por ejemplo un vector plásmido, un vector cósmido o un vector bacteriófago. Las personas especializadas en la técnica pueden preparar fácilmente el vector de acuerdo con cualquier procedimiento conocido aplicando la tecnología de recombinación de ADN.

35 Específicamente, el vector recombinante puede ser un vector plásmido pNBHL1A, pNBHL2A, pNBHL3A, pNBHL4A, pNBHL5A, pNBFL3A o pNBFL4A que tiene un el mapa de escisión de la FIG. 2 y más específicamente, el vector plásmido puede incluir una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, respectivamente.

40 De acuerdo con una realización específica, el microorganismo que produce ácido quinolínico puede ser un microorganismo que pertenece a *Enterbacter* sp., *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp. o *Brevibacterium* sp.. Específicamente un microorganismo que pertenece a *Escherichia* sp. y más específicamente *E.coli*, pero sin limitarse a ellos.

El microorganismo de la presente invención puede modificarse además para debilitar la actividad de quinolinato fosforibosiltransferasa, en comparación con la actividad endógena del mismo. En este sentido, la expresión "actividad endógena" significa la actividad de quinolinato fosforibosiltransferasa en un microorganismo nativo.

45 NadC tiene actividad para convertir ácido quinolínico en mononucleótido nicotinato y puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 44 o una secuencia de aminoácidos que tiene una alta homología con ella. La secuencia del gen nadC que codifica esta enzima se puede obtener desde la secuencia del genoma de *Escherichia coli* (GI: 89106990), tal como se publica en la bibliografía (Mol Syst Biol. 2006; 2:2006.0007. Epub 2006 Feb 21.) o la base de datos disponible en el NCBI o DDBJ.

[Actividad de quinolinato fosforibosiltransferasa]

50 $5\text{-fosfo-}\alpha\text{-D-ribose 1-difosfato} + \text{ácido quinolínico} + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{difosfato} + \text{mononucleótido de nicotinato}$

Se puede acumular ácido quinolínico en las células debilitando la actividad de NadC. El debilitamiento de la actividad de la enzima se puede conseguir a través de un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en 1) delección parcial o total del gen que codifica la enzima, 2) modificación de la expresión de la secuencia de control de la expresión para reducir la expresión del gen (p.ej., reemplazamiento del promotor endógeno del gen con un promotor

débil, 3) modificación de la secuencia del gen en el cromosoma para debilitar la actividad de la enzima y 4) combinaciones de los mismos. En un ejemplo específico de la presente invención, se separó nadC del genoma del microorganismo por recombinación homóloga.

5 Por otra parte, puede modificarse además el microorganismo de la presente invención para potenciar las actividades de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en fosfoenolpiruvato carboxilasa, L-aspartato aminotransferasa y la proteína de fusión de la presente invención, para potenciar la ruta de biosíntesis de ácido L-aspartico a partir de fosfoenolpiruvato.

10 La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC) y L-aspartato aminotransferasa (AspC) tienen actividad para sintetizar ácido L-aspartico a partir de fosfoenolpiruvato y pueden tener una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 45 o 46 o una secuencia de aminoácidos que tiene una alta homología con ella, respectivamente. La secuencia del gen ppc o aspC que codifica la enzima puede obtenerse a partir de la secuencia del genoma de *Escherichia coli* (gi: G1:89110074, G1:89107778), tal como se publica en la bibliografía (Mol Syst Biol. 2006;2:2006.0007. Epub 2006 Feb 21.) o las bases de datos disponibles en el NCBI o DDBJ.

[Actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa]

15 fosfoenolpiruvato + CO₂ → oxaloacetato + fosfato

[Actividad de L-aspartato aminotransferasa]

oxaloacetato + glutamato <=> Ácido L-aspartico + 2-cetoglutamato

Por lo tanto, si se potencian las actividades de PPC y AspC se puede mejorar la producción de ácido L-aspartico como un precursor de ácido quinolínico en células, aumentando así la producción de ácido quinolínico.

20 La potenciación de la actividad de la enzima puede conseguirse a través de un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en 1) un procedimiento de aumentar el número de copias del gen que codifica la enzima, 2) un procedimiento de modificar la secuencia de control de expresión para aumentar la expresión del gen, 3) un procedimiento de modificar la secuencia del gen en el cromosoma para potenciar la actividad de enzima y 4) combinaciones de los mismos. En un ejemplo específico de la presente invención, se construyó un plásmido que comprende un gen que codifica la enzima y se introdujo en un microorganismo que produce ácido quinolínico, aumentando así el número de copias del gen e induciendo la potenciación de la actividad.

25 Para potenciar la actividad de la proteína de fusión, se puede sustituir el promotor endógeno del gen que codifica la proteína de fusión con un promotor fuerte o se puede introducir una mutación en los promotores para hacerlos más fuertes o se puede aumentar el número de copias del gen. Como promotor fuerte, se pueden utilizar en general pTac, pTrc, pPro, pR, pL, pCJ1, pCysK, etc.

30 En un ejemplo específico de la presente invención, se sustituyeron los promotores de nadB y nadA con un promotor pPro constitutivo (SEQ ID NO. 32) para construir los genes nadB y nadA expresables constitutivos, que no son suprimidos por NadR como represor transcripcional para suprimir las expresiones de nadB y nadA con nivel NAD intracelular en forma de un plásmido y, a continuación, se introdujeron los plásmidos en microorganismos para inducir sobreexpresión de aspartato oxidasa y quinolinato sintasa. Asimismo, en un ejemplo específico de la presente invención, se sustituyó el promotor del gen que codifica NadB-L-NadA con el promotor pPro para inducir la sobreexpresión de NadB-L-NadA. A este respecto, el promotor pPro es un ejemplo únicamente para la resistencia a la inhibición por retroalimentación y para la potenciación de la expresión y el promotor de la presente invención no está limitado al mismo.

40 En otro aspecto más aún, la presente invención proporciona un procedimiento para producir ácido quinolínico, que comprende (a) cultivo de un microorganismo recombinante que expresa una proteína de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidas a través de un engarce en un medio que comprende una fuente de carbono; y (b) recuperación de ácido quinolínico producido durante el cultivo.

45 El microorganismo recombinante se puede cultivar en un medio de cultivo adecuado en condiciones de cultivo adecuadas conocidas en la técnica. Las personas especializadas en la técnica pueden aplicar dichos procedimientos de cultivo y ajustarlos fácilmente de acuerdo con el microorganismo seleccionado. Los procedimientos de cultivo incluyen, sin limitarse solo a ellos, cultivos continuos y discontinuos. En "Biochemical Engineering" de James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp 138-176, por ejemplo, se desvelan diversos procedimientos de cultivo de microorganismos

50 El medio de cultivo utilizado debe satisfacer los requisitos de las cepas en particular de forma adecuada. Los medios de cultivo para varios microorganismos están publicados en la bibliografía ("Manual of Methods for General Bacteriology" de American Society for Bacteriology, Washington D.C., Estados Unidos, 1981). Los medios de cultivo pueden comprender diversas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y microelementos.

La fuente de carbono adecuada en el medio de cultivo para los microorganismos puede comprender hidratos de

carbono como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa, aceites como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco, ácidos grasos como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes como glicerol y etanol y ácidos orgánicos como ácido acético pero sin limitarse solo a ellos. Dichas fuentes de carbono se pueden utilizar por separado o combinadas.

- 5 La fuente de nitrógeno disponible en el medio de cultivo para los microorganismos puede comprender fuentes de nitrógeno orgánico como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, agua de macerado de maíz (CSL), harina de soja y urea o fuentes de nitrógeno inorgánicas como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio, pero sin limitarse a ellas. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar por separado o combinadas.
- 10 La fuente de fósforo disponible en el medio de cultivo para los microorganismos puede comprender dihidrógeno fosfato potásico, hidrógeno fosfato dipotásico y las correspondientes sales que contienen sodio. El medio de cultivo también puede comprender sales de metal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. El medio que se ha mencionado puede comprender también aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados. El medio de cultivo para los microorganismos o los componentes por separado pueden añadirse a un lote o un lote continuo, si bien no se limita con ello.

15 Asimismo, es posible añadir compuestos como hidróxido de amonio, hidróxido potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico al medio de cultivo para el microorganismo de manera apropiada para controlar el valor de pH del caldo de cultivo. Se puede utilizar un agente anti-espumante, como por ejemplo poliésteres glicólicos de ácido graso durante el cultivo para impedir la formación de espuma. Para mantener las condiciones aerobias, se puede introducir oxígeno o gas con contenido en oxígeno (p.ej., aire) en el caldo de cultivo. La temperatura del caldo de cultivo puede estar comprendida normalmente entre 20 °C y 45 °C y, específicamente, entre 25 °C y 40 °C. Se puede continuar el cultivo hasta producir la cantidad de ácido quinolínico prevista y preferentemente de forma específica de 10 horas a 160 horas.

20 En un ejemplo específico de la presente invención, se transformó una cepa W3110ΔnadC, de la que se había eliminado la actividad quinolinato fosforibosiltransferasa con plásmidos de expresión que comprenden genes que codifican la proteína de fusión NadB-L-NadA unidas a través de diversos engarces, respectivamente, y a continuación, se examinó la capacidad de las cepas para producir ácido quinolínico desde ácido aspártico. Como resultado, cuando se expresan L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa como una proteína de fusión, se puede producir ácido quinolínico en un alto rendimiento, en comparación con las expresiones de estas enzimas por separado (Tabla 2).

25 Asimismo, se transformó *E.coli* que tiene actividades de fosfoenolpiruvato carboxilasa y L-aspartato aminotransferasa potenciadas y en el que se ha eliminado la actividad quinolinato fosforibosiltransferasa con el plásmido de expresión que comprende el gen que codifica la proteína de fusión y a continuación se examinó la productividad del ácido quinolínico de estas cepas CV01-0600, CV01-0601, CV01-0602, CV01-0603, CV01-0604, CV01-0605, CV01-0606 y CV01-0607. Como resultado, se observó que se puede producir ácido quinolínico en un alto rendimiento a través de la expresión de la proteína de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa y se puede producir ácido quinolínico en un mayor rendimiento que la cepa convencional, a través de la eliminación de la actividad de quinolinato fosforibosiltransferasa y la potenciación de las expresiones de fosfoenolpiruvato carboxilasa y L-aspartato aminotransferasa, con la expresión de la proteína de fusión (Tabla 5).

30 Las cepas que producen ácido quinolínico, *Escherichia coli* CV01-0604 y CV01-0605, fueron depositadas en virtud del Tratado de Budapest en el Centro de Cultivos de Microorganismos de Corea (KCCM, located on Hongjae 1-Dong, Seodaemun-Gu, Seúl, Corea) el 21 de diciembre, 2011 con números de acceso KCCM11235P y KCCM11236P, respectivamente. Es decir, este depósito está reconocido por una Autoridad Internacional de Depósito en virtud del Tratado de Budapest.

35 A continuación, se describirá la presente invención con más detalle haciendo referencia a los Ejemplos y los Ejemplos Experimentales. Sin embargo, estos ejemplos tienen un fin únicamente ilustrativo y no se pretende limitar la invención con dichos ejemplos.

Ejemplo 1. Preparación de la cepa que produce ácido quinolínico

<1-1> Construcción de plásmido que expresa L-aspartato oxidasa

40 Se obtuvo el gen nadB que codifica L-aspartato oxidasa por PCR utilizando ADN cromosómico de *E.coli* W3110 como matriz. Sobre la base de la secuencia de nucleótidos para el gen nadB (NCBI No. de registro "GI:89109380") de la SEQ ID NO. 27 obtenido del GenBank del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH GenBank), se pudo amplificar la región del marco de lectura abierta que contenía de ATG a TAA en el gen nadB y se sintetizaron los cebadores de las SEQ ID NO. 1 y 2 que tenían sitios de reconocimiento de enzimas de restricción NdeI y BamHI.

45 Se llevó a cabo la PCR utilizando ADN cromosómico de *E.coli* W3110 como plantilla y los oligonucleótidos de SEQ ID NO. 1 y 2 como cebador. Se utilizó ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene) como polimerasa y se realizó la PCR repitiendo el ciclo 30 veces, que incluyó desnaturalización a 96° C durante 30 segundos, hibridación a 50°C durante

30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos. De este modo se obtuvo el gen amplificado de aproximadamente 1,9 kb, que contiene el gen *nadB* y los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*.

- 5 El gen *nadB* obtenido por procedimientos de PCR fue tratado con enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* y, a continuación, se clonó por ligación en el vector *pProLar* (CloneTech) tratado con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* para construir finalmente un vector recombinante *pPro-nadB* en el que se clonó el gen *nadB*, cuya expresión fue controlada en virtud del promotor *pPro* como promotor constitutivo.

<1-2> Construcción de plásmido que expresa L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa

- 10 Se obtuvo el gen *nadA* que codifica quinolinato sintasa por PCR utilizando ADN cromosómico de *E.coli* W3110 como matriz. Sobre la base de la secuencia base para el gen *nadA* (No. de registro del NCBI "GI: 89107601") de SEQ ID NO. 28 obtenido del GenBank del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH GenBank), se pudo amplificar la región del marco de lectura abierto de ATG a TAA en el gen *nadA* y se sintetizaron los cebadores de SEQ ID NO. 3 y 4 que tienen sitios de reconocimiento de enzimas de restricción *Apal* y *NotI*.

- 15 Se llevó a cabo la PCR utilizando ADN cromosómico de *E.coli* W3110 como matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO. 3 y 4 como cebador. Se utilizó ADN polimerasa *PfuUltra™* (Stratagene) como polimerasa y se realizó la PCR repitiendo el ciclo 30 veces que incluyó desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos. De este modo, se obtuvo el gen amplificado de aproximadamente 1,0 kb, que contiene el gen *nadA* y los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Apal* y *NotI*.

- 20 Asimismo, se obtuvo el promotor *Pro* por PCR utilizando ADN cromosómico del vector *pProLar* (CloneTech) como matriz. Sobre la base de la secuencia base (SEQ ID NO. 32) para el promotor *Pro* de CloneTech y se sintetizaron los cebadores de las SEQ ID NO. 5 y 6 que tienen los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción *BamHI* y *Apal* para ligar el promotor *pPro* y el gen *nadA* amplificado.

- 25 Se llevó a cabo la PCR utilizando ADN cromosómico de *E.coli* W3110 como matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO. 5 y 6 como cebador. Se utilizó ADN polimerasa *PfuUltra™* (Stratagene) como polimerasa y se realizó la PCR repitiendo el ciclo 30 veces que incluyó desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto. De este modo, se obtuvo un gen amplificado de aproximadamente 0,135 kb, que contiene el promotor *pPro* y los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción *BamHI* y *Apal*,

- 30 Se trató el gen *nadA* obtenido a través de procedimientos de PCR con enzimas de restricción *Apal* y *NotI* y se trató el fragmento de promotor *pPro* amplificado con *Apal* y *BamHI*. Se clonaron los fragmentos *nadA* y promotor *pPro* tratados con las enzimas de restricción por ligación en el vector *pPro-nadB* tratado con *NotI* y *BamHI* preparado en el <Ejemplo 1-1> para construir finalmente un vector recombinante *pPro-NBA* de 5,7 Kb, en el que el gen *nadB*, cuya expresión fue controlada en virtud del promotor *pPro* como promotor constitutivo y se clonó el gen *nadA* cuya expresión fue controlada por el promotor *pPro*. El *pPro-NBA* construido tiene la secuencia de SEQ ID NO. 33. La FIG. 2 presenta la construcción de *pPro-NBA* como el plásmido que expresa genes que codifican L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa.

<1-3> Construcción de plásmido que expresa *NadB-L-NadA*

- 40 Para construir un plásmido que expresa *NadB-L-NadA* que contiene un engarce, se llevó a cabo la PCR utilizando *pPro-NBA* (SEQ ID NO. 33) preparado en el <Ejemplo 1-2> como matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO. 7 y 8 como cebador. Se utilizó ADN polimerasa *PfuUltra™* (Stratagene) como polimerasa y se realizó la PCR repitiendo el ciclo 30 veces que incluyó desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos. De esta forma, se obtuvo un gen amplificado de aproximadamente 1,8 kb, que contiene el promotor *pPro*, el sitio de enzima de restricción *XhoI* y el engarce en el extremo del gen *nadB*.

- 45 Asimismo, se llevó a cabo la PCR utilizando *pPro-NBA* como matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO. 15 y 16 como cebador, para amplificar el fragmento del gen *nadA* que tiene la secuencia homóloga en el extremo del gen amplificado de aproximadamente 1,8 kb, que contiene el sitio de enzima de restricción *XhoI*, el promotor *pPro* y el engarce en el extremo del gen *nadB* y el sitio de enzima de restricción *NotI* en el extremo del gen *nadA*. Se utilizó ADN polimerasa *PfuUltra™* (Stratagene) como polimerasa y se realizó la PCR repitiendo el ciclo 30 veces que incluyó desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos. De este modo, se obtuvo el gen amplificado de aproximadamente 1,1 kb, que se puede ligar con el engarce por ligación homóloga y que contiene el sitio de enzima de restricción *NotI* en el extremo del gen *nadA*.

- 55 Se mezclaron el gen amplificado de aproximadamente 1,8 kb que contiene el promotor *pPro*, el sitio de enzima de restricción *XhoI* y el engarce en el extremo del gen *nadB* y el fragmento del gen *nadA* que tiene la secuencia homóloga en el extremo del gen amplificado de aproximadamente 1,8 kb y el sitio de enzima de restricción *NotI* en el

extremo del gen *nadA* así preparado y se realizó la PCR Sewing. Se utilizó ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene) como polimerasa y se realizó la PCR repitiendo el ciclo 10 veces que incluyó desnaturalización a 96 °C durante 60 segundos, hibridación a 50 °C durante 60 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Se siguió llevando a cabo la PCR por adición de los oligonucleótidos de las SEQ ID NO. 7 y 16 a la mezcla de reacción PCR. Se utilizó ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene) como polimerasa y se llevó a cabo la PCR repitiendo el ciclo 20 veces incluyendo desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, hibridación a 50°C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 3 minutos. Finalmente, se obtuvo el gen de la proteína de fusión amplificado de aproximadamente 2,9 kb que contiene la "enzima de restricción XhoI_promotor pPro_nadB_engarce_nadA_enzima de restricción NotI".

Se trató el fragmento del gen, la "enzima de restricción XhoI_promotor pPro_nadB_engarce_nadA_enzima de restricción NotI" obtenido por PCR con enzimas de restricción, XhoI y NotI. Se clonó el "promotor pPro_nadB_engarce_fragmento de gen *nadA*" tratado con las enzimas de restricción por ligación en un vector pProLar (CloneTech) tratado con las enzimas de restricción XhoI y NotI para construir finalmente un vector recombinante pNBHL1A, cuya expresión fue controlada en virtud del promotor pPro como promotor constitutivo y en el que se clonó la proteína de fusión simple de *nadB* y *nadA* unidas a través del engarce. Los engarces utilizados en este ejemplo se componen de 5 a 30 aminoácidos y tiene la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO. 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 60, respectivamente.

Se amplificó el fragmento del gen *nadB* cambiando el oligonucleótido de la SEQ ID NO. 8 que contiene el engarce por los oligonucleótidos de las SEQ ID NO. 9, 10, 11, 12, 13 o 14, para amplificar varios genes que contienen varios engarces, que contienen cada uno de ellos el promotor pPro y el engarce en el extremo de *nadB*. De igual modo que anteriormente, se prepararon los vectores recombinantes pNBHL2A, pNBHL3A, pNBHL4A, pNBHL5A, pNBFL3A y pNBFL4A. Los pNBHL1A, pNBHL2A, pNBHL3A, pNBHL4A, pNBHL5A, pNBFL3A y pNBFL4A preparados tienen las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO. 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40, respectivamente. Las proteínas de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa así preparadas tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO. 47, 48, 49, 50, 51, 52 y 53, respectivamente. En la FIG. 2 se presenta la construcción de pNBHL1A, pNBHL2A, pNBHL3A, pNBHL4A, pNBHL5A, pNBFL3A o pNBFL4A, que es un plásmido que expresa cada gene que codifica proteínas de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidas a través de varios engarces.

<1-4> Construcción de plásmido que expresa fosfoenolpiruvato carboxilasa y L-aspartato transaminasa

Se obtuvo por PCR el gene *ppc* que codifica fosfoenolpiruvato carboxilasa utilizando ADN cromosómico de *E.coli* W3110 como matriz. Sobre la base de la secuencia base para el gen *ppc* (No. de registro del NCBI "GI: 89110074") de SEQ ID NO. 29 obtenido del GenBank del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH GenBank), se pudo amplificar la región desde el promotor al terminador en el gen *ppc* y se sintetizaron los cebadores de las SEQ ID NO. 17 y 18 que tienen sitios de reconocimiento de enzimas de restricción HindIII y BamHI.

Se llevó a cabo la PCR utilizando ADN cromosómico de *E.coli* W3110 como matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO. 17 y 18 como el cebador. Se utilizó ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene) como polimerasa y se llevó a cabo la PCR repitiendo el ciclo 30 veces que incluyó desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 4 minutos. De esta forma, se obtuvo el gen amplificado de aproximadamente 3,1 kb, que contiene el gen *ppc* y los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción HindIII y BamHI.

Se trató el gen *ppc* obtenido a través de procedimientos de PCR con enzimas de restricción HindIII y BamHI y a continuación se clonó por ligación en el vector pCL1920 (AB236930) tratado con enzimas de restricción HindIII y BamHI para construir finalmente un vector recombinante pCP en el que se clonó el gen *ppc*.

Para clonar el gen *aspC* en el vector recombinante pCP en el que se clonó el gen *ppc*, se obtuvo el gen *aspC* que codifica L-aspartato transaminasa por PCR utilizando ADN cromosómico de *E.coli* W3110 como matriz. Sobre la base de la secuencia base para el gen *aspC* (No. de registro del NCBI "GI: 89107778") de SEQ ID NO. 30 obtenido del GenBank del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH GenBank), se pudo amplificar la región desde el promotor al terminador en el gen *aspC* y se sintetizaron los cebadores de las SEQ ID NO. 19 y 20 que tienen sitios de reconocimiento de enzimas de restricción BamHI y KpnI.

Se llevó a cabo PCR utilizando ADN cromosómico de *E.coli* W3110 como matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO. 19 y 20 como cebador. Se utilizó ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene) como polimerasa y se llevó a cabo la PCR repitiendo el ciclo 30 veces que incluyó desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos. De este modo, se obtuvo el gen amplificado de aproximadamente 1,5 kb, que contiene el gen *aspC* y los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción BamHI y KpnI.

Se trató el gen *aspC* obtenido por PCR con enzimas de restricción, BamHI KpnI y a continuación se clonó por ligación en el vector pCP tratado con las enzimas de restricción BamHI y KpnI para construir finalmente un vector recombinante pCPA en el que se clonó el gen *aspC* y el gen *ppc* al mismo tiempo. El vector pCPA construido de esta forma tiene la secuencia SEQ ID NO. 41. En la FIG. 3 se presenta la estructura de construcción de pCPA, que es un plásmido que expresa los genes que codifican fosfoenolpiruvato carboxilasa y L-aspartato transaminasa.

<1-5> Construcción de cepa deficiente en quinolinato fosforibosiltransferasa

En este ejemplo, se obtuvo por PCR el gen *nadC* que participa en la ruta de descomposición de ácido quinolínico utilizando ADN cromosómico de *E.coli* W3110 como matriz. Sobre la base de la información de la secuencia base del gen *nadC* (No. de registro del NCBI "GI:89106990") obtenido del GenBank del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH GenBank), se sintetizaron los cebadores de las SEQ ID NO. 21 y 22 para amplificar la región en dirección 3' del gen *nadC*, los cebadores de las SEQ ID NO. 23 y 24 para amplificar las regiones en dirección 5' y en dirección 3' del gen *nadC* y *loxpCm* y los cebadores de las SEQ ID NO. 25 y 26 para amplificar la región en dirección 5' del gen *nadC*.

Se llevó a cabo la PCR utilizando ADN cromosómico de *E.coli* W3110 como matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO. 21 y 22 y 25 y 26 como cebador para amplificar las regiones en dirección 5' y en dirección 3' del gen *nadC* de 0,5 kb y 0,3 kb, respectivamente. Asimismo, se llevó a cabo la PCR utilizando el vector plásmido pLoxpCat2 que contiene *loxpCm* como matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO. 23 y 24 como cebador para amplificar el gen *loxpCm* de 1,0 kb, que tiene la secuencia homóloga a la del gen *nadC* en ambos extremos. Se utilizó ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene) como polimerasa y se llevó a cabo la PCR repitiendo el ciclo 30 veces que comprendió desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 53 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto. A continuación, se utilizaron el fragmento en dirección 5' de *nadC*, el fragmento en dirección 3' de *nadC* y el fragmento *loxpCm* obtenidos de las reacciones de PCR como matriz para realizar la PCR en condiciones de PCR incluyendo 10 repeticiones del ciclo que incluyó desnaturalización a 96 °C durante 60 segundos, hibridación a 50 °C durante 60 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto y 20 repeticiones del ciclo tras la adición de los cebadores de las SEQ ID NO. 21 y 26. De este modo, se obtuvo un casete *nadC* deficiente de 1,8 kb, que contiene la región en dirección 5' del gen *nadC* – región dirección 3' del gen *loxpCm*–región dirección 3' del gen *nadC*.

Se transformó *E.coli* W3110 que contiene pKD46 como vector de expresión de lambda red recombinasa con el casete *nadC* deficiente por electroporación, y a continuación se manchó la cepa sobre medio para placa LB (Luria-Bertani) (triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g y agar 1,5 %/l) que contenía cloranfenicol como marcador selectivo y se incubó a 37 °C durante toda la noche para seleccionar cepas de microorganismo que exhibieran resistencia contra cloranfenicol.

Se sometieron directamente a PCR las cepas seleccionadas como matriz utilizando los cebadores de las SEQ ID NO. 21 y 26 en las mismas condiciones y a continuación, se confirmó la delección del gen *nadC* identificando que el tamaño del gen en la cepa silvestre y la cepa *nadC*-deficiente cepa era 1,0 kb y 1,8 kb, respectivamente, sobre 1,0 % de gel de agarosa. Asimismo, se separó el gen *nadC* de *E. coli* W3110 como cepa silvestre de acuerdo con el mismo procedimiento que anterior.

Ejemplo 2. Preparación y evaluación de cepa que expresa proteína de fusión**<2-1> Preparación de cepa que expresa proteína de fusión**

Se utilizaron los plásmidos pNBHL1A, pNBHL2A, pNBHL3A, pNBHL4A, pNBHL5A, pNBFL3A y pNBFL4A y pPro-NBA que expresan genes que codifican las proteínas de fusión simples que se prepararon uniendo L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa a través de varios engarces del <Ejemplo 1-3> por procedimiento de CaCl₂ para transformar la cepa W3110Δ*nadC* según la construcción del <Ejemplo 1-5>, que se mancharon después sobre un medio de placa LB-Km (extracto de levadura de 10 g/l, NaCl 5 g/l, triptona 10 g/l, kanamicina 25 µg/l) y se incubó a 37 °C durante toda la noche. A continuación, se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina. De este modo, se obtuvieron las cepas que expresan L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa como proteína de fusión simple.

<2-2> Comparación de la productividad de ácido quinolínico desde ácido aspártico entre proteínas de fusión que tienen varios engarces

Para comparar la capacidad de sintetizar ácido quinolínico a partir de ácido aspártico entre proteínas de fusión que tienen diversos engarces, se inoculó cada una de las proteínas de las cepas que expresan proteína de fusión obtenidas en el <Ejemplo 2-1> en 5 ml de LBKm-IPTG (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, triptona 10 g/l, kanamicina 25 µg/l, IPTG 10 mM) medio líquido en una incubadora a 37°C y se cultivó a 37 °C con 250 rpm durante toda la noche para obtener un caldo de cultivo. Se centrifugó el caldo de cultivo así obtenido 4000 rpm durante 10 minutos para obtener solamente la cepa que expresa proteína de fusión, que se resuspendió en 500 µl de tampón Tris pH 7,0 y después se interrumpió por sonicación.

Se utilizaron los lisados celulares enteros que contienen la proteína de fusión expresada obtenida según el procedimiento anterior para comparar la capacidad para sintetizar ácido quinolínico a partir de ácido L-aspártico a través de la reacción enzimática. En la Tabla 1 se muestra la composición de la mezcla de reacción de enzima para comparar la capacidad de sintetizar ácido quinolínico a partir de ácido L-aspártico.

[Tabla 1]

Composición de la mezcla de reacción	Unidad (ml)
Ácido L-aspártico 200 mM	0,1
Dihidroxiacetona fosfato 200 mM	0,1
Lisado celular	0,1
Tampón Tris 1 M (pH 7,0)	0,1
Agua destilada	0,6
Total	1,0

5 Se dejó reaccionar la composición de reacción a 37 °C durante 30 minutos. Se analizaron ácido L-aspártico y ácido quinolínico en el caldo de cultivo por HPLC. En la Tabla 2 se muestra el resultado de los análisis y se indica la capacidad de cada proteína de fusión para producir ácido quinolínico a partir de ácido L-aspártico.

[Tabla 2]

Cepa	Plásmido	Aminoácido de engarce	Ácido quinolínico (g/l)	Rendimiento (índice de conversión en % en moles*)
W3110ΔnadC	pPro-NBA		1,5	44.9%
	pNBHL1A	LA(EAAAK)1AAA (SEQ ID NO, 54)	2,5	74.9 %
	pNBHL2A	LA(EAAAK) 2AAA (SEQ ID NO, 55)	2,4	71.9 %
	pNBHL3A	LA(EAAAK)3TAA (SEQ ID NO, 56)	2,7	80.8 %
	pTdBHL4A	LA(EAAAK)4AAA (SEQ ID NO, 57)	3,1	92.8 %
	pNBHL5A	LA(EAAAK)5AAA (SEQ ID NO, 58)	3,2	95.8 %
	pNBFL3A	L(GGGS)3AAA (SEQ ID NO, 59)	2,4	71.9 %
	pNBFL4A	L(GGGS)4AAA (SEQ ID NO, 60)	2,2	65.9 %

*índice de conversión en moles (%) = ácido quinolínico (M) producido / ácido L-aspártico (M) añadido

10 pPro-NBA que expresa L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa produjo 1,5 g/l de ácido quinolínico a partir de ácido L-aspártico y presentó 44,9% de rendimiento de conversión enzimática a partir de ácido L-aspártico en ácido quinolínico, mientras que pNBHL1A, pNBHL2A, pNBHL3A, pNBHL4A, pNBHL5A, pNBFL3A y pNBFL4A que produjeron las proteínas de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidas a través de varios engarces produjeron 2,2 ~ 3,2 g/l de ácido quinolínico y presentó 65,9 ~ 95,8 % de rendimiento de conversión enzimática a partir de ácido L-aspártico a ácido quinolínico, respectivamente.

15 Este resultado indica que la expresión de una proteína de fusión simple de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa presenta un rendimiento de conversión superior de ácido quinolínico en comparación con expresiones de enzimas por separado. Asimismo, todas las cepas introducidas con varios tipos de engarces presentaron altos índices de conversión enzimática, lo que indica que la expresión de la proteína de fusión simple de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidos a través del engarce es más eficiente en la biosíntesis de ácido quinolínico a partir de ácido L-aspártico. pNBHL4A y pNBHL5A introducidos con el engarce LA(EAAAK)₄₋₅AAA presentó el índice de conversión en ácido quinolínico más alto, lo que indica que LA(EAAAK)₄₋₅AAA son los engarces de proteína de fusión más eficientes en la producción de ácido quinolínico.

Ejemplo 3. Preparación y evaluación de cepa que produce ácido quinolínico

<3-1> Preparación de cepa que produce ácido quinolínico

25 Para comparar la capacidad para sintetizar ácido quinolínico a partir de glucosa entre proteínas de fusión que tienen diversos engarces, se utilizó el plásmido pCPA construido en el <Ejemplo 1-4> por el procedimiento de CaCl₂ para

transformar la cepa W3110 Δ nadC según la construcción del <Ejemplo 1-5>, que se mancharon a continuación sobre un medio para placa LB-SP (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, triptona 10 g/l, espectinomicina 50 mg/l) y se incubó a 37 °C durante toda la noche. A continuación, se seleccionaron las colonias resistentes a espectinomicina.

- 5 Se utilizaron los plásmidos pPro-NBA, pNBHL1A, pNBHL2A, pNBHL3A, pNBHL4A, pNBHL5A, pNBFL3A y pNBFL4A
 10 construidos en el <Ejemplo 1-2> y el <Ejemplo 1-3> a través del procedimiento de CaCl₂ para transformar la cepa W3110 Δ nadC que contienen pCPA construido según lo anterior, que se mancharon sobre medio para placa LB-Km-Sp (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, triptona 10 g/l, espectinomicina 50 μ g/l, kanamicina 25 μ g/l) y se incubó a 37 °C durante toda la noche. A continuación, se seleccionaron 10 colonias resistentes a kanamicina y a espectinomicina. Las cepas que producen ácido quinolínico preparadas de esta forma fueron denominadas CV01-0600, CV01-0601, CV01-0602, CV01-0603, CV01-0604, CV01-0605, CV01-0606 y CV01-0607, respectivamente. En la Tabla 3 se muestra el genotipo de la cepa huésped, el plásmido contenido y la secuencia de aminoácidos / ácido L-aspartico (M) añadido del engarce de la proteína de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa.

[Tabla 3]

Genotipo de cepa	Plásmido		Secuencia de aminoácidos de engarce	Cepa No.
W3110 Δ nadC	pCPA	pPro-NBA	-	CV01-0600
		pNBHL1A	LA(EAAAK)1AAA	CV01-0601
		pNBHL2A	LA(EAAAK)2AAA	CV01-0602
		pNBHL3A	LA(EAAAK)3AAA	CV01-0603
		pNBHL4A	LA(EAAAK)4AAA	CV01-0604
		pNBHL5A	LA(EAAAK)5AAA	CV01-0605
		pNBFL3A	L(GGGS)3AAA	CV01-0606
		pNBFL4A	L(GGGS)4AAA	CV01-0607

15 <3-2> Evaluación de cepa que produce ácido quinolínico

- Para conformar la capacidad para producir ácido quinolínico a partir de glucosa, se tituló ácido quinolínico según el siguiente experimento. Se cultivó la cepa que produce ácido quinolínico preparada en el <Ejemplo 3-1> sobre medio para placa LB-SP-Km en una incubadora a 37 °C durante toda la noche para obtener una colonia simple, que se inoculó después en 25 ml de medio de titulación de ácido quinolínico con 1 bucle de platino y se incubó con 250 rpm a 37 °C durante 24 a 72 horas. En la Tabla 4 se muestra la composición del medio de producción de ácido quinolínico.

[Tabla 4]

Composición	Conc. (por litro)
Glucosa	70 g
Sulfato de amonio	17 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·8H ₂ O	5 mg
ZnSO ₄	5 mg
Carbonato cálcico	30 g
Extracto de levadura	2 g

Se analizó ácido quinolínico en el caldo de cultivo por HPLC. En la Tabla 5 se muestran los resultados del análisis y

se indica la capacidad de la cepa para producir ácido quinolínico a partir de glucosa.

[Tabla 5]

Cepa	Ácido quinolínico (g/l)	Rendimiento (%)*
CV01-0600	5,5	7,9
CV01-0601	7,0	10,0
CV01-0602	6,5	9,3
CV01-0603	7,5	10,7
CV01-0604	9,7	13,9
CV01-0605	10,3	14,7
CV01-0606	6,5	9,3
CV01-0607	6,0	8,6
*Rendimiento (% = ácido quinolínico producido (g) glucosa añadida (g))		

5 La cepa CV01-0600 que se preparó eliminado quinolinato fosforibosiltransferasa de *E.coli* W3110 para suprimir la descomposición de ácido quinolínico intracelular mediante quinolinato fosforibosiltransferasa y a continuación, potenciando las expresiones de fosfoenolpiruvato carboxilasa, L-aspartato aminotransferasa y L-aspartato oxidasa, quinolinato sintasa, produjo 5,5 g/l de ácido quinolínico, mientras que las cepas CV01-0601, CV01-0602, CV01-0603, CV01-0604, CV01-0605, CV01-0606 y CV01-0607 que expresan las proteínas de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidas a través de varios engarces produjeron 6,0 ~ 10,3 g/l de ácido quinolínico, respectivamente.

15 Este resultado coincide con el resultado de la conversión enzimática de ácido L-aspartico en ácido quinolínico en el <Ejemplo 2> e indica también que la expresión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa como proteína de fusión simple reduce al mínimo la reacción secundaria de conversión de α -iminosuccinato en oxaloacetato aumentando la reacción de un α -iminosuccinato metabolito intermedio con quinolinato sintasa, aumentando así la producción de ácido quinolínico. Asimismo, todas las cepas introducidas con varios tipos de engarces presentaron una alta productividad relativamente alta de ácido quinolínico, lo que indica la expresión de la proteína de fusión simple de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidas a través del engarce es más eficiente en la biosíntesis de ácido quinolínico.

20 Por otra parte, en conformidad con el resultado del <Ejemplo 2>, pNBHL4A y pNBHL5A, que se introdujeron con los engarces de LA(EAAAK)_{4~5}AAA, respectivamente, presentaron la máxima productividad de ácido quinolínico, lo que indica que LA(EAAAK)_{4~5}AAA son los engarces de proteína de fusión más eficientes en la producción de ácido quinolínico.

25 Por otra parte, se confirmó que cuando se potencia la ruta de biosíntesis de ácido L-aspartico con una combinación de una mejor velocidad de reacción por la expresión de la proteína de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa, la eliminación de la actividad de quinolinato fosforibosiltransferasa y la potenciación de las expresiones de fosfoenolpiruvato carboxilasa y L-aspartato aminotransferasa, se puede producir ácido quinolínico con una alta eficiencia en comparación con la cepa convencional.

Efecto de la invención

30 La presente invención proporciona un microorganismo que expresa una proteína de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidos a través de un engarce para reducir al mínimo la reacción de descomposición natural de α -iminosuccinato, que constituye un problema en el proceso de producción biológico convencional, produciendo así ácido quinolínico con una alta productividad. .

<110> CJ CheilJedang Corporation

35 <120> Microorganismo recombinante que produce ácido quinolínico y procedimiento de producción de ácido quinolínico utilizándolo

<130> OPA12191/PCT

40 <150> KR10-2012-0001845

<151> 06-12-2012

<160> 63

5 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para amplificación de nadB

15 <400> 1
 catatgaata ctctccctga acatt 25

<210> 2
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para amplificación de nadB

25 <400> 2
 ggatccctat accactacgc ttgatcac 28

<210> 3
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para amplificación de nadA

35 <400> 3
 gggcccatga gcgtaatggt tgatcca 27

<210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador para amplificación de nadA

<400> 4
 50 gcggccgctc gtgcctaccg cttcg 25

<210> 5
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador para amplificación de promotor Pro

<400> 5
 60 ggatccctcg agcatagcat ttttatcc 28

<210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 656 892 T3

	<220>		
	<223> cebador para amplificación de promotor Pro		
5	<400> 6	gggcccatgt acctttctcc tct	23
	<210> 7		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador para amplificación de promotor Pro		
15	<400> 7	ctcgagcata gcattttat	20
	<210> 8		
20	<211> 69		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> cebador para amplificación de gen nadB con engarce helicoidal (HL1)		
	<400> 8		
		aaacattacg ctcatctgca gggctgctgc cttcgcggct gcttctgcca ggattctggt	60
		tatgtaatg	69
30	<210> 9		
	<211> 84		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> cebador para amplificación de gen nadB co engarce helicoidal (HL2)		
	<400> 9		
		aaacattacg ctcatctgca gggctgctgc cttcgcggct gcttccttcg cggetgcttc	60
40		tgccaggatt ctgtttatgt aatg	84
	<210> 10		
	<211> 99		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador para amplificación de gen nadB co engarce helicoidal (HL3)		
50	<400> 10		
		aaacattacg ctcatctgca gggctgctgc cttcgcggct gcttccttcg cggetgcttc	60
		cttcgcggct gcttctgcca ggattctggt tatgtaatg	99
55	<210> 11		
	<211> 114		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 656 892 T3

	<220>		
	<223> cebador para amplificación de gen nadB con engarce helicoidal (HL4)		
	<400> 11		
5		aaacattacg ctcatctgca gggctgctgc cttcgcggct gcttccttcg cggctgcttc	60
		cttcgcggct gcttccttcg cggctgcttc tgccaggatt ctgtttatgt aatg	114
	<210> 12		
	<211> 129		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador para amplificación de gen nadB con engarce helicoidal (HL5)		
15	<400> 12		
		aaacattacg ctcatctgca gggctgctgc cttcgcggct gcttccttcg cggctgcttc	60
		cttcgcggct gcttccttcg cggctgcttc cttcgcggct gcttcctgcca ggattctggt	120
		tatgtaatg	129
	<210> 13		
	<211> 87		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador para amplificación de gen nadB con engarce flexible (FL3)		
	<400> 13		
		aaacattacg ctcatctgca gggctgctgc gctaccacca ccgctaccac caccgctacc	60
30		accacccagg attctgttta tgtaatg	87
	<210> 14		
	<211> 99		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador para amplificación de gen nadB con engarce flexible (FL4)		
40	<400> 14		
		aaacattacg ctcatctgca gggctgctgc gctaccacca ccgctaccac caccgctacc	60
		accaccgcta ccaccacca ggattctggt tatgtaatg	99
	<210> 15		
	<211> 43		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador para amplificación de gen nadA		
50	<400> 15		
		ctgcagatga gcgtaatgtt tgatccagac acggcgattt atc	43
55	<210> 16		

ES 2 656 892 T3

<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador para amplificación de región en dirección 3' de nadC

<400> 22
cggtaggtac cgagctcgaa aagtagagaa tctggaagaa c 41

10 <210> 23
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador para amplificación de loxCm

20 <400> 23
gttctccag attcttact ttcgagctc ggtacctacc g 41

<210> 24
<211> 42
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador para amplificación de loxpCm

30 <400> 24
tgaagaggtg ttattcaac tgggggtacc gttcgtataa tg 42

<210> 25
<211> 42
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador para amplificación de región en dirección 5' de nadC

40 <400> 25
cattatacga acggtacccc cagttgaata aacacctott ca 42

<210> 26
<211> 19
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> cebador para amplificación de región en dirección 5' de nadC

<400> 26
gtggtgctaa taccgggtt 19

55 <210> 27

<211> 1623
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

60 <220>
<221> gen
<222> (1)..(1623)
<223> Marco de lectura abierto de nadB

65 <400> 27

ES 2 656 892 T3

atgaatactc tccctgaaca ttcattgtgac gtgttgatta tcggtagcgg cgcagccgga 60
ctttcactgg cgctacgcct ggctgaccag catcaggcca tcggttctaag taaaggcccg 120
gtaacggaag gttcaacatt ttatgccag gccggtattg ccgccgtggt tgatgaaact 180
gacagcattg actcgcattg ggaagacaca ttgattgccg gggctgggtat ttgcgatcgc 240
catgcagttg aatttgctgc cagcaatgca cgatcctgtg tgcaatggct aatcgaccag 300
ggggtgttgt ttgatacca cattcaaccg aatggcgaag aaagttacca tctgaccctg 360
gaaggtggac atagtcaaccg tcgtattcct catgccgccg acgccaccgg tagagaagta 420
gaaaccacgc tggtagacaa ggcgctgaac catccgaata ttcgctgtct ggagcgcagc 480
aacgcggttg atctgattgt ttctgacaaa attggcctgc cgggcacgcg acgggttgtt 540
ggcgcgtggg tatggaaccg taataaagaa acggtggaac cctgccacgc aaaagcgtg 600
gtgctggcaa ccggcgggtgc gtcgaagggt tatcagtaca ccaccaatcc ggatatttct 660
tctggcgatg gcattgctat ggcgtggcgc gcaggctgcc gggttgcaa tctcgaattt 720
aatcagttcc accctaccgc gctatatcac ccacaggcac gcaatttctt gtaaacagaa 780
gcactgcgcg gcgaaggcgc ttatctcaag cgcccggatg gtacgcggtt tatgcccgat 840
tttgatgagc gcggcgaact ggccccgcgc gatattgtcg cccgcgccat tgaccatgaa 900
atgaaacgcc tcggcgcaga ttgtatgttc cttgatataca gccataagcc cgccgatttt 960
attgccagc atttccgat gatttatgaa aagctgctcg ggctggggat tgatctcaca 1020
caagaaccgg taccgattgt gcctgctgca cattatacct gccggtggtg aatggttgat 1080
gatcatgggc gtacggacgt cgagggcttg tatgccattg gccaggtgag ttataccggc 1140
ttacacggcg ctaaccgat ggcctcgaat tcattgctgg agtgtctggt ctatggctgg 1200
tcggcggcgg aagatatcac cagacgtatg ccttatgcc acgacatcag tacgttaccg 1260
ccgtgggatg aaagccgcgt tgagaaccct gacgaacggg tagtaattca gcataactgg 1320
cacgagctac gtctgtttat gtgggattac gttggcattg tcgacacaac gaagcgcctg 1380
gaacgcgccc tcggcgggat aaccatgctc caacaagaaa tagacgaata ttacgcccat 1440
ttccgcgtct caaataattt gctggagctg cgtaactctgg tacaggttgc cgagttgatt 1500
gttcgctgtg caatgatgcg taaagagagt cgggggttgc atttcacgct ggattatccg 1560
gaactgctca cccattccgg tccgtcgatc ctttcccccg gcaatcatta cataaacaga 1620
taa 1623

5 <210> 28
<211> 1044
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

10 <220>
<221> gen
<222> (1)..(1044)

ES 2 656 892 T3

<223> Marco de lectura abierto de nadA

<400> 28

	atgagcgtaa tgtttgatcc agacacggcg atttatcctt tcccccgaa gccgacgccg	60
	ttaagcattg atgaaaaagc gtattaccgc gagaagataa aacgtctgct aaaagaacgt	120
	aatgcggtga tggttgccca ctactatacc gatcccgaaa ttcaacaact ggcagaagaa	180
	accggtggct gtatttctga ttctctggaa atggcgcgct tcggtgcaaa gcatcccgtc	240
	tctactttgt tagtcgctgg ggtgagattt atgggagaaa ccgccaaaat tctcagtcgg	300
	gaaaaaacia ttctgatgcc gacacttcag gctgaatggt cactggatct cggctgccct	360
	gttgaagaat ttaacgcatt ttgcatgcc catcccgatc gtactgtcgt cgtctacgcc	420
	aacacttctg ctgcggtaaa agcgcgcgca gattgggtgg taacttcaag cattgccgtc	480
	gaacttattg atcatcttga tagtttgggt gaaaaaatca tctgggcacc cgacaaacat	540
	ctggggcggt acgtgcaaaa acagacgggt ggagacattc tatgctggca ggggtgcctgt	600
	attgtgcatg atgaatttaa gactcaggcg ttaaccgct tgcaagaaga ataccggat	660
	gctgccatac tggatcatcc agaatcacca caagctattg tcgatatggc ggatgcggtc	720
	ggttccacca gtcaactgat cgctgctgcg aaaacattgc cacatcagag gcttattgtg	780
	gcaaccgatc ggggtatttt ctacaaaatg cagcaggcgg tgccagataa agagttactg	840
	gaagcaccaa ccgcaggtga ggggtgcaacc tgccgcagct gcgcgcattg tccgtggatg	900
	gccatgaatg gccttcaggc catcgcagag gcattagaac aggaaggaag caatcacgag	960
	gttcatgttg atgaaaggct gcgagagagg gcgctggtgc cgtcaatcg tatgctggat	1020
5	tttgcggcta cactacgtgg ataa	1044

<210> 29

<211> 3096

<212> ADN

10 <213> *Escherichia coli* W3110

<220>

<221> gen

<222> (1)..(3096)

15 <223> ppc

<400> 29

	ataagggcgt cgcgccgat ccggcactgt tgccaaactc cagtgccgca ataatgtcgg	60
	atgcgatact tgcgcatctt atccgaccta cacctttggt gttacttggg gcgatttttt	120
	aacatttcca taagttacgc ttatttaaag cgtcgtgaat ttaatgacgt aaattcctgc	180

ES 2 656 892 T3

tatttattcg tttgctgaag cgatttcgca gcatttgacg tcaccgcttt tacgtggctt 240
tataaaagac gacgaaaagc aaagcccagag catattcgcg ccaatgcgac gtgaaggata 300
cagggctatc aaacgataag atgggggtgc tggggtaata tgaacgaaca atattccgca 360
ttgcgtagta atgtcagtat gctcggcaaa gtgctgggag aaaccatcaa ggatgcgttg 420
ggagaacaca ttcttgaacg cgtagaaact atccgtaagt tgtcgaaatc ttcacgcgct 480
ggcaatgatg ctaaccgcca ggagttgctc accaccttac aaaatttgtc gaacgacgag 540
ctgctgcccg ttgcgcgtgc gtttagtcag ttcctgaacc tggccaacac cgccgagcaa 600
taccacagca tttcgcgaa aggcgaagct gccagcaacc cggaagtgat cgcccgacc 660
ctgcgtaaac tgaaaaacca gccggaactg agcgaagaca ccatcaaaaa agcagtgga 720
tcgctgtcgc tggaaactggt cctcacggct cacccaaccg aaattaccg tcgtacactg 780
atccacaaaa tggtggaagt gaacgcctgt ttaaaacagc tcgataacaa agatattcgt 840
gactacgaac acaaccagct gatgcgtcgc ctgcgccagt tgatcgcca gtcattggcat 900
accgatgaaa tccgtaagct gcgtccaagc ccggtagatg aagccaaatg gggctttgcc 960
gtagtggaaa acagcctgtg gcaaggcgtg ccaaattacc tgcgcgaact gaacgaacaa 1020
ctggaagaga acctcggcta caaactgcc gtcgaatttg ttccggtccg ttttacttcg 1080
tggatgggag gcgaccgca cggcaaccg aacgtcactg ccgatatcac ccgccacgtc 1140
ctgctactca gccgctggaa agccaccgat ttgttctga aagatattca ggtgctggtt 1200
tctgaactgt cgatggttga agcagccct gaactgctgg cgctggttg cgaagaaggt 1260
gccgcagaac cgtatcgcta tctgatgaaa aacctgcgtt ctgcctgat ggcgacacag 1320
gcatggctgg aagcgcgct gaaaggcga gaactgccaa aaccagaagg cctgctgaca 1380
caaaacgaag aactgtggga accgctctac gcttgctacc agtcacttca ggcgtgtggc 1440
atgggtatta tcgccaacgg cgatctgctc gacaccctgc gccgcgtgaa atgtttcggc 1500
gtaccgctgg tccgtattga tatccgtcag gagagcaagc gtcataccga agcgtggtg 1560
gagctgacct gctacctcg tatcggcgac tacgaaagct ggtcagaggc cgacaaacag 1620
gcgttctga tccgcgaact gaactccaaa cgtccgcttc tgccgcgcaa ctggcaacca 1680
agcgcgaaa cgcgcgaagt gctcgatacc tgccagtgga ttgccgaagc accgcaaggc 1740
tccattgccg cctacgtgat ctcgatggcg aaaacgccgt ccgacgtact ggctgtccac 1800
ctgctgctga aagaagcggg tatcgggttt gcgatccgg ttgctccgct gtttgaacc 1860
ctcgatgatc tgaacaacgc caacgatgtc atgaccagc tgctcaatat tgactggtat 1920
cgtggcctga ttcagggcaa acagatggtg atgattggct attccgactc agcaaaagat 1980
gcgggagtga tggcagcttc ctggcgcaa tatcaggcac aggatgcatt aatcaaaacc 2040
tgcgaaaaag cgggtattga gctgacgtt ttccacggtc gcggcggttc cattggtcgc 2100

ES 2 656 892 T3

```

ggcggcgcac ctgctcatgc ggcgctgctg tcacaaccgc caggaagcct gaaaggcggc      2160
ctgcgcgtaa ccgaacaggg cgagatgatc cgctttaa atggctctgcc agaaatcacc      2220
gtcagcagcc tgtcgcttta taccggggcg attctggaag ccaacctgct gccaccgccc      2280
gagccgaaa agagctggcg tcgcattatg gatgaactgt cagtcatctc ctgcgatgtc      2340
taccgcggt acgtacgtga aaacaaagat tttgtgcctt acttccgctc cgctacgccc      2400
gaacaagaac tgggcaaact gccgttgggt tcacgtccgg cgaaacgtcg cccaaccggc      2460
ggcgtcgagt cactacgcgc cattccgtgg atcttcgcct ggacgcaaaa ccgtctgatg      2520
ctccccgct ggctgggtgc aggtacggcg ctgcaaaaag tggtcgaaga cggcaaacag      2580
agcgagctgg aggctatgtg ccgcgattgg ccattcttct cgacgcgtct cggcatgctg      2640
gagatggtct tcgccaaagc agacctgtgg ctggcggaat actatgacca acgcctggta      2700
gacaaagcac tgtggccggt aggtaaagag ttacgcaacc tgcaagaaga agacatcaaa      2760
gtggtgctgg cgattgcaa cgattccat ctgatggccg atctgccgtg gattgcagag      2820
tctattcagc tacggaatat ttacaccgac ccgctgaacg tattgcaggc cgagttgctg      2880
caccgctccc gccaggcaga aaaagaaggc caggaaccgg atcctcgcgt cgaacaagcg      2940
ttaatggtca ctattgccgg gattgcccga ggtatgcgta ataccggcta atcttctct      3000
ctcgcaaac ctcggtcttt tgcgcgaggg tttctgaaa tacttctgtt ctaaacacct      3060
cgttttcaat atatttctgt ctgcatttta ttcaaa      3096

```

- <210> 30
- <211> 1556
- 5 <212> ADN
- <213> *Escherichia coli* W3110
- <220>
- <221> gen
- 10 <222> (1)..(1556)
- <223> aspC
- <400> 30

ES 2 656 892 T3

```

gtccacctat gttgactaca tcatcaacca gatcgattct gacaacaaac tgggcgtagg      60
ttcagacgac accggttgctg tgggtatcgt ttaccagttc taatagcaca cctctttggt      120
aaatgccgaa aaaacaggac tttggtcctg ttttttttat accttcaga gcaatctcac      180
gtcttgcaaa aacagcctgc gttttcatca gtaatagttg gaattttgta aatctcccgt      240
taccctgata ggggacttcc cttctgtaac cataatggaa cctcgtcatg tttgagaaca      300
ttaccgccgc tcctgccgac ccgattctgg gcctggccga tctgtttcgt gccgatgaac      360
gtcccggcaa aattaacctc gggattggtg tctataaaga tgagacgggc aaaaccccgg      420
tactgaccag cgtgaaaaag gctgaacagt atctgctcga aatgaaacc accaaaaatt      480

acctcgcat tgacggcatc cctgaatttg gtcgctgcac tcaggaactg ctgtttggtgta      540
aaggtagcgc cctgatcaat gacaaacgtg ctgcacggc acagactccg gggggcactg      600
gcgcaactag cgtggctgcc gatttctgga caaaaaatac cagcgtaag cgtgtgtggg      660
tgagcaacc aagctggccg aaccataaga gcgtctttaa ctctgcaggc ctggaagttc      720
gtgaatacgc ttattatgat gcggaaaatc aactcttga cttcgaatga ctgattaaca      780
gcctgaatga agctcaggct ggcgacgtag tgctgttcca tggctgctgc cataacccaa      840
ccggtatcga ccctacgctg gaacaatggc aaactctggc acaactctcc gttgagaaag      900
gctggttacc gctgtttgac ttcgcttacc agggttttgc ccgtggtctg gaagaagatg      960
ctgaaggact gcgcgctttc gcggctatgc ataaagagct gattgttgcc agttcctact      1020
ctaaaaactt tggcctgtac aacgagcgtg ttggcgcttg tactctggtt gctgccgaca      1080
gtgaaaccgt tgatcgcgca ttcagccaaa tgaaagcggc gattcgcgct aactactcta      1140
accaccagc acacggcgct tctgttggtg ccaccatcct gagcaacgat gcgttacgtg      1200
cgatttgga acaagagctg actgatatgc gccagcgtat tcagcgtatg cgtcagttgt      1260
tcgtcaatac gctgcaggaa aaaggcgcaa accgcgactt cagctttatc atcaaacaga      1320
acggcatggt ctcttcagt ggcctgacaa aagaacaagt gctgcgtctg cgcgaagagt      1380
ttggcgata tgcggttgct tctggtcgcg taaatgtggc cgggatgaca ccagataaca      1440
tggctccgct gtgcgaagcg attgtggcag tgctgtaagc attaaaaaca atgaagcccg      1500
ctgaaaagcg ggctgagact gatgacaaac gcaacattgc ctgatgcgct acgctt      1556

```

5 <210> 31
 <211> 894
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* W3110

10 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(894)
 <223> nadC ORF

<400> 31

ES 2 656 892 T3

atgccgcctc gccgctataa ccctgacacc cgacgtgacg agctgctgga acgcattaat 60
ctcgatatcc ccggcgcggt ggcccaggcg ctgcggggaag attaggcgg aacagtcgat 120
gccaacaatg atattacgyc aaaactttta ccgghaaaatt ctgctctca tgccacggtg 180
atcaccocgcy agaatggcgt cttttgcggc aaacgctggg ttgaagaggt gtttattcaa 240
ctggcaggcg acgatgtcac cataatctgg catgtggatg acggcgatgt catcaatgcc 300
aatcaatcct tgttcgaact tgaaggccca tcccgcgtgc tgtaacggg cgaacgcact 360
gcgcttaatt ttgtgcaaac cttttcagga gttgccagta aggtacgcca ctatgtcgaa 420

ttgctggaag gcaccaacac gcagttggtg gatacgcgca aaaccttacc cggcctgcgt 480
tcagctctga aatacgcggt actttgcggc ggcggagcga atcacctctc ggggctttct 540
gatgccttcc tgatcaaaga aaacatatt attgcctccg gctcagtgcg ccaggcggtc 600
gaaaaagcgt cctggctgca cccggatgcy ccagtagaag tccaagtaca gaatctggaa 660
gaacttgatg aagccctgaa agcaggagcc gatatcatca tgctggataa cttcgaaaca 720
gaacagatgc gcgaagccgt caaacgcacc aacggcaagg cgctactgga agtgtctggc 780
aacgtcactg acaaaacact gcgtgaattt gccgaaacgg gcgtggactt tatctccgtc 840
ggtgcgctaa ctaaaccggt acaagcactc gacctttcaa tgcgttttcg ctaa 894

5 <210> 32
<211> 135
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Promotor Pro

<400> 32

ctcgagcata gcatttttat ccataagatt agcggatcta acctttacaa ttgtgagcgc 60
tcacaattat gatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag 120
aggagaaagg tacat 135

15 <210> 33
<211> 5741
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Vector plásmido (pPro-NBA)

<400> 33

ES 2 656 892 T3

ctcgagcata gcatttttat ccataagatt agcggatcta acctttacaa ttgtgagcgc	60
tcacaattat gatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag	120
aggagaaagg tacatatgaa tactctccct gaacattcat gtgacgtggt gattatcggg	180
agcggcgcag ccggactttc actggcgcta cgcctggctg accagcatca ggtcatcgtt	240
ctaagtaaag gcccgtaac ggaaggttca acattttatg cccagggcgg tattgcogcc	300
gtgtttgatg aaactgacag cattgactcg catgtggaag acacattgat tgccggggct	360
ggtatttgcg atcgccatgc agttgaattt gtcgccagca atgcacgatc ctgtgtgcaa	420
tggctaactg accagggggt gttgtttgat acccacattc aaccgaatgg cgaagaaagt	480
taccatctga cccgtgaagg tggacatagt caccgtcgtg ttcttcatgc cgccgacgcc	540

ES 2 656 892 T3

accggtagag aagtagaaac cacgctggtg agcaaggcgc tgaaccatcc gaatattcgc 600
 gtgctggagc gcagcaacgc ggttgatctg attgtttctg acaaaattgg cctgccgggc 660
 acgcgacggg ttgttggcgc gtgggtatgg aaccgtaata aagaaacggt ggaaacctgc 720
 cacgcaaaag cggtggtgct ggcaaccggc ggtgcgtcga aggtttatca gtacaccacc 780
 aatccggata tttcttctgg cgatggcatt gctatggcgt ggcgcgcagg ctgccgggtt 840
 gccaatctcg aatttaataca gttccacct accgcgctat atcaccaca ggacgcaat 900
 ttctgttaa cagaagcact gcgcggcgaa ggcgcttacc tcaagcggcc ggatggtacg 960
 cgttttatgc ccgattttga tgagcgggc gaactggccc gcgcgcatat tgtcggccc 1020
 gccattgacc atgaaatgaa acgcctcggc gcagattgta tgttccttga tatcagccat 1080
 aagcccgccg attttattcg ccagcatttc ccgatgattt atgaaaagct gctcgggctg 1140
 gggattgatc tcacacaaga accgtaaccg attgtgcctg ctgcacatta tacctgcggt 1200
 ggtgtaatgg ttgatgatca tgggcgtacg gacgtcgagg gcttgtatgc cattggcgag 1260
 gtgagttata ccggcttaca cggcgctaac cgcattggcct cgaattcatt gctggagtgt 1320
 ctggtctatg gctggtcggc ggcggaagat atcaccagac gtatgcctta tgcccacgac 1380
 atcagtacgt taccgccgtg ggatgaaagc cgcgttgaga accctgacga acgggtagta 1440
 attcagcata actggcacga gctacgtctg tttatgtggg attacgttgg cattgtgcgc 1500
 acaacgaagc gcctggaacg cgcctcggc cggataacca tgctccaaca agaaatagac 1560
 gaatattacg cccatttccg cgtctcaaat aatttgctgg agctgcgtaa tctggtacag 1620
 gttgccgagt tgattgttcg ctgtgcaatg atgcgtaaag agagtcgggg gttgcatttc 1680
 acgctggatt atccggaact gctcacccat tccggtccgt cgatcctttc ccccgcaat 1740
 cattacataa acagataaaa agcctgggtc agcgcctgat acgcttcgga atagttctgg 1800
 tctggcccac gaatgactaa gcgatcgcta aagcattctc ccgctcggg ggagaatgcc 1860
 agcagcaccg gatcggcgag tcgcgcttcg tttccgcca catccgtccg caaacgtaa 1920
 tgccagccca tgcttaatgc cagctccgta aaaccattac caatctgctc tggcagcact 1980
 acgcagaaaa atccctcttc ggtaatgcac tccgccgcac aggtcagcaa cgatgggtga 2040
 tcaagcgtag tggtataggg atccctcgag catagcattt ttatccataa gattagcggg 2100
 tctaaccttt acaattgtga gcgctcacia ttatgataga ttcaattgtg agcggataac 2160
 aatttcacac agaattcatt aaagaggaga aaggtacatg ggcccatgag cgtaatggtt 2220
 gatccagaca cggcgattta tcctttccc ccgaagcoga cgccttaag cattgatgaa 2280
 aaagcgtatt accgcgagaa gataaaacgt ctgctaaaag aacgtaatgc ggtgatggtt 2340
 gccactact ataccgatcc cgaattcaa caactggcag aagaaaccgg tggctgtatt 2400
 tctgattctc tggaaatggc gcgcttcggt gcaaagcacc ccgcttctac tttgttagtc 2460

ES 2 656 892 T3

gctggggtga gatttatggg agaaaccgcc aaaattctca gtccggaaaa aacaattctg 2520
atgccgacac ttcaggctga atgttcaactg gatctcggct gccctggtga agaatttaac 2580
gcattttgcg atgcccaccc cgatcgtact gtcgctcgtct acgccaacac ttctgctgcg 2640
gtaaaagcgc gcgcagattg ggtggtaact tcaagcattg ccgtcgaact tattgatcat 2700
cttgatagtt tgggtgaaaa aatcatctgg gcacccgaca aacatctggg gcgttacgtg 2760
caaaaacaga cgggtggaga cattctatgc tggcagggtg cctgtattgt gcatgatgaa 2820
ttaaagactc aggcgttaac ccgcttgcaa gaagaatacc cggatgctgc catactggtg 2880
catccagaat caccacaagc tattgtcgat atggcggatg cggtcggttc caccagtcaa 2940
ctgatcgctg ctgcaaaaac attgccacat cagaggctta ttgtggcaac cgatcggggt 3000
attttctaca aatgcagca ggcggtgcc aataaagagt tactggaagc accaaccgca 3060
ggtgagggtg caacctgccg cagctgcgcg cattgtccgt ggatggccat gaatggcctt 3120
caggccatcg cagaggcatt agaacaggaa ggaagcaatc acgaggttca tgttgatgaa 3180
aggctgcgag agagggcgct ggtgccgctc aatcgtatgc tggattttgc ggctacacta 3240
cgtggataac gaataataag gcgtaacgtt acgctttggg ggaaagatgg atttttttag 3300
tgtgcagaat atcctggtac atataccaat aggggcaggc ggttatgatc tctcatggat 3360
cgaagcggta ggcacgagcg gccgcttaat taattaatct agaggcatca aataaaacga 3420
aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctggt gtttgcggt gaacgctctc 3480
ctgagtagga caaatccgcc gccctagacc taggggatat attccgcttc ctcgctcaact 3540
gactcgctac gctcggctgt tcgactgcgg cgagcggaaa tggcttacga acggggcgga 3600
gatttctctg aagatgccag gaagatactt aacagggaa tggaggggccc gcggcaaaagc 3660
cgtttttcca taggctccgc cccctgaca agcatcacga aatctgacgc tcaaatcagt 3720
ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctggc ggctccctcg 3780
tgcgctctcc tgttctctgcc tttcggttta ccggtgtcat tccgctgta tggccgcggt 3840
tgtctcattc cagcctgac actcagttcc gggtaggcag ttcgctccaa gctggactgt 3900
atgcacgaac cccccgtca gtccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tctgtctgag 3960
tccaaccgga aaagacatgc aaaagcacca ctggcagcag ccactggtaa ttgatttaga 4020
ggagttagtc ttgaagtcac gcgcccgtta aggctaaact gaaaggacaa gttttggtga 4080
ctgcgctcct ccaagccagt tacctcgggt caaagagttg gtagctcaga gaaccttoga 4140
aaaaccgccc tgcaaggcgg ttttttcggt ttcagagcaa gagattacgc gcagaccaa 4200
acgatctcaa gaagatcatc ttattaatca gataaaatat tactagattt cagtgcaatt 4260
tatctcttca aatgtagcac ctgaagtcag cccatacga tataagttgt tactagtgt 4320

ES 2 656 892 T3

tggattctca ccaataaaaa acgcccggcg gcaaccgagc gttctgaaca aatccagatg 4380
gagttctgag gtcattactg gatctatcaa caggagtcca agcgagctct cgaaccccag 4440
agtcccgctc agaagaactc gtcaagaagg cgatagaagg cgatgcgctg cgaatcggga 4500
gcgggcgtac cgtaaagcac gaggaagcgg tcagcccatt cgccgccaag ctcttcagca 4560
atatcacggg tagccaacgc tatgtcctga tagcgggccg ccacaccag cgggccacag 4620
tcgatgaatc cagaaaagcg gccatthttcc accatgatat tcggcaagca ggcatcgcca 4680
tgggtcacga cgagatcctc gccgtcgggc atgcgcgcct tgagcctggc gaacagttcg 4740
gctggcgcga gccctgatg ctcttcgtcc agatcatcct gatcgacaag accggcttcc 4800
atccgagtac gtgctcgctc gatgcgatgt ttcgcttggt ggtcgaatgg gcaggtagcc 4860
ggatcaagcg tatgcagccg ccgcattgca tcagccatga tggatacttt ctccggcagga 4920
gcaaggtgag atgacaggag atcctgcccc ggcaactcgc ccaatagcag ccagtcctt 4980
cccgttcag tgacaacgct gagcacagct gcgcaaggaa cgcccgtcgt ggccagccac 5040
gatagccgcg ctgcctcgct ctgcagttca ttcagggcac cggacaggtc ggtcttgaca 5100
aaaagaaccg ggcgcccctg cgctgacagc cggaacacgg cggcatcaga gcagccgatt 5160
gtctgttggt cccagtcata gccgaatagc ctctccaccc aagcggccgg agaacctgcg 5220
tgcaatccat cttgttcaat catgcgaaac gatcctcatc ctgtctcttg atcagatctt 5280
gatcccctgc gccatcagat ccttgccggc aagaaagcca tccagtttac tttgcagggc 5340
ttccaacct taccagaggg cgccccagct ggcaattccg acgtctgtgt ggaattctcg 5400
gacaccgagg agaatgtcaa gaggcgaaca cacaacgtct tggagcgcca gaggaggaac 5460
gagctaaaac ggagcttttt tgccctgcgt gaccagatcc cggagttgga aaacaatgaa 5520
aaggcccca aggtagttat ccttaaaaaa gccacagcat acatcctgtc cgtccaagca 5580
gaggagcaaa agctcatttc tgaagaggac ttgttcgga aacgacgaga acagttgaaa 5640
cacaaacttg aacagctacg gaactcttgt gcgtaaggaa aagtaaggaa aacgattcct 5700
tctaacagaa atgtcctgag caatcaccta tgaactgtcg a 5741

<210> 34
<211> 5226
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Vector plásmido (pNBHL1A)

10

<400> 34

ctcgagcata gcatttttat ccataagatt agcggatcta accttaca ttgtgagcgc 60
tcacaattat gatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag 120

ES 2 656 892 T3

aggagaaagg tacatatgaa tactctccct gaacattcat gtgacgtggt gattatcggg 180
 agcggcgcag cgggactttc actggcgcta cgcctggctg accagcatca ggtcatcggt 240
 ctaagtaaag gcccggtaac ggaaggttca acattttatg cccagggcgg tattgcccgc 300
 gtgtttgatg aaactgacag cattgactcg catgtggaag acacattgat tgcccgggct 360
 ggtatttgcg atcgccatgc agttgaattt gtcgccagca atgcacgatc ctgtgtgcaa 420
 tggctaactc accagggggg gttgtttgat acccacattc aaccgaatgg cgaagaaagt 480
 taccatctga ccggtgaag tggacatagt caccgtcgtg ttcttcatgc cgccgacgcc 540
 accggtagag aagtagaaac cacgctggtg agcaaggcgc tgaaccatcc gaatattcgc 600
 gtgctggagc gcagcaacgc ggttgatctg attgtttctg acaaaattgg cctgccgggc 660
 acgcgacggg ttgttggcgc gtgggtatgg aaccgtaata aagaaacggg ggaaacctgc 720
 cacgcaaaag cgggtggtgct ggcaaccggc ggtgcgtcga aggtttatca gtacaccacc 780
 aatccggata tttcttctgg cgatggcatt gctatggcgt ggcgcgcagg ctgccggggt 840
 gccaatctcg aatttaatca gttccaccct accgcgctat atcaccaca gccacgcaat 900
 ttctgttaa cagaagcact gcgcgcgaa ggcgcttacc tcaagcgccc ggatggtacg 960
 cgttttatgc cggattttga tgagcgcggc gaactggccc cgcgcgatat tgcgcccgc 1020
 gccattgacc atgaaatgaa acgcctcggc gcagattgta tgttccttga tatcagccat 1080
 aagcccgcg attttattcg ccagcattc ccgatgattt atgaaaagct gctcgggctg 1140
 gggattgatc tcacacaaga accggtagcg attgtgcctg ctgcacatta tacctgcggt 1200
 ggtgtaatgg ttgatgatca tgggcgtacg gacgtcgagg gcttgatgc cattggcgag 1260
 gtgagttata cgggcttaca cggcgctaac cgcattggcct cgaattcatt gctggagtgt 1320
 ctggtctatg gctggcggc ggcggaagat atcaccagac gtatgcctta tgcccacgac 1380
 atcagtacgt taccgccgtg ggatgaaagc cgcgttgaga accctgacga acgggtagta 1440
 attcagcata actggcacga gctacgtctg tttatgtggg attacgttg cattgtgcgc 1500
 acaacgaagc gcctggaacg cgccctcggc cggataacca tgctccaaca agaaatagac 1560
 gaatattacg ccatttccg cgtctcaaat aatttgctgg agctgcgtaa tctggtacag 1620
 gttgccgagt tgattgttcg ctgtgcaatg atgcgtaaag agagtcgggg gttgcatttc 1680
 acgctggatt atccggaact gctcacccat tccggtccgt cgatcctttc ccccgcaat 1740
 cattacataa acagaatcct ggcagaagca gccgcgaagg cagcagccct gcagatgagc 1800
 gtaatgtttg atccagacac ggcgatttat ctttcccc cgaagccgac gccgttaagc 1860
 attgatgaaa aagcgtatta ccgcgagaag ataaaacgtc tgctaaaaga acgtaatgcg 1920
 gtgatggttg ccactacta taccgatccc gaaattcaac aactggcaga agaaaccggg 1980
 ggctgtattt ctgattctct ggaaatggcg cgcttcgggtg caaagcatcc cgcttctact 2040

ES 2 656 892 T3

ttgttagtgc	ctggggtgag	atztatggga	gaaaccgcca	aaattctcag	tccggaaaaa	2100
acaattctga	tgccgacact	tcaggctgaa	tgttcaactg	atctcggctg	ccctgttgaa	2160
gaatttaacg	cattttgCGA	tgcccatccc	gatcgtactg	tcgtcgtcta	cgccaacact	2220
tctgctgcgg	taaaagcgcg	cgCagattgg	gtggtaactt	caagcattgc	cgtcgaactt	2280
attgatcatc	ttgatagttt	gggtgaaaaa	atcatctggg	cacccgacaa	acatctgggg	2340
cgttacgtgc	aaaaacagac	gggtggagac	attctatgct	ggcagggtgc	ctgtattgtg	2400
catgatgaat	ttaagactca	ggcgttaacc	cgcttgcaag	aagaataccc	ggatgctgcc	2460
atactggTgc	atccagaatc	accacaagct	attgtcgata	tggcggatgc	ggtcggttcc	2520
accagtcaac	tgatcgctgc	tgcgaaaaca	ttgccacatc	agaggcttat	tgtggcaacc	2580
gatcggggta	ttttctacaa	aatgcagcag	gcggtgccag	ataaagagtt	actggaagca	2640
ccaaccgcag	gtgagggtgc	aacctgccgc	agctgcgcgc	attgtccgtg	gatggccatg	2700
aatggccttc	aggccatcgc	agaggcatta	gaacaggaag	gaagcaatca	cgaggttcat	2760
gTtgatgaaa	ggctgcgaga	gagggcgctg	gtgccgctca	atcgtatgct	ggatTTTgcg	2820
gctacactac	gtggataacc	cgggggatcc	actagtTcta	gagcggccgc	ttaattaatt	2880
aatctagagg	catcaaataa	aacgaaaggc	tcagtcgaaa	gactgggcct	ttcgTTTTat	2940
ctgTtGTTtg	tCGgtgaacg	ctctcctgag	taggacaaaat	ccgcccgcct	agacctaggg	3000
gatatattcc	gcttcctcgc	tactgactc	gctacgctcg	gtcgttcgac	tgcggcgagc	3060
ggaaatggct	tacgaacggg	gcggagattt	cctggaagat	gccaggaaga	tacttaacag	3120
ggaagtgaga	gggcccgggc	aaagccgTtt	ttccataggc	tccgcccccc	tgacaagcat	3180
cacgaaatct	gacgctcaaa	tcagtggTgg	cgaaacCCga	caggactata	aagataccag	3240
gcgTttcccc	ctggcggctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	ctgcctttcg	gtttaccggt	3300
gtcattccgc	tgTtatggcc	gcgTttgtct	cattccacgc	ctgacactca	gttccgggta	3360
ggcagTtcgc	tccaagctgg	actgtatgca	cgaacCCCCc	gttcagtccg	accgctgcgc	3420
cttatccggt	aactatcgtc	ttgagtccaa	cccggaaaga	catgcaaaaag	caccactggc	3480
agcagccact	ggtaattgat	ttagaggagt	tagtcttgaa	gtcatgcgcc	ggTtaaggct	3540
aaactgaaag	gacaagTttt	ggtgactgcg	ctcctccaag	ccagttacct	cgTttcaaag	3600
agTtggtagc	tcagagaacc	ttcgaaaaac	cgccctgcaa	ggcggTtttt	tcgTtttcag	3660
agcaagagat	tacgcgcaga	ccaaaacgat	ctcaagaaga	tcatcttatt	aatcagataa	3720
aatattacta	gatttcagtg	caatttatct	cttcaaatgt	agcacctgaa	gtcagCCCCa	3780
tacgatataa	gttgTtacta	gtgcttggat	tctcaccaat	aaaaaacgcc	cggcggcaac	3840
cgagcgTtct	gaacaaatcc	agatggagtt	ctgaggtcat	tactggatct	atcaacagga	3900

ES 2 656 892 T3

gtccaagcga gctctcgaac cccagagtcc cgctcagaag aactcgtcaa gaaggcgata 3960
 gaaggcgatg cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa agcacgagga agcggtcagc 4020
 ccattcgccg ccaagctctt cagcaatatic acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg 4080
 gtccgccaca cccagccggc cacagtcgat gaatccagaa aagcggccat tttccaccat 4140
 gatattcggc aagcaggcat cgccatgggt cacgacgaga tcctcgcctg cgggcatgcg 4200
 cgccttgagc ctggcgaaca gttcggctgg cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc 4260
 atcctgatcg acaagaccgg cttccatccg agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc 4320
 ttggtggctg aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc agccgccgca ttgcatcagc 4380
 catgatggat actttctcgg caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gccccggcac 4440
 ttcgcccaat agcagccagt cccttcccgc ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca 4500
 aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag ccgcgctgcc tcgtcctgca gttcattcag 4560
 ggcaccggac aggtcggctc tgacaaaaag aaccgggccc ccctgcgctg acagccggaa 4620
 cacggcggca tcagagcagc cgattgtctg ttgtgccag tcatagccga atagcctctc 4680
 cacccaagcg gccggagaac ctgcgtgcaa tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc 4740
 tcacctctgtc tcttgatcag atcttgatcc cctgcgccat cagatccttg gcggcaagaa 4800
 agccatccag tttactttgc agggcttccc aaccttacca gagggcgccc cagctggcaa 4860
 ttccgacgtc tgtgtggaat tctcggacac cgaggagaat gtcaagaggc gaacacacaa 4920
 cgtcttgag cgccagagga ggaacgagct aaaacggagc ttttttgccc tgcgtgacca 4980
 gatcccggag ttggaaaaca atgaaaaggc cccaaggta gttatcctta aaaaagccac 5040
 agcatacatc ctgtccgtcc aagcagagga gcaaaagctc atttctgaag aggacttggt 5100
 gcggaaacga cgagaacagt tgaaacacaa acttgaacag ctacggaact cttgtgcgta 5160
 aggaaaagta aggaaaacga ttccttctaa cagaaatgct ctgagcaatc acctatgaac 5220
 tgtcga 5226

<210> 35
 <211> 5241
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Vector plásmido (pNBHL2A)

<400> 35

ctcgagcata gcatttttat ccataagatt agcggatcta acctttacaa ttgtgagcgc 60
 tcacaattat gatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag 120
 aggagaaagg tacatatgaa tactctccct gaacattcat gtgacgtggt gattatcggc 180

ES 2 656 892 T3

agcggcgcag ccggactttc actggcgcta cgcctggctg accagcatca ggtcatcggt 240
 ctaagtaaag gcccggtaac ggaaggttca acattttatg cccagggcgg tattgccgcc 300
 gtgtttgatg aaactgacag cattgactcg catgtggaag acacattgat tgccggggct 360
 ggtatttgcg atcgccatgc agttgaattt gtcgccagca atgcacgatc ctgtgtgcaa 420
 tggctaaticg accagggggg gttgtttgat acccacattc aaccgaatgg cgaagaaagt 480
 taccatctga cccgtgaagg tggacatagt caccgtcgta ttcttcatgc cgccgacgcc 540
 accggtagag aagtagaaac cacgctggtg agcaaggcgc tgaaccatcc gaatattcgc 600
 gtgctggagc gcagcaacgc ggttgatctg attgtttctg acaaaattgg cctgccgggc 660
 acgcgacggg ttgttggcgc gtgggtatgg aaccgtaata aagaaacggt ggaaacctgc 720
 cacgcaaaag cgtggtgct ggcaaccggc ggtgcgtcga aggtttatca gtacaccacc 780
 aatccggata tttcttctgg cgatggcatt gctatggcgt ggcgcgcagg ctgccgggtt 840
 gccaatctcg aatttaata gttccaccct accgcgctat atcaccaca gccacgcaat 900
 ttctgttaa cagaagcact gcgcggcgaa ggcgcttacc tcaagcgcgc ggatggtacg 960
 cgttttatgc ccgattttga tgagcggcgc gaactggccc cgcgcgatat tgtcgcgcgc 1020
 gccattgacc atgaaatgaa acgcctcggc gcagattgta tgttccttga tatcagccat 1080
 aagcccgcgc attttattcg ccagcatttc ccgatgattt atgaaaagct gctcgggctg 1140
 gggattgatc tcacacaaga accggtaccg attgtgcctg ctgcacatta tacctgcggt 1200
 ggtgtaatgg ttgatgatca tgggcgtacg gacgtcgagg gcttgtatgc cattggcgag 1260
 gtgagttata ccggttaca cggcgctaac cgcattggcct cgaattcatt gctggagtgt 1320
 ctggtctatg gctggtcggc ggcggaagat atcaccagac gtatgcctta tgcccacgac 1380
 atcagtacgt taccccgctg ggatgaaagc cgcgttgaga accctgacga acgggtagta 1440
 attcagcata actggcacga gctacgtctg tttatgtggg attacgttg cattgtgcgc 1500
 acaacgaagc gcctggaacg cgcctcggc cggataacca tgctccaaca agaaatagac 1560
 gaatattacg cccatttccg cgtctcaaat aatttgctgg agctgcgtaa tctggtacag 1620
 gttgccgagt tgattgttcg ctgtgcaatg atgcgtaaag agagtcgggg gttgcatttc 1680
 acgctggatt atccggaact gctcaccat tccggtccgt cgatcctttc ccccggaat 1740
 cattacataa acagaatcct ggcagaagca gccgcgaagg aagcagccgc gaaggcagca 1800
 gccctgcaga tgagcgtaat gttgatcca gacacggcga tttatccttt cccccgaag 1860
 ccgacgccgt taagcattga tgaaaaagcg tattaccgcg agaagataaa acgtctgcta 1920
 aaagaacgta atgcggtgat ggttgcacc tactataccg atcccgaat tcaacaactg 1980
 gcagaagaaa ccggtggctg tatttctgat tctctggaaa tggcgcgctt cgtgcaaaag 2040
 catcccgctt ctactttggt agtcgctggg gtgagattta tgggagaaac cgccaaaatt 2100

ES 2 656 892 T3

ctcagtcgga aaaaaacaat tctgatgccg acacttcagg ctgaatgttc actggatctc 2160
ggctgcccctg ttgaagaatt taacgcattt tgcgatgccc atcccgatcg tactgtcgtc 2220
gtctacgccca acacttctgc tgcggtaaaa gcgcgcgcag attgggtggg aacttcaagc 2280
attgccgtcg aacttattga tcatcttgat agtttggggtg aaaaaatcat ctgggcaccc 2340
gacaaacatc tggggcggtta cgtgcaaaaa cagacgggtg gagacattct atgctggcag 2400
ggtgcctgta ttgtgcatga tgaatttaag actcaggcgt taaccgcgctt gcaagaagaa 2460
taccgggatg ctgccatact ggtgcatcca gaatcaccac aagctattgt cgatatggcg 2520
gatgcgggtcg gttccaccag tcaactgatc gctgctgoga aaacattgcc acatcagagg 2580
cttattgtgg caaccgatcg gggatatttc taaaaaatgc agcaggcggg gccagataaa 2640
gagttactgg aagcaccaac cgcagggtgag ggtgcaacct gccgcagctg cgcgcattgt 2700
ccgtgggatg ccatgaatgg ccttcaggcc atcgcagagg cattagaaca ggaaggaagc 2760
aatcacgagg ttcatgttga tgaaggctg cgagagaggg cgctgggtgcc gctcaatcgt 2820
atgctggatt ttgcggctac actacgtgga taaccggggg gatccactag ttctagagcg 2880
gccgcttaat taattaatct agaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg 2940
ggcctttcgt tttatctggt gtttgcgggt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc 3000
gccctagacc taggggatat attccgcttc ctgcgtcact gactcgctac gctcggctcgt 3060
tcgactgctg cgagcggaaa tggcttacga acggggcgga gatttcctgg aagatgccag 3120
gaagatactt aacaggaag tgagagggcc gcggcaaagc cgtttttcca taggctccgc 3180
ccccctgaca agcatcacga aatctgacgc tcaaatcagt ggtggcgaaa cccgacagga 3240
ctataaagat accaggcgtt tccccctggc ggctccctcg tgcgctctcc tgttctgcc 3300
tttcggttta ccgggtgcat tccgctgtta tggccgcggt tgtctcattc cacgcctgac 3360
actcagttcc gggtaggcag ttcgctccaa gctggactgt atgcacgaac cccccgttca 3420
gtccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaaccggg aaagacatgc 3480
aaaagcacca ctggcagcag ccaactgtaa ttgatttaga ggagttagtc ttgaagtcac 3540
gcgccgggta aggctaaact gaaaggaaa gttttgggtga ctgcgctcct ccaagccagt 3600
tacctcgggtt caaagagttg gtagctcaga gaaccttcga aaaaccgccc tgcaagggcg 3660
ttttttcgtt ttcaagagca gagattacgc gcagaccaa acgatctcaa gaagatcatc 3720
ttattaatca gataaaatat tactagattt cagtgcattt tatctcttca aatgtagcac 3780
ctgaagtcag ccccatcaga tataagttgt tactagtgtt tggattctca ccaataaaaa 3840
acgccccggc gcaaccgagc gttctgaaca aatccagatg gagttctgag gtcattactg 3900
gatctatcaa caggagtcca agcgagctct cgaaccccag agtcccgtc agaagaactc 3960

ES 2 656 892 T3

gtcaagaagg cgatagaagg cgatgcgctg cgaatcggga gcggcgatac cgtaaagcac 4020
gaggaagcgg tcagcccatt cgccgccaag ctcttcagca atatcacggg tagccaacgc 4080
tatgtcctga tagcgggtccg ccacaccag ccggccacag tcgatgaatc cagaaaagcg 4140
gccattttcc accatgatat tcggcaagca ggcatcgcca tgggtcacga cgagatcctc 4200
gccgtcgggc atgcgcgcct tgagcctggc gaacagttcg gctggcgcgga gccctgatg 4260
ctcttcgtcc agatcatcct gatcgacaag accggcttcc atccgagtac gtgctcgctc 4320
gatgcgatgt ttcgcttggg ggtcgaatgg gcaggtagcc ggatcaagcg tatgcagccg 4380
ccgcattgca tcagccatga tggatacttt ctccggcagga gcaaggtgag atgacaggag 4440
atcctgcccc ggcacttcgc ccaatagcag ccagtccctt cccgcttcag tgacaacgtc 4500
gagcacagct gcgcaaggaa cgcccgtcgt ggccagccac gatagccgcg ctgcctcgtc 4560
ctgcagttca ttcagggcac cggacaggtc ggtcttgaca aaaagaaccg ggcgcccctg 4620
cgctgacagc cggaacacgg cggcatcaga gcagccgatt gtctgtttgt cccagtcata 4680
gccgaatagc ctctccacc aagcggccgg agaacctgcg tgcaatccat cttgttcaat 4740
catgcgaaac gatcctcatc ctgtctcttg atcagatctt gatcccctgc gccatcagat 4800
ccttggcggc aagaaagcca tccagtttac tttgcagggc ttcccaacct taccagaggg 4860
cgcccagct ggcaattccg acgtctgtgt ggaattctcg gacaccgagg agaatgtcaa 4920
gaggcgaaca cacaacgtct tggagcgcca gaggaggaac gagctaaaac ggagcttttt 4980
tgccctgctg gaccagatcc cggagttgga aaacaatgaa aaggccccca aggtagttat 5040
ccttaaaaaa gccacagcat acatcctgtc cgtccaagca gaggagcaaa agctcatttc 5100
tgaagaggac ttgttgcgga aacgacgaga acagttgaaa cacaaacttg aacagctacg 5160
gaactcttgt gcgtaaggaa aagtaaggaa aacgattcct tctaacagaa atgtcctgag 5220
caatcaccta tgaactgtcg a 5241

<210> 36
<211> 5256
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Vector plásmido (pNBHL3A)

10

<400> 36

ctcgagcata gcatttttat ccataagatt agcggatcta acctttacaa ttgtgagcgc 60
tcacaattat gatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag 120
aggagaaagg tacatatgaa tactctocct gaacattcat gtgacgtgtt gattatcggc 180
agcggcgcgag ccggactttc actggcgcta cgcctggctg accagcatca ggtcatcgct 240

ES 2 656 892 T3

ctaagtaaag gcccggtaac ggaaggttca acatthttatg cccagggcgg tattgccgcc 300
 gtgtttgatg aaactgacag cattgactcg catgtggaag acacattgat tgccggggct 360
 ggtatthtgcg atcgccatgc agttgaatth gtcgccagca atgcacgatc ctgtgtgcaa 420
 tggctaaticg accaggggggt gttgtttgat acccacattc aaccgaatgg cgaagaaagt 480
 taccatctga cccgtgaagg tggacatagt caccgtcgtat ttcttcatgc cgcgcacgcc 540
 accggtagag aagtagaaac cacgctgggtg agcaaggcgc tgaacatcc gaatattcgc 600
 gtgctggagc gcagcaacgc ggttgatctg attgtttctg acaaaattgg cctgccgggc 660
 acgcgacggg ttgttgccgc gtgggtatgg aaccgtaata aagaaacggg ggaaacctgc 720
 cacgcaaaag cggtggtgct ggcaaccggc ggtgcgctga aggtttatca gtacaccacc 780
 aatccggata thtcttctgg cgatggcatt gctatggcgt ggcgcgagg ctgccgggtt 840
 gccaatctcg aatttaatca gttccaccct accgcgctat atcaccacaca ggcacgcaat 900
 ttctgttaa cagaagcact gcgcggcgaa ggcgcttatic tcaagcgcgc ggatggtacg 960
 cgtthttatgc ccgattthga tgagcgccgc gaactggccc cgcgcgatat tgcgcgccgc 1020
 gccattgacc atgaaatgaa acgcctcggc gcagattgta tgttccttga tatcagccat 1080
 aagcccgcgc atthttattcg ccagcatttc ccgatgattt atgaaaagct gctcgggctg 1140
 gggattgatc tcacacaaga accggtaccg attgtgcctg ctgcacatta tacctgcggt 1200
 ggtgtaaticg ttgatgatca tgggcgtacg gacgtcgagg gcttgtatgc cattggcgag 1260
 gtgagttata ccggcttaca cggcgctaac cgcattggcct cgaattcatt gctggagtgt 1320
 ctggtctatg gctggtcggc ggccgaagat atcaccagac gtatgcctta tgcccacgac 1380
 atcagtacgt taccgccgtg ggatgaaagc cgcgctgaga accctgacga acgggtagta 1440
 attcagcata actggcacga gctacgtctg thtatgtggg attacgttg cattgtgcgc 1500
 acaacgaagc gcctggaacg cgcctcgcgg ccgataacca tgctccaaca agaaatagac 1560
 gaatattacg cccatttccg cgtctcaaat aatttgctgg agctcgctaa tctggtacag 1620
 gttgccgagt tgattgttcg ctgtgcaatg atgcgtaaag agagtcgggg gttgcatttc 1680
 acgctggatt atccggaact gctcaccat tccggtccgt cgatcctth ccccgcaat 1740
 cattacataa acagaatcct ggcagaagca gccgcgaagg aagcagccgc gaaggaagca 1800
 gccgcgaagg cagcagccct gcagatgagc gtaatgtht atccagacac ggcgattth 1860
 cctthcccc cgaagccgac gccgttaagc attgatgaaa aagcgtatta ccgcgagaag 1920
 ataaaacgtc tgctaaaaga acgtaatgcg gtgatggtht cccactacta taccgatccc 1980
 gaaattcaac aactggcaga agaaaccggg ggctgtatth ctgattctct ggaaatggcg 2040
 cgcttcgggtg caaagcatcc cgcttctact thgttagtcg ctggggtgag atthtatggga 2100
 gaaaccgcca aaattctcag tccggaaaaa acaattctga tgccgacact tcaggtgaa 2160

ES 2 656 892 T3

tgttcaactgg atctcggctg ccctgttgaa gaatttaacg ctttttgcga tgcccatccc 2220
 gatcgtactg tcgtcgtcta cgccaacact tctgctgcgg taaaagcgcg cgcagattgg 2280
 gtggtaaactt caagcattgc cgtcgaactt attgatcatc ttgatagttt gggtgaaaaa 2340
 atcatctggg cacccgacaa acatctgggg cgttacgtgc aaaaacagac gggtgagac 2400
 attctatgct ggcagggcgc ctgtattgtg catgatgaat ttaagactca ggcgttaacc 2460
 cgcttgcaag aagaataccc ggatgctgcc atactggcgc atccagaatc accacaagct 2520
 attgtcgata tggcggatgc ggtcggttcc accagtcaac tgatcgcctg tcgaaaaaca 2580
 ttgccacatc agaggcttat tgtggcaacc gatcggggta ttttctacaa aatgcagcag 2640
 gcggtgccag ataaagagtt actggaagca ccaaccgcag gtgagggcgc aacctgccgc 2700
 agctgcgcgc attgtccgtg gatggccatg aatggcctc aggccatcgc agaggcatta 2760
 gaacaggaag gaagcaatca cgaggttcat gttgatgaaa ggctgcgaga gagggcgcctg 2820
 gtgccgctca atcgtatgct ggattttgcg gctacactac gtggataacc cgggggatcc 2880
 actagttcta gagcggccgc ttaattaatt aatctagagg catcaaataa aacgaaaggc 2940
 tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat ctgttgtttg tcggtgaacg ctctcctgag 3000
 taggacaaat ccgccgccct agacctaggg gatataatcc gcttcctcgc tactgactc 3060
 gctacgctcg gtcgttcgac tgcggcgagc ggaaatggct tacgaacggg gcggagattt 3120
 cctggaagat gccaggaaga tacttaacag ggaagtgaga gggccgcggc aaagccgttt 3180
 ttccataggc tccgcccccc tgacaagcat cacgaaatct gacgctcaaa tcagtgtggtg 3240
 cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttccc ctggcggctc cctcgtgcgc 3300
 tctcctgttc ctgcctttcg gtttaccggt gtcattccgc tgttatggcc gcgtttgtct 3360
 cattccacgc ctgacactca gttccgggta ggcagttcgc tccaagctgg actgtatgca 3420
 cgaaccccc gttcagtcgc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtcaa 3480
 cccggaaaga catgcaaaag caccactggc agcagccact ggtaattgat ttagaggagt 3540
 tagtcttgaa gtcatgcgcc ggttaaggct aaactgaaag gacaagtttt ggtgactgcg 3600
 ctctccaag ccagttacct cggttcaaag agttggtagc tcagagaacc ttcgaaaaac 3660
 cgccctgcaa ggcgggtttt tcgttttcag agcaagagat tacgocgaga caaaacgat 3720
 ctcaagaaga tcatcttatt aatcagataa aatattacta gatttcagtg caatttatct 3780
 cttcaaatgt agcacctgaa gtcagcccca tacgatataa gttgttacta gtgcttggat 3840
 tctaccaat aaaaaacgcc cggcggcaac cgagcgttct gaacaaatcc agatggagtt 3900
 ctgaggatcat tactggatct atcaacagga gtccaagcga gctctogaac cccagagtcc 3960
 cgctcagaag aactcgtcaa gaaggcgata gaaggcgatg cgctcgaat cgggagcggc 4020

ES 2 656 892 T3

gataccgtaa agcacgagga agcggtcagc ccattcgcgc ccaagctctt cagcaatata 4080
 acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtcgccaca cccagccggc cacagtogat 4140
 gaatccagaa aagcggccat tttccacat gatattcggc aagcaggcat cgccatgggt 4200
 cacgacgaga tcctcgcctt cgggcatgcg cgccttgagc ctggcgaaca gttcggctgg 4260
 cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg acaagaccgg cttccatccg 4320
 agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggctg aatgggcagg tagccggatc 4380
 aagcgtatgc agccgcgca ttgcatcagc catgatggat actttctcgg caggagcaag 4440
 gtgagatgac aggagatcct gccccggcac ttcgcccaat agcagccagt cccttcccgc 4500
 ttcagtgaca acgtcagca cagctgcgca aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag 4560
 ccgctgctgc tcgtcctgca gttcattcag ggcaccggac aggtcggctt tgacaaaaag 4620
 aaccggggcg ccctcgcctg acagccggaa cacggcggca tcagagcagc cgattgtctg 4680
 ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc cacccaagcg gccggagaac ctgctgcaa 4740
 tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc tcatcctgtc tcttgatcag atcttgatcc 4800
 cctgcgcat cagatccttg gcggcaagaa agccatccag tttactttgc agggcttccc 4860
 aaccttacca gagggcgccc cagctggcaa ttcgacgctc tgtgtggaat tctcggacac 4920
 cgaggagaat gtcaagaggc gaacacacaa cgtcttgag cgccagagga ggaacgagct 4980
 aaaacggagc tttttgccc tgctgacca gatcccgag ttggaaaaca atgaaaaggc 5040
 cccaaggta gttatcctta aaaaagccac agcatacatc ctgtccgtcc aagcagagga 5100
 gcaaaagctc atttctgaag aggacttggt gcgaaaacga cgagaacagt tgaaacacaa 5160
 acttgaacag ctacggaact cttgtgcgta aggaaaagta aggaaaacga ttccttctaa 5220
 cagaaatgct ctgagcaatc acctatgaac tgtcga 5256

<210> 37
 <211> 5271
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Vector plásmido (pNBHL4A)

10

<400> 37

ctcagacata gcatttttat ccataagatt agcggatcta acctttacaa ttgtgagcgc 60
 tcacaattat gatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag 120
 aggagaaagg tacatatgaa tactctccct gaacattcat gtgacgtggt gattatcggc 180
 agcggcgag ccggactttc actggcgcta cgcctggctg accagcatca ggtcatcggt 240
 ctaagtaaag gcccggaac ggaaggttca acattttatg cccagggcgg tattgcccgc 300

ES 2 656 892 T3

gtgtttgatg aaactgacag cattgactcg catgtggaag acacattgat tgccggggct 360
 ggtatattgcg atcgccatgc agttgaattt gtcgccagca atgcacgatc ctgtgtgcaa 420
 tggctaatacg accagggggt gttgtttgat acccacattc aaccgaatgg cgaagaaagt 480
 taccatctga cccgtgaagg tggacatagt caccgtcgta ttcttcatgc cgccgacgcc 540
 accggtagag aagtagaaac cacgctggtg agcaaggcgc tgaaccatcc gaatattcgc 600
 gtgctggagc gcagcaacgc ggttgatctg attgtttctg acaaaattgg cctgcccggc 660
 acgcgacggg ttgttgccgc gtgggtatgg aaccgtaata aagaaacggg ggaaacctgc 720
 cacgcaaaag cggtggtgct ggcaaccggc ggtgcgctga aggtttatca gtacaccacc 780
 aatccggata tttcttctgg cgatggcatt gctatggcgt ggcgcgcagg ctgccggggt 840
 gccaatctcg aatttaataca gttccaccct accgcgctat atcaccaca gccacgcaat 900
 ttctgttaa cagaagcact gcgcggcgaa ggcgcttata tcaagcgccc ggatggtacg 960
 cgttttatgc ccgattttga tgagcggcgc gaactggccc cgcgcgatat tgtcgcgccg 1020
 gccattgacc atgaaatgaa acgcctcggc gcagattgta tgttccttga tatcagccat 1080
 aagcccggc attttattcg ccagcatttc ccgatgattt atgaaaagct gctcgggctg 1140
 gggattgatc tcacacaaga accggtaccg attgtgcctg ctgcacatta tacctgcggt 1200
 ggtgtaatgg ttgatgatca tgggcgtacg gacgtcgagg gcttgtatgc cattggcgag 1260
 gtgagttata ccggcttaca cggcgctaac cgcattggcct cgaattcatt gctggagtgt 1320
 ctggtctatg gctggtcggc ggcggaagat atcaccagac gtatgcctta tgcccacgac 1380
 atcagtacgt taccgocgtg ggatgaaagc cgcgttgaga accctgacga acgggtagta 1440
 attcagcata actggcacga gctacgtctg tttatgtggg attacgttg cattgtgcgc 1500
 acaacgaagc gcctggaacg cgcctcggc cggataacca tgctccaaca agaaatagac 1560
 gaatattacg cccatttccg cgtctcaaat aatttgctgg agctgcgtaa tctggtacag 1620
 gttgccgagt tgattgttcg ctgtgcaatg atgcgtaaag agagtcgggg gttgcatttc 1680
 acgctggatt atccggaact gctcaccat tccggtccgt cgatcctttc ccccggcaat 1740
 cattaataa acagaatcct ggcagaagca gccgcgaagg aagcagccgc gaaggaagca 1800
 gccgcgaagg aagcagccgc gaaggcagca gccctgcaga tgagcgtaat gtttgatcca 1860
 gacacggcga tttatccttt cccccgaag ccgacgccgt taagcattga tgaaaaagcg 1920
 tattaccgcg agaagataaa acgtctgcta aaagaacgta atgcgggtgat ggttgccac 1980
 tactataccg atcccgaat tcaacaactg gcagaagaaa ccggtggctg tatttctgat 2040
 tctctgaaa tggcgcgctt cggtgcaaaag catcccgtt ctactttgtt agtcgctggg 2100
 gtgagattta tgggagaaac cgccaaaatt ctcagtccgg aaaaaacaat tctgatgccg 2160
 acacttcagg ctgaatgttc actggatctc ggctgcctg ttgaagaatt taacgcattt 2220

ES 2 656 892 T3

tgcgatgcc atcccgatcg tactgtcgtc gtctacgcc aacttctgc tgcggtaaaa 2280
 gcgcgcgag attgggtggt aacttcaagc attgccgtcg aacttattga tcatcttgat 2340
 agtttgggtg aaaaaatcat ctgggcaccc gacaaacatc tggggcgta cgtgcaaaaa 2400
 cagacgggtg gagacattct atgctggcag ggtgcctgta ttgtgcatga tgaatttaag 2460
 actcaggcgt taaccgcgtt gcaagaagaa taccoggatg ctgccatact ggtgcatcca 2520
 gaatcaccac aagctattgt cgatatggcg gatgcggtcg gttccaccag tcaactgatc 2580
 gctgctgca aaacattgcc acatcagagg cttattgtgg caaccgatcg gggatatttc 2640
 tacaaaatgc agcaggcggg gccagataaa gagttactgg aagcaccaac cgcagggtgag 2700
 ggtgcaacct gccgcagctg cgcgcattgt ccgtggatgg ccatgaatgg ccttcaggcc 2760
 atcgcagagg cattagaaca ggaaggaagc aatcacgagg ttcattgtga tgaaggctg 2820
 cgagagaggg cgctggtgcc gctcaatcgt atgctggatt ttgctgctac actacgtgga 2880
 taaccgggg gatccactag ttctagagcg gccgcttaat taattaatct agaggcatca 2940
 aataaacga aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gtttgcggg 3000
 gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc gccctagacc taggggatat attccgcttc 3060
 ctgcctcact gactcgctac gctcggctgt tcgactgctg cgagcggaaa tggcttacga 3120
 acggggcgga gatttcctgg aagatgccag gaagatactt aacagggaa tgagagggcc 3180
 gcggcaaagc cgtttttcca taggctccgc cccctgaca agcatcacga aatctgacgc 3240
 tcaaatcagt ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctggc 3300
 ggctccctcg tgcgctctcc tgttcctgcc tttcggttta ccggtgtcat tccgctgta 3360
 tggccgcgtt tgtctcatc cacgcctgac actcagttcc gggtaggcag ttcgctcaa 3420
 gctggactgt atgcacgaac cccccgttca gtccgaccgc tgcgccttat ccggttaacta 3480
 tcgtcttgag tccaaccgg aaagacatgc aaaagcacca ctggcagcag cactggtaa 3540
 ttgatttaga ggagttagtc ttgaagtcac gcgcgggta aggctaaact gaaaggacia 3600
 gttttggtga ctgcgctcct ccaagccagt tacctcgggt caaagagttg gtagctcaga 3660
 gaaccttca aaaaccgccc tgcaaggcgg ttttttcggt ttcagagcaa gagattacgc 3720
 gcagaccaa acgatctcaa gaagatcatc ttattaatca gataaaatat tactagattt 3780
 cagtgcaatt tatctcttca aatgtagcac ctgaagtcag ccccatcga tataagttgt 3840
 tactagtgtc tggattctca ccaataaaaa acgcccggcg gcaaccgagc gttctgaaca 3900
 aatccagatg gattctgag gtcattactg gatctatcaa caggagtcca agcagctct 3960
 cgaaccccag agtcccgtc agaagaactc gtcaagaagg cgatagaagg cgatgcgctg 4020
 cgaatcggga gcggcgatac cgtaaagcac gaggaagcgg tcagcccatt cgcgcgaag 4080

ES 2 656 892 T3

ctcttcagca atatcacggg tagccaacgc tatgtcctga tagcgggtccg ccacacccag 4140
 ccggccacag tccgatgaatc cagaaaagcg gccattttcc accatgatata tccggaagca 4200
 ggcatcgcca tgggtcacga cgagatcctc gccgtcgggc atgcgcgcct tgagcctggc 4260
 gaacagttcg gctggcgcga gcccctgatg ctcttcgtcc agatcatcct gatcgacaag 4320
 accggcttcc atccgagtac gtgctcgtc gatgcatgt ttcgcttggg ggtcgaatgg 4380
 gcaggtagcc ggatcaagcg tatgcagccg ccgcattgca tcagccatga tggatacttt 4440
 ctccggcagga gcaaggtgag atgacaggag atcctgcccc ggcacttccg ccaatagcag 4500
 ccagtccctt cccgcttcag tgacaacgtc gagcacagct gcgcaaggaa cggccgtcgt 4560
 ggccagccac gatagcccg ctgcctcgtc ctgcagttca ttcagggcac cggacaggtc 4620
 ggtcttgaca aaaagaaccg ggcgcccctg cgctgacagc cggaaacacgg cggcatcaga 4680
 gcagccgatt gtctgtgtg cccagtcata gccgaatagc ctctccacc aagcggccgg 4740
 agaacctgcg tgcaatccat cttgttcaat catgcgaaac gatcctcatc ctgtctcttg 4800
 atcagatctt gatcccctgc gccatcagat ccttggcggc aagaaagcca tccagtttac 4860
 tttgcagggc ttcccacact taccagaggg cggcccagct ggcaattccg acgtctgtgt 4920
 ggaattctcg gacaccgag agaatgtcaa gaggcgaaca cacaacgtct tggagcgcca 4980
 gaggaggaac gagctaaaac ggagcttttt tgcctcgtc gaccagatcc cggagttgga 5040
 aaacaatgaa aaggccccca aggtagttat ccttaaaaaa gccacagcat acatcctgtc 5100
 cgtccaagca gaggagcaaa agctcatttc tgaagaggac ttgttgcgga aacgacgaga 5160
 acagttgaaa cacaacttg aacagctacg gaactcttgt gcgtaaggaa aagtaaggaa 5220
 aacgattcct tctaacagaa atgtcctgag caatcaccta tgaactgtcg a 5271

<210> 38
 <211> 5286
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Vector plásmido (pNBHL5A)

<400> 38

ctcgagcata gcatttttat ccataagatt agcggatcta acctttaca ttgtgagcgc 60
 tcacaattat gatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag 120
 aggagaaagg tacatatgaa tactctccct gaacattcat gtgacgtggt gattatcggc 180
 agcggcgcag ccggactttc actggcgcta cgcctggctg accagcatca ggtcatcggt 240
 ctaagtaaag gcccgtaac ggaaggttca acattttatg cccagggcgg tattgccgcc 300
 gtgtttgatg aaactgacag cattgactcg catgtggaag acacattgat tgccggggct 360

ES 2 656 892 T3

ggtatttgcg atcgccatgc agttgaatth gtcgccagca atgcacgatc ctgtgtgcaa 420
 tggctaatacg accagggggt gttgthttgat acccacattc aaccgaatgg cgaagaaagt 480
 taccatctga cccgtgaagg tggacatagt caccgtcgtat ttcttcatgc cgccgacgcc 540
 accggtagag aagtagaaac cacgctgggtg agcaaggcgc tgaacctacc gaatattcgc 600
 gtgctggagc gcagcaacgc gttgatctg attgthttctg acaaaattgg cctgccgggc 660
 acgcgacggg ttgttgccgc gtgggtatgg aaccgtaata aagaaacggt ggaaacctgc 720
 cacgcaaaag cggtggtgct ggcaaccggc ggtgcgtcga aggtttatca gtacaccacc 780
 aatccggata thtcttctgg cgatggcatt gctatggcgt ggcgcgcagg ctgccggggt 840
 gccaatctcg aatttaataca gttccacctt accgcgtat atcacccaca ggcaacgcaat 900
 thctctgtaa cagaagcact gcgcggcgaa ggcgcttata tcaagcgcct ggatggtacg 960
 cgtthttatgc ccgattthga tgagcgcggc gaactggccc cgcgcgatat tgcgccccgc 1020
 gccattgacc atgaaatgaa acgcctcggc gcagattgta tgttccttga tatcagccat 1080
 aagcccgcgc atthttattcg ccagcatttc ccgatgattt atgaaaagct gctcgggctg 1140
 gggattgatc tcacacaaga accggtaccg attgtgcctg ctgcacatta tacctgcgggt 1200
 ggtgtaatgg ttgatgatca tgggcgtacg gacgtcgagg gcttgtatgc cattggcgag 1260
 gtgagttata ccggcttaca cggcgctaac cgcatggcct cgaattcatt gctggagtgt 1320
 ctggtctatg gctggtcggc ggcggaagat atcacagac gtatgcctta tgcccacgac 1380
 atcagtagct taccgccgtg ggatgaaagc cgcgttgaga accctgacga acgggtagta 1440
 attcagcata actggcacga gctacgtctg thtatgtggg attacgttgg cattgtgcgc 1500
 acaacgaagc gcctggaacg cgcctcgcgg cggataacca tgctccaaca agaaatagac 1560
 gaatattacg ccattthccg cgtctcaaat aatttgcctg agctgcgtaa tctggtacag 1620
 gttgccgagt tgattgttcg ctgtgcaatg atgcgtaaag agagtcgggg gttgcatttc 1680
 acgctggatt atccggaact gtcacccat tccggtccgt cgatcctthc ccccggcaat 1740
 cattacataa acagaatcct ggcagaagca gccgcgaagg aagcagccgc gaaggaagca 1800
 gccgcgaagg aagcagccgc gaaggaagca gccgcgaagg cagcagccct gcagatgagc 1860
 gtaatgthtg atccagacac ggcgatttht cctthcccc cgaagccgac gccgthtaagc 1920
 attgatgaaa aagcgtatta ccgcgagaag ataaaacgtc tgctaaaaga acgthaatgcg 1980
 gtgatgthtg ccactacta taccgatccc gaaattcaac aactggcaga agaaaccggt 2040
 ggctgthttt ctgattctct ggaaatggcg cgcttcggtg caaagcatcc cgcttctact 2100
 thgttagtgc ctgggggtgag atthtatggga gaaaccgcca aaattctcag tccggaaaaa 2160
 acaattctga tgccgacact tcaggctgaa tgttcactgg atctcggctg ccctgthgaa 2220
 gaattthaac cattthtcga tgcccatccc gatcgtactg tgcgtctata cgccaacact 2280

ES 2 656 892 T3

tctgctgctg taaaagcgcg cgcagattgg gtggttaact caagcattgc cgtcgaactt 2340
attgatcatc ttgatagttt gggtgaaaaa atcatctggg cacccgacaa acatctgggg 2400
cgttacgtgc aaaaacagac ggggtggagac attctatgct ggcaggggtgc ctgtattgtg 2460
catgatgaat ttaagactca ggcgttaacc cgcttgcaag aagaataccc ggatgctgcc 2520
atactgggtgc atccagaatc accacaagct attgtcgata tggcgggatgc ggtcggttcc 2580
accagtcaac tgatcgctgc tgcgaaaaca ttgccacatc agaggcttat tgtggcaacc 2640
gatcggggta ttttctacaa aatgcagcag gcggtgccag ataaagagtt actggaagca 2700
ccaaccgcag gtgaggggtgc aacctgccgc agctgcgcgc attgtccgtg gatggccatg 2760
aatggccttc aggccatcgc agaggcatta gaacaggaag gaagcaatca cgaggttcat 2820
gttgatgaaa ggctgcgaga gagggcgctg gtgccgctca atcgtatgct ggattttgcg 2880
gctacactac gtggataacc cgggggatcc actagttcta gagcgggccgc ttaattaatt 2940
aatctagagg catcaaataa aacgaaaggc tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat 3000
ctgttgtttg tcggtgaacg ctctcctgag taggacaaat ccgccgccct agacctaggg 3060
gatatatcc gcttcctcgc tcaactgactc gctacgctcg gtcgttcgac tgcggcgagc 3120
ggaaatggct tacgaacggg gcggagattt cctggaagat gccaggaaga tacttaacag 3180
ggaagtgaga gggccgcggc aaagccgttt ttccataggc tccgcccccc tgacaagcat 3240
cacgaaatct gacgctcaa tcaagtgggg cgaaaccgga caggactata aagataccag 3300
gcgtttcccc ctggcggctc cctcgtgcgc tctcctgttc ctgcctttcg gtttaccggt 3360
gtcattccgc tgttatggcc gcgtttgtct cattccacgc ctgacactca gttccgggta 3420
ggcagttcgc tccaagctgg actgtatgca cgaaccccc gttcagtcg accgctgcgc 3480
cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggaaaga catgcaaaag caccactggc 3540
agcagccact ggtaattgat ttagaggagt tagtcttgaa gtcgatgcgc ggtaaggct 3600
aaactgaaag gacaagtttt ggtgactgcg ctctccaag ccagttacct cggttcaaag 3660
agttggtagc tcagagaacc ttcgaaaaac cgccctgcaa ggcgggtttt tcgttttcag 3720
agcaagagat tacgcgcaga caaaaacgat ctcaagaaga tcatcttatt aatcagataa 3780
aatattacta gatttcagtg caatttatct cttcaaatgt agcacctgaa gtcagcccca 3840
tacgatataa gttgttacta gtgcttggat tctcaccaat aaaaaacgcc cggcggcaac 3900
cgagcgttct gaacaaatcc agatggagtt ctgaggtcat tactggatct atcaacagga 3960
gtccaagcga gctctcgaac cccagagtcc cgctcagaag aactcgtcaa gaaggcgata 4020
gaaggcgatg cgctcgaat cgggagcggc gataccgtaa agcacgagga agcggtcagc 4080
ccattcgcgg ccaagctctt cagcaatatc acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg 4140

ES 2 656 892 T3

gtccgccaca cccagccggc cacagtcgat gaatccagaa aagcggccat tttccaccat 4200
gatattcggc aagcagggat cgccatgggt cacgacgaga tcctcgccgt cgggcatgcg 4260
cgccttgagc ctggcgaaca gttcggctgg cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc 4320
atcctgatcg acaagaccgg cttccatccg agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc 4380
ttggtggtcg aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc agccgccgca ttgcatcagc 4440
catgatggat actttctcgg caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gccccggcac 4500
ttcgcccaat agcagccagt cccttcccgc ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca 4560
aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag ccgcgctgcc tcgtcctgca gttcattcag 4620
ggcaccggac aggtcggctc tgacaaaaag aaccggggcg ccctgcgctg acagccggaa 4680
cacggcggca tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc 4740
cacccaagcg gccggagaac ctgctgcaa tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc 4800
tcatcctgtc tcttgatcag atcttgatcc cctgcgccat cagatccttg gcggcaagaa 4860
agccatccag tttactttgc agggcttccc aaccttacca gagggcgccc cagctggcaa 4920
ttccgacgtc tgtgtggaat tctcggacac cgaggagaat gtcaagaggc gaacacacaa 4980
cgtcttgag cgccagagga ggaacgagct aaaacggagc ttttttgccc tgctgacca 5040
gatcccggag ttggaaaaca atgaaaaggc cccaaggta gttatcctta aaaaagccac 5100
agcatacatc ctgtccgtcc aagcagagga gcaaaagctc atttctgaag aggacttgtt 5160
gcggaacga cgagaacagt tgaaacacaa acttgaacag ctacggaact cttgtgcgta 5220
aggaaaagta aggaaaacga ttccttctaa cagaaatgtc ctgagcaatc acctatgaac 5280
tgtcga 5286

<210> 39
<211> 5244
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Vector plásmido (pNBFL3A)

10

<400> 39

ctcgagcata gcatttttat ccataagatt agcggatcta acctttacaa ttgtgagcgc 60
tcacaattat gatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag 120
aggagaaagg tacatatgaa tactctccct gaacattcat gtgacgtggt gattatcggg 180
agcggcgcag ccggactttc actggcgcta cgcctggctg accagcatca ggtcatcggt 240
ctaagtaaag gcccgtaac ggaaggttca acattttatg cccagggcgg tattgcogcc 300
gtgtttgatg aaactgacag cattgactcg catgtggaag acacattgat tgccggggct 360

ES 2 656 892 T3

ggtatattgcg atcgccatgc agttgaattt gtcgccagca atgcacgatc ctgtgtgcaa 420
 tggctaatacg accagggggt gttgtttgat acccaccattc aaccgaatgg cgaagaaagt 480
 taccatctga cccgtgaaggt tggacatagt caccgtcgta ttcttcatgc cgccgacgcc 540
 accggtagag aagtagaaac cacgctgggt agcaaggcgc tgaaccatcc gaatattcgc 600
 gtgctggagc gcagcaacgc ggttgatctg attgtttctg acaaaattgg cctgccgggc 660
 acgcgacggg ttggtggcgc gtgggtatgg aaccgtaata aagaaacggt ggaaacctgc 720
 cacgcaaaag cgggtggtgct ggcaaccggc ggtgcgtcga aggtttatca gtacaccacc 780
 aatccggata tttcttctgg cgatggcatt gctatggcgt ggcgcgcagg ctgccgggtt 840
 gccaatctcg aatttaatca gttccaccct accgcgctat atcaccacaca ggcacgcaat 900
 ttctgttaa cagaagcact gcgcggcgaa ggcgcttata tcaagcgccc ggatggtacg 960
 cgttttatgc ccgattttga tgagcgcggc gaactggccc cgcgcgatat tgtcgcggc 1020
 gccattgacc atgaaatgaa acgcctcggc gcagattgta tgttccttga tatcagccat 1080
 aagcccgcg attttattcg ccagcatttc ccgatgattt atgaaaagct gctcgggctg 1140
 gggattgatc tcacacaaga accggtaccg attgtgcctg ctgcacatta tacctgcggt 1200
 ggtgtaatgg ttgatgatca tgggcgtacg gacgtcgagg gcttgtatgc cattggcgag 1260
 gtgagttata ccggcttaca cggcgtaac cgcatggcct cgaattcatt gctggagtgt 1320
 ctggtctatg gctggtcggc ggcggaagat atcaccagac gtatgcctta tgcccacgac 1380
 atcagtacgt taccgccgtg ggatgaaagc cgcgttgaga accctgacga acgggtagta 1440
 attcagcata actggcacga gctacgtctg tttatgtggg attacgttgg cattgtgcgc 1500
 acaacgaagc gcctggaacg cgccctcggc cggataacca tgctccaaca agaaatagac 1560
 gaatattacg ccatttccg cgtctcaaat aatttgctgg agctgcgtaa tctggtacag 1620
 gttgccgagt tgattgttgc ctgtgcaatg atgcgtaaag agagtccggg gttgcatttc 1680
 acgctggatt atccggaact gctcaccat tccggtccgt cgatccttc ccccggaat 1740
 cattaataa acagaatcct ggggtggtgg agcgtggtg gtacgggtg tggtagcgca 1800
 gcagccctgc agatgagcgt aatgtttgat ccagacacgg cgatttatcc tttcccccg 1860
 aagccgacgc cgtaagcat tgatgaaaaa gcgtattacc gcgagaagat aaaacgtctg 1920
 ctaaaagaac gtaatgcggt gatggttgc cactactata ccgatcccga aattcaaca 1980
 ctggcagaag aaaccggtgg ctgtatttct gattctctgg aaatggcgcg ctccggtgca 2040
 aagcatcccg cttctacttt gttagtcgct ggggtgagat ttatgggaga aaccgcaaa 2100
 attctcagtc cggaaaaaac aattctgatg ccgacacttc aggtgaatg ttcactggat 2160
 ctcggtgcc ctggtgaaga atttaacgca ttttgcatg cccatcccga tcgtactgtc 2220
 tgcgtctacg ccaacacttc tgctcggta aaagcgcgcg cagattgggt ggtaacttca 2280

ES 2 656 892 T3

agcattgccg tcgaacttat tgatcatcct gatagtttgg gtgaaaaaat catctgggca 2340
 cccgacaaac atctggggcg ttacgtgcaa aacagacgg gtggagacat tctatgctgg 2400
 cagggtgcct gtattgtgca tgatgaattt aagactcagg cgtaaccgg cttgcaagaa 2460
 gaatacccg atgctgccat actggtgcat ccagaatcac cacaagctat tgtcgatatg 2520
 gcggatgcgg tcggttccac cagtcaactg atcgctgctg cgaaaacatt gccacatcag 2580
 aggcttattg tggcaaccga tcgggggtatt ttctacaaa tgcagcaggc ggtgccagat 2640
 aaagagttac tggaaacacc aaccgcagg gtgggtgcaa cctgccgcag ctgcgcgat 2700
 tgtccgtgga tggccatgaa tggccttcag gccatcgag aggcattaga acaggaagga 2760
 agcaatcacg aggttcatgt tgatgaaagg ctgcgagaga gggcgctggt gccgctcaat 2820
 cgtatgctgg attttgcggc tacactacgt ggataaccgg ggggatccac tagttctaga 2880
 gcggccgctt aattaattaa tctagaggca tcaaataaaa cgaaaggctc agtcgaaaga 2940
 ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct ctctgagta ggacaaatcc 3000
 gccgccttag acctagggga tatattccgc ttcctcgctc actgactcg c tacgctcgg 3060
 cgttcgactg cggcgagcgg aatggctta cgaacggggc ggagatttcc tggagatgc 3120
 caggaagata cttaacaggg aagtgagagg gccgcggcaa agccgttttt ccataggctc 3180
 cgccccctg acaagcatca cgaatctga cgctcaaatc agtgggtggcg aaaccgcaca 3240
 ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggcggctccc tcgtgcgctc tcctgttct 3300
 gcctttcggg ttaccgggtg cattccgctg ttatggccgc gtttgtctca ttccacgcct 3360
 gacactcagt tccgggtagg cagttcgctc caagctggac tgtatgcacg aacccccgt 3420
 tcagtccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggaaagaca 3480
 tgcaaaagca ccaactggcag cagccaactgg taattgattt agaggagtta gtcttgaagt 3540
 catgcgccgg ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg tgactgcgct cctccaagcc 3600
 agttacctcg gttcaaagag ttggtagctc agagaacctt cgaaaaaccg ccctgcaagg 3660
 cggttttttc gttttcagag caagagatta cgcgcagacc aaaacgatct caagaagatc 3720
 atcttattaa tcagataaaa tattactaga ttctagtgca atttatctct tcaaatgtag 3780
 cacctgaagt cagccccata cgatataagt tgttactagt gottggattc tcaccaataa 3840
 aaaacgcccg gcggcaaccg agcgttctga acaaatccag atggagttct gaggtcatta 3900
 ctggatctat caacaggagt ccaagcgagc tctcgaacct cagagtcccg ctcaagaagaa 3960
 ctcgtcaaga aggcgataga agcgatgcy ctgcgaatcg ggagcggcga taccgtaaag 4020
 cacgaggaag cggtcagccc attcgcccgc aagctcttca gcaatatcac gggtagccaa 4080
 cgctatgtcc tgatagcggg ccgccacacc cagccggcca cagtcgatga atccagaaaa 4140

ES 2 656 892 T3

gcggccattt tccacatga tattcggcaa gcaggcatcg ccatgggtca cgacgagatc 4200
ctcgccgtcg ggcattgcgcg ccttgagcct ggcgaacagt tgggctggcg cgagcccctg 4260
atgctcttcg tccagatcat cctgatcgac aagaccggct tccatccgag tacgtgctcg 4320
ctcgatgcga tgtttcgctt ggtggtcgaa tgggcaggta gccggatcaa gcgatgcag 4380
ccgccgcatt gcatcagcca tgatggatac tttctcggca ggagcaaggt gagatgacag 4440
gagatcctgc cccggcactt cgcccaatag cagccagtcc cttcccgtt cagtgacaac 4500
gtcgagcaca gctgcgcaag gaacgcccgt cgtggccagc cacgatagcc gcgctgcctc 4560
gtcctgcagt tcattcaggg caccggacag gtcggtcttg acaaaaagaa ccggggcgccc 4620
ctgcgctgac agccggaaca cggcggcatc agagcagccg attgtctgtt gtgccagtc 4680
atagccgaat agcctctcca cccaagcggc cggagaacct gcgtgcaatc catcttgttc 4740
aatcatgcga aacgatcctc atcctgtctc ttgatcagat cttgatcccc tgcgccatca 4800
gatccttggc ggcaagaaag ccatccagtt tactttgcag ggcttcccaa ccttaccaga 4860
gggcgcccca gctggcaatt ccgacgtctg tgtggaattc tcggacaccg aggagaaatgt 4920
caagaggcga acacacaacg tcttggagcg ccagaggagg aacgagctaa aacggagctt 4980
ttttgccctg cgtgaccaga tcccggagtt ggaaaacaat gaaaaggccc ccaaggtagt 5040
tatccttaa aaagccacag catacatcct gtccgtccaa gcagaggagc aaaagctcat 5100
ttctgaagag gacttgttgc ggaaacgacg agaacagttg aaacacaaac ttgaacagct 5160
acggaactct tgtgcgtaag gaaaagtaag gaaaacgatt ccttctaaca gaaatgtcct 5220
gagcaatcac ctatgaactg tcga 5244

<210> 40
<211> 5256
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Vector plásmido (pNBFL4A)

<400> 40

ctcgagcata gcatttttat ccataagatt agcggatcta acctttaca ttgtgagcgc 60
tcacaattat gatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag 120
aggagaaagg tacatatgaa tactctccct gaacattcat gtgacgtgtt gattatcggc 180
agcggcgag ccggactttc actggcgcta cgcctggctg accagcatca ggtcatcggt 240
ctaagtaaag gcccgtaac ggaaggttca acattttatg ccagggcggt tattgccgcc 300
gtgtttgatg aaactgacag cattgactcg catgtggaag acacattgat tgccggggct 360
ggtatattgag atcgccatgc agttgaattt gtcgccagca atgcacgatc ctgtgtgcaa 420

ES 2 656 892 T3

tggctaatcg accagggggt gttgtttgat acccacattc aaccgaatgg cgaagaaagt 480
taccatctga cccgtgaagg tggacatagt caccgtcgta ttcttcatgc cgccgacgcc 540
accggtagag aagtagaaac cacgctgggtg agcaaggcgc tgaacccatcc gaatattcgc 600
gtgctggagc gcagcaacgc ggttgatctg attgtttctg acaaaattgg cctgccgggc 660
acgcgacggg ttgttggcgc gtgggtatgg aaccgtaata aagaaacggg ggaaacctgc 720
cacgcaaaaag cggtggtgct ggcaaccggc ggtgcgctga aggtttatca gtacaccacc 780
aatccggata tttcttctgg cgatggcatt gctatggcgt ggcgcgagg ctgccgggtt 840
gccaatctcg aatttaatca gttccaccct accgcgctat atcaccacaca ggccacgcaat 900
ttcctgtaa cagaagcact gcgcggcgaa ggcgcttata tcaagcgccc ggatggtacg 960
cgttttatgc ccgattttga tgagcgcggc gaactggccc cgcgcgatat tgcgccccgc 1020
gccattgacc atgaaatgaa acgcctcggc gcagattgta tgttccttga tatcagccat 1080
aagcccgcgc attttattcg ccagcatttc ccgatgattt atgaaaagct gctcgggctg 1140
gggattgatc tcacacaaga accggtaccg attgtgcctg ctgcacatta tacctgcggt 1200
ggtgtaatgg ttgatgatca tgggogtacg gacgtcgagg gcttgtatgc cattggcgag 1260
gtgagttata ccggcttaca cggcgctaac cgcattggcct cgaattcatt gctggagtgt 1320
ctggtctatg gctggtcggc ggcggaagat atcaccagac gtatgcctta tgcccacgac 1380
atcagtacgt taccgccgtg ggatgaaagc cgcggtgaga accctgacga acgggtagta 1440
attcagcata actggcacga gctacgtctg tttatgtggg attacgttgg catttgtcgc 1500
acaacgaagc gcctggaacg cgcctcggc cggataacca tgctccaaca agaaatagac 1560
gaatattacg cccatttccg cgtctcaaat aatttgctgg agctgcgtaa tctggtacag 1620
gttgccgagt tgattgttcg ctgtgcaatg atgcgtaaag agagtgggg gttgcatttc 1680
acgctggatt atccggaact gctcaccat tccggtccgt cgatccttc ccccggcaat 1740
cattacataa acagaatcct gggtggtggt agcggtggtg gtagcgggtg tggtagcgg 1800
ggtggtagcg cagcagccct gcagatgagc gtaatgtttg atccagacac ggcgatttat 1860
cctttcccc cgaagccgac gccgttaagc attgatgaaa aagcgtatta ccgcgagaag 1920
ataaacgctc tgctaaaaga acgtaatgcg gtgatggttg cccactacta taccgatccc 1980
gaaattcaac aactggcaga agaaaccggg ggtgtatatt ctgattctct ggaaatggcg 2040
cgcttcggtg caaagcatcc cgcttctact ttgttagtcg ctggggtgag atttatggga 2100
gaaaccgcca aaattctcag tccggaaaaa acaattctga tgccgacact tcaggctgaa 2160
tgttcactgg atctcggctg ccctgttgaa gaatttaacg cattttgca tgcccatccc 2220
gatcgtactg tcgtcgtcta cgccaacact tctgctcggg taaaagcgcg cgagattgg 2280
gtggttaact caagcattgc cgtcgaactt attgatcatc ttgatagttt gggtgaaaa 2340

ES 2 656 892 T3

atcatctggg cacccgacaa acatctgggg cgttacgtgc aaaaacagac ggggtggagac 2400
 attctatgct ggcaggggtgc ctgtattgtg catgatgaat ttaagactca ggcgttaacc 2460
 cgcttgcaag aagaataccc ggatgctgcc atactgggtgc atccagaatc accacaagct 2520
 attgtcgata tggcggatgc ggtcggttcc accagtcaac tgatcgctgc tgcgaaaaca 2580
 ttgccacatc agaggcttat tgtggcaacc gatcggggta ttttctacaa aatgcagcag 2640
 gcggtgccag ataaagagtt actggaagca ccaaccgcag gtgaggggtgc aacctgccgc 2700
 agctgcgcgc attgtccgtg gatggccatg aatggccttc aggccatcgc agaggcatta 2760
 gaacaggaag gaagcaatca cgaggttcat gttgatgaaa ggctgcgaga gaggggcgtg 2820
 gtgccgctca atcgtatgct ggattttgcg gctacactac gtggataacc cgggggatcc 2880
 actagttcta gagcggccgc ttaattaatt aatctagagg catcaaataa aacgaaaggc 2940
 tcagtcgaaa gactgggctt ttcgttttat ctggtgtttg tcggtgaacg ctctcctgag 3000
 taggacaaat ccgccccct agacctaggg gatataatcc gcttcctcgc tactgactc 3060
 gctacgctcg gtcgttcgac tgcggcgagc ggaaatggct tacgaacggg gcggagattt 3120
 cctggaagat gccaggaaga tacttaacag ggaagtgaga gggccgcggc aaagccgttt 3180
 ttccataggc tccgcccccc tgacaagcat cacgaaatct gacgctcaaa tcagtggtgg 3240
 cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggcggctc cctcgtgcgc 3300
 tctcctgttc ctgcctttcg gttaccgggt gtcattccgc tggtatggcc gcgtttgtct 3360
 cattccacgc ctgacactca gttccgggta ggcagttcgc tccaagctgg actgtatgca 3420
 cgaaccccc gttcagtccg accgctgcgc cttatccgggt aactatcgtc ttgagtccaa 3480
 cccggaagaa catgcaaaag caccactggc agcagccact ggtaattgat ttagaggagt 3540
 tagtcttgaa gtcacgcgcc ggttaaggct aaactgaaag gacaagtttt ggtgactgcg 3600
 ctccctcaag ccagttacct cggttcaaag agttggtagc tcagagaacc ttcgaaaaac 3660
 cgccctgcaa ggcggttttt tcgttttcag agcaagagat tacgcgcaga ccaaacgat 3720
 ctcaagaaga tcactctatt aatcagataa aatattacta gatttcagtg caatttatct 3780
 cttcaaatgt agcacctgaa gtcagcccca tacgatataa gttgttacta gtgcttgat 3840
 tctaccaat aaaaaacgcc cggcggcaac cgagcgttct gaacaaatcc agatggagtt 3900
 ctgaggtcat tactggatct atcaacagga gtccaagcga gctctcgaac cccagagtcc 3960
 cgctcagaag aactcgtcaa gaaggcgata gaaggcgatg cgctgcgaat cgggagcggc 4020
 gataccgtaa agcacgagga agcggtcagc ccattcgcgc ccaagctctt cagcaatatc 4080
 acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca cccagccggc cacagtcgat 4140
 gaatccagaa aagcggccat tttccaccat gatattcggc aagcaggcat cgccatgggt 4200

ES 2 656 892 T3

cacgacgaga tcctcgccgt cgggcatgcg cgccttgagc ctggcgaaca gttcggctgg 4260
 cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg acaagaccgg cttccatccg 4320
 agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggtcg aatgggcagg tagccggatc 4380
 aagcgtatgc agccgccgca ttgcatcagc catgatggat actttctcgg caggagcaag 4440
 gtgagatgac aggagatcct gccccggcac ttcgccaat agcagccagt cccttcccgc 4500
 ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag 4560
 ccgcgctgcc tcgtcctgca gttcattcag ggcaccggac aggtcggctc tgacaaaaag 4620
 aaccggggcg ccctgcgctg acagccggaa cacggcggca tcagagcagc cgattgtctg 4680
 ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc caccgaagcg gccggagaac ctgctgcaa 4740
 tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc tcatcctgtc tcttgatcag atcttgatcc 4800
 cctgcgccat cagatccttg gcggcaagaa agccatccag tttactttgc agggcttccc 4860
 aaccttacca gagggcgccc cagctggcaa ttccgacgtc tgtgtggaat tctcggacac 4920
 cgaggagaat gtcaagaggc gaacacacaa cgtcttgag cgccagagga ggaacgagct 4980
 aaaacggagc ttttttgccc tgcgtgacca gatcccggag ttgaaaaca atgaaaaggc 5040
 cccaaggtg gttatcctta aaaaagccac agcatacatc ctgtccgtcc aagcagagga 5100
 gcaaaagctc atttctgaag aggacttggt gcggaacga cgagaacagt tgaacacaa 5160
 acttgaacag ctacggaaact cttgtgcgta aggaaaagta aggaaaacga ttccttctaa 5220
 cagaaatgtc ctgagcaatc acctatgaac tgtcga 5256

<210> 41
 <211> 9193
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Vector plásmido (pCPA)

10

<400> 41

cccgtcttac tgtcgggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt 60
 ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt 120
 aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg 180
 gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctt ctgtaggccg 240
 gataaggcgc tcgcgccgca tccggcactg ttgccaaact ccagtgccgc aataatgtcg 300
 gatgcgatac ttgcgcatct tatccgacct acacctttgg tgttacttgg ggcgattttt 360
 taacatttcc ataagttacg cttattttaa gcgtcgtgaa tttaatgacg taaattcctg 420
 ctatttattc gtttctgtaa gcgatttcgc agcatttgac gtcaccgctt ttacgtgget 480

ES 2 656 892 T3

ttataaaaga cgacgaaaag caaagcccga gcatattcgc gccaatgcga cgtgaaggat	540
acagggctat caaacgataa gatgggggtg ctggggtaat atgaacgaac aatattccgc	600
attgcgtagt aatgtcagta tgctcggcaa agtgctggga gaaacctca aggatgcgtt	660
gggagaacac attcttgaac gcgtagaaac tatccgtaag ttgtcgaaat cttcacgcgc	720
tggcaatgat gctaaccgcc aggagtgtct caccacctta caaaatttgt cgaacgacga	780
gctgctgccc gttgcgcgtg cgtttagtca gttcctgaac ctggccaaca ccgccgagca	840
ataccacagc atttcgccga aaggcgaagc tgccagcaac ccggaagtga tcgcccgcac	900
cctgcgtaaa ctgaaaaacc agccggaact gagcgaagac accatcaaaa aagcagtgga	960
atcgctgtcg ctggaactgg tcctcacggc tcaccaacc gaaattacc gtcgtacact	1020
gatccacaaa atggtggaag tgaacgcctg tttaaaacag ctcgataaca aagatatcgc	1080
tgactacgaa cacaaccagc tgatgcgtcg cctgcgccag ttgatcgccc agtcatggca	1140
taccgatgaa atccgtaagc tgcgtccaag cccggtagat gaagccaaat ggggctttgc	1200
cgtagtgga aacagcctgt ggcaaggcgt accaaattac ctgcgcgaac tgaacgaaca	1260
actggaagag aacctcggct acaaactgcc cgtcgaattt gttccgggcc gttttacttc	1320
gtggatgggc ggcgaccgog acggcaacc gaacgtcact gccgatatca cccgccacgt	1380
cctgctactc agccgctgga aagccaccga tttgttcctg aaagatattc aggtgctggt	1440
ttctgaactg tcgatggttg aagcgacccc tgaactgctg gcgctggttg gcgaagaagg	1500
tgccgcagaa ccgtatcgct atctgatgaa aaacctgctt tctgcctga tggcgacaca	1560
ggcatggctg gaagcgcgcc tgaaagcga agaactgcca aaaccagaag gcctgctgac	1620
acaaaacgaa gaactgtggg aaccgctcta cgcttgctac cagtcacttc aggcgtgtgg	1680
catgggtatt atcgccaacg gcgatctgct cgacaccctg cgccgcgtga aatgtttcgg	1740
cgtaccgctg gtcctgattg atatccgtca ggagagcacg cgtcataccg aagcgtggg	1800
cgagctgacc cgctacctog gtatcggcga ctacgaaagc tggtcagagg ccgacaaaca	1860
ggcgttcctg atccgcgaac tgaactccaa acgtccgctt ctgccgcgca actggcaacc	1920
aagcgccgaa acgcgcgaag tgctcgatac ctgccaggtg attgccgaag caccgcaagg	1980
ctccattgcc gcctacgtga tctcgatggc gaaaacgccg tccgacgtac tggctgtcca	2040
cctgctgctg aaagaagcgg gtatcgggtt tgcgatgccg gttgctccgc tgtttgaaac	2100
cctcgatgat ctgaacaacg ccaacgatgt catgaccag ctgctcaata ttgactggta	2160
tcgtggcctg attcagggca aacagatggt gatgattggc tattccgact cagcaaaaga	2220
tgcgggagtg atggcagctt cctgggcgca atatcaggca caggatgcat taatcaaac	2280
ctgcgaaaaa gcgggtattg agctgacgtt gttccacggt cgccggcgggt ccattggctg	2340
cgccggcgca cctgctcatg cggcgtgct gtcacaaccg ccaggaagcc tgaaaggcgg	2400

ES 2 656 892 T3

cctgcgcgta accgaacagc gcgagatgat ccgctttaa tatggctctgc cagaaatcac 2460
cgtcagcagc ctgtcgcttt ataccggggc gattctggaa gccaacctgc tgccaccgcc 2520
ggagccgaaa gagagctggc gtgcgattat ggatgaactg tcagtcattct cctgcgatgt 2580
ctaccgcggc tacgtacgtg aaaacaaaga ttttgtgcct tacttccgct ccgctacgcc 2640
ggaacaagaa ctgggcaaac tgccgttggg ttcacgtccg gcgaaacgtc gcccaaccgg 2700
cggcgtcgag tcaactacgc ccattccgtg gatcttcgcc tggacgcaaa accgtctgat 2760
gctccccgcc tggctgggtg caggtacggc gctgcaaaaa gtggctgaag acggcaaaaca 2820
gagcgagctg gaggctatgt gccgcgattg gccattcttc tcgacgcgtc tcggcatgct 2880
ggagatggtc ttgcgcaaaag cagacctgtg gctggcggaa tactatgacc aacgcctggt 2940
agacaaagca ctgtggccgt taggtaaaga gttacgcaac ctgcaagaag aagacatcaa 3000
agtgggtgctg gcgattgcca acgattccca tctgatggcc gatctgccgt ggattgcaga 3060
gtctattcag ctacggaata ttacaccga cccgctgaac gtattgcagg ccgagttgct 3120
gcaccgctcc cgccaggcag aaaaagaagg ccaggaaccg gaccctcgcg tcgaacaagc 3180
gttaatggtc actattgccg ggattgcggc aggtatgcgt aataccggct aatcttcctc 3240
ttctgcaaac cctcgtgctt ttgcgcgagg gttttctgaa atacttctgt tetaacaccc 3300
tcgttttcaa tatatttctg tctgcatttt attcaaagga tccgtccacc tatgttgact 3360
acatcatcaa ccagatcgat tctgacaaca aactgggctg aggttcagac gacaccgttg 3420
ctgtgggtat cgtttaccag ttctaatagc acacctcttt gttaaatgcc gaaaaaacag 3480
gactttggtc ctgttttttt tataccttcc agagcaatct cacgtcttgc aaaaacagcc 3540
tgcgttttca tcagtaatag ttggaatttt gtaaattctc cgttaccctg atagcggact 3600
tcccttctgt aaccataatg gaacctcgtc atgtttgaga acattaccgc cgctcctgcc 3660
gaccogattc tgggcctggc cgatctgttt cgtgccgatg aacgtcccgg caaaattaac 3720
ctcgggattg gtgtctataa agatgagacg ggcaaaacc cggactgac cagcgtgaaa 3780
aaggctgaac agtatctgct cgaaaatgaa accaccaaaa attacctcgg cattgacggc 3840
atccctgaat ttggtcgctg cactcaggaa ctgctgtttg gtaaaggtag cgccctgatc 3900
aatgacaaac gtgctcgac gccacagact ccggggggca ctggcgcact acgcgtggct 3960
gccgatttcc tggcaaaaaa taccagcgtt aagcgtgtgt gggtaggcaa cccaagctgg 4020
ccgaaccata agagcgtctt taactctgca ggtctggaag ttcgtgaata cgcttattat 4080
gatgcggaaa atcacactct tgacttcgat gcactgatta acagcctgaa tgaagctcag 4140
gctggcgacg tagtgctgtt ccatggctgc tgccataacc caaccggtat cgaccctacg 4200
ctggaacaat ggcaaacact ggcacaactc tccgttgaga aaggctggtt accgctgttt 4260

ES 2 656 892 T3

gacttcgctt accagggttt tgcccgtggt ctggaagaag atgctgaag actgcgcgct 4320
ttcgcggcta tgcataaaga gctgattggt gccagttcct actctaaaaa ctttggcctg 4380
tacaacgagc gtgttggcgc ttgtactctg gttgctgccg acagtgaaac cgttgatcgc 4440
gcattcagcc aatgaaagc ggcgattcgc gctaactact ctaaccacc agcacacggc 4500
gcttctgttg ttgccaccat cctgagcaac gatgcgttac gtgcgatttg ggaacaagag 4560
ctgactgata tgcgccagcg tattcagcgt atgcgtcagt tgttcgtcaa tacgctgcag 4620
gaaaaaggcg caaacccgca cttcagcttt atcatcaaac agaacggcat gttctccttc 4680
agtggcctga caaaagaaca agtgctgctg ctgcgcgaag agtttggcgt atatgcggtt 4740
gcttctggtc gcgtaaatgt ggccgggatg acaccagata acatggctcc gctgtgcgaa 4800
gcgattgtgg cagtgtgta agcattaaaa acaatgaagc ccgctgaaaa gcgggctgag 4860
actgatgaca aacgcaacat tgcctgatgc gctacgctta tgagctcggc accgagctcg 4920
aattcactgg ccgctgcttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt 4980
aatcgccttg cagcacatcc ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc 5040
gatcgcctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgcctgat gcggtathtt 5100
ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcaactctag tacaatctgc 5160
tctgatgccg catagttaag ccagccccga caccgcgcaa caccgcgtga cgagcttagt 5220
aaagccctcg ctagatttta atgcggatgt tgcgattact tcgccaacta ttgcgataac 5280
aagaaaaagc cagcctttca tgatatatct cccaatttgt gtagggctta ttatgcacgc 5340
ttaaaaataa taaaagcaga cttgacctga tagtttggct gtgagcaatt atgtgcttag 5400
tgcattctaac gcttgagtta agccgcgccg cgaagcggcg tcggcttgaa cgaattgta 5460
gacattattt gccgactacc ttggtgatct cgcctttcac gtagtggaca aattcttcca 5520
actgatctgc gcgcgaggcc aagcgatctt cttcttgtcc aagataagcc tgtctagctt 5580
caagatgac gggctgatac tgggcccggca ggcgctccat tgcccagtcg gcagcgacat 5640
ccttcggcgc gattttgccg gttactgccc tgtaccaaact gcgggacaac gtaagcacta 5700
catttcgctc atcgcagcc cagtcgggcg gcgagttcca tagcgttaag gtttcattta 5760
gcgcctcaa tagatcctgt tcaggaaccg gatcaaagag ttccctccgc gctggaccta 5820
ccaaggcaac gctatgttct cttgcttttg tcagcaagat agccagatca atgtcgatcg 5880
tggctggctc gaagatacct gcaagaatgt cattgcgctg ccattctcca aattgcagtt 5940
cgcgcttagc tggataacgc cacggaatga tgcgctcgtg cacaacaatg gtgactteta 6000
cagcgcggag aatctcgcct tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg tcggtgatca 6060
aagctcgcgc cgttgtttca tcaagcctta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac 6120
tgtgtggctt caggccgcca tccactgccc agccgtacaa atgtacggcc agcaacgctc 6180

ES 2 656 892 T3

gttcgagatg gcgctcgatg acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga 6240
 tcacgccttc cctcatgatg ttttaactttg ttttagggcg actgccctgc tgcgtaacat 6300
 cgttgctgct ccataacatc aaacatcgac ccacggcgta acgcgcttgc tgcttgatg 6360
 cccgagggcat agactgtacc ccaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg 6420
 cgccgttacc accgctgcgt tcggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatacgct 6480
 acttgcatcag cagcttacga accgaacagg cttatgtcca ctgggttcgt gccttcatcc 6540
 gtttccacgg tgtgcgtcac ccggcaacct tgggcagcag cgaagtcgag gcatttctgt 6600
 cctggctggc gaacgagcgc aaggtttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggcct 6660
 tgctgttctt ctacggcaag gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcggaa 6720
 gacctcggcc gtcgcggcgc ttgccggtgg tgctgacccc ggatgaagtg gttcgcaccc 6780
 tcggttttct ggaaggcgag catcgtttgt tcgcccagct tctgtatgga acgggcatgc 6840
 ggatcagtga gggtttcaa ctgcgggtca aggatctgga tttcgcacac ggcacgatca 6900
 tcgtgcggga gggcaagggc tccaaggatc gggccttgat gttaccggag agcttggcac 6960
 ccagcctgcg cgagcagggg aattaattcc cacgggtttt gctgcccgca aacgggctgt 7020
 tctggtggtg ctagtgtgtt atcagaatcg cagatccggc ttcagccggt ttgccggctg 7080
 aaagcgctat ttcttccaga attgccatga ttttttcccc acgggaggcg tcaactggctc 7140
 ccgtggtgtc ggcagctttg attcgataag cagcatcgcc tgtttcaggc tgtctatgtg 7200
 tgactgttga gctgtaacaa gttgtctcag gtgttcaatt tcatgttcta gttgctttgt 7260
 tttactgggt tcacctgttc tattaggtgt tacatgctgt tcatctgtta cattgtcgat 7320
 ctgttcatgg tgaacagctt tgaatgcacc aaaaactcgt aaaagctctg atgtatctat 7380
 cttttttaca ccgttttcat ctgtgcatat ggacagtttt ccctttgata tgtaacgggtg 7440
 aacagttggt ctacttttgt ttgttagtct tgatgcttca ctgatagata caagagccat 7500
 aagaacctca gatccttccg tatttagcca gtatgttctc tagtgtgggt cgttgttttt 7560
 gcgtgagcca tgagaacgaa ccattgagat catacttact ttgcatgtca ctcaaaaatt 7620
 ttgcctcaaa actggtgagc tgaatttttg cagttaaagc atcgtgtagt gtttttctta 7680
 gtccggtatg taggtaggaa tctgatgtaa tggttggtgg tattttgtca ccattcattt 7740
 ttatctgggt gttctcaagt tcggttacga gatccatttg tctatctagt tcaacttgga 7800
 aatcaacgt atcagtcggg cggcctcgtc tatcaaccac caatttcata ttgctgtaag 7860
 tgtttaaatc tttacttatt ggtttcaaaa ccattgggtt aagcctttta aactcatggt 7920
 agttattttc aagcattaac atgaacttaa attcatcaag gctaactctc atatttgcct 7980
 tgtgagtttt cttttgtgtt agttctttta ataaccactc ataaatcctc atagagtatt 8040

ES 2 656 892 T3

tgttttcaaa agacttaaca tgttccagat tatattttat gaatTTTTTT aactggaaaa 8100
 gataaggcaa tatctcttca ctaaaaacta attctaattt ttcgcttgag aacttgcat 8160
 agtttgcca ctggaaaatc tcaaagcctt taaccaaagg attcctgatt tccacagttc 8220
 tcgtcatcag ctctctgggt gcttttagcta atacaccata agcattttcc ctactgatgt 8280
 tcatcatctg agcgtattgg ttataagtga acgataccgt ccgttctttc cttgtagggt 8340
 tttcaatcgt ggggttgagt agtgccacac agcataaaat tagcttggtt tcatgctccg 8400
 ttaagtcata gcgactaatc gctagttcat ttgctttgaa aacaactaat tcagacatac 8460
 atctcaattg gtctaggtga ttttaatcac tataccaatt gagatgggct agtcaatgat 8520
 aattactagt ccttttctt tgagttgtgg gtatctgtaa attctgctag acctttgctg 8580
 gaaaacttgt aaattctgct agaccctctg taaattccgc tagacctttg tgtgtttttt 8640
 ttgtttatat tcaagtgggt ataatttata gaataaagaa agaataaaaa aagataaaaa 8700
 gaatagatcc cagccctgtg tataactcac tacttttagtc agttccgcag tattacaaaa 8760
 ggatgctgca aacgctgttt gctcctctac aaaacagacc ttaaaaccct aaaggcttaa 8820
 gtagcaccct cgcaagctcg ggcaaatcgc tgaatattcc ttttgtctcc gaccatcagg 8880
 cacctgagtc gctgtctttt tcgtgacatt cagttcgctg cgctcacggc tctggcagtg 8940
 aatgggggta aatggcacta caggcgcctt ttatggattc atgcaaggaa actaccata 9000
 atacaagaaa agcccgtcac gggcttctca gggcgtttta tggcgggtct gctatgtggt 9060
 gctatctgac tttttgctgt tcagcagttc ctgccctctg attttccagt ctgaccactt 9120
 cggattatcc cgtgacaggt cattcagact ggctaatgca cccagtaagg cagcgggtatc 9180
 atcaacaggc tta 9193

<210> 42
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* W3110

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(540)
 <223> NadB - aspartato oxidasa

<400> 42

Met	Asn	Thr	Leu	Pro	Glu	His	Ser	Cys	Asp	Val	Leu	Ile	Ile	Gly	Ser
1				5					10					15	
Gly	Ala	Ala	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	Ala	Asp	Gln	His	Gln
			20					25					30		
Val	Ile	Val	Leu	Ser	Lys	Gly	Pro	Val	Thr	Glu	Gly	Ser	Thr	Phe	Tyr
		35					40					45			
Ala	Gln	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Thr	Asp	Ser	Ile	Asp

ES 2 656 892 T3

50						55										60
Ser	His	Val	Glu	Asp	Thr	Leu	Ile	Ala	Gly	Ala	Gly	Ile	Cys	Asp	Arg	
65					70					75					80	
His	Ala	Val	Glu	Phe	Val	Ala	Ser	Asn	Ala	Arg	Ser	Cys	Val	Gln	Trp	
				85					90					95		
Leu	Ile	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Phe	Asp	Thr	His	Ile	Gln	Pro	Asn	Gly	
			100					105				110				
Glu	Glu	Ser	Tyr	His	Leu	Thr	Arg	Glu	Gly	Gly	His	Ser	His	Arg	Arg	
		115					120					125				
Ile	Leu	His	Ala	Ala	Asp	Ala	Thr	Gly	Arg	Glu	Val	Glu	Thr	Thr	Leu	
	130					135						140				
Val	Ser	Lys	Ala	Leu	Asn	His	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Ser	
145					150					155					160	
Asn	Ala	Val	Asp	Leu	Ile	Val	Ser	Asp	Lys	Ile	Gly	Leu	Pro	Gly	Thr	
				165					170					175		
Arg	Arg	Val	Val	Gly	Ala	Trp	Val	Trp	Asn	Arg	Asn	Lys	Glu	Thr	Val	
			180					185					190			
Glu	Thr	Cys	His	Ala	Lys	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Ser	
		195					200					205				
Lys	Val	Tyr	Gln	Tyr	Thr	Thr	Asn	Pro	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Asp	Gly	
	210					215					220					
Ile	Ala	Met	Ala	Trp	Arg	Ala	Gly	Cys	Arg	Val	Ala	Asn	Leu	Glu	Phe	
225					230					235					240	
Asn	Gln	Phe	His	Pro	Thr	Ala	Leu	Tyr	His	Pro	Gln	Ala	Arg	Asn	Phe	
				245					250					255		
Leu	Leu	Thr	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Leu	Lys	Arg	Pro	
			260					265					270			
Asp	Gly	Thr	Arg	Phe	Met	Pro	Asp	Phe	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Ala	
		275					280					285				
Pro	Arg	Asp	Ile	Val	Ala	Arg	Ala	Ile	Asp	His	Glu	Met	Lys	Arg	Leu	
	290					295					300					
Gly	Ala	Asp	Cys	Met	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser	His	Lys	Pro	Ala	Asp	Phe	
305					310					315					320	
Ile	Arg	Gln	His	Phe	Pro	Met	Ile	Tyr	Glu	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	
				325					330					335		
Ile	Asp	Leu	Thr	Gln	Glu	Pro	Val	Pro	Ile	Val	Pro	Ala	Ala	His	Tyr	
			340					345					350			
Thr	Cys	Gly	Gly	Val	Met	Val	Asp	Asp	His	Gly	Arg	Thr	Asp	Val	Glu	
		355					360					365				
Gly	Leu	Tyr	Ala	Ile	Gly	Glu	Val	Ser	Tyr	Thr	Gly	Leu	His	Gly	Ala	
	370					375					380					
Asn	Arg	Met	Ala	Ser	Asn	Ser	Leu	Leu	Glu	Cys	Leu	Val	Tyr	Gly	Trp	

ES 2 656 892 T3

```

385                390                395                400
Ser Ala Ala Glu Asp Ile Thr Arg Arg Met Pro Tyr Ala His Asp Ile
                405                410                415
Ser Thr Leu Pro Pro Trp Asp Glu Ser Arg Val Glu Asn Pro Asp Glu
                420                425                430
Arg Val Val Ile Gln His Asn Trp His Glu Leu Arg Leu Phe Met Trp
                435                440                445
Asp Tyr Val Gly Ile Val Arg Thr Thr Lys Arg Leu Glu Arg Ala Leu
                450                455                460
Arg Arg Ile Thr Met Leu Gln Gln Glu Ile Asp Glu Tyr Tyr Ala His
                465                470                475
Phe Arg Val Ser Asn Asn Leu Leu Glu Leu Arg Asn Leu Val Gln Val
                485                490                495
Ala Glu Leu Ile Val Arg Cys Ala Met Met Arg Lys Glu Ser Arg Gly
                500                505                510
Leu His Phe Thr Leu Asp Tyr Pro Glu Leu Leu Thr His Ser Gly Pro
                515                520                525
Ser Ile Leu Ser Pro Gly Asn His Tyr Ile Asn Arg
                530                535                540

```

5 <210> 43
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* W3110

10 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(347)
 <223> NadA - quinolinato sythasa

<400> 43

```

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

```

15

ES 2 656 892 T3

Cys Ser Leu Asp Leu Gly Cys Pro Val Glu Glu Phe Asn Ala Phe Cys
 115 120 125
 Asp Ala His Pro Asp Arg Thr Val Val Val Tyr Ala Asn Thr Ser Ala
 130 135 140
 Ala Val Lys Ala Arg Ala Asp Trp Val Val Thr Ser Ser Ile Ala Val
 145 150 155 160
 Glu Leu Ile Asp His Leu Asp Ser Leu Gly Glu Lys Ile Ile Trp Ala
 165 170 175
 Pro Asp Lys His Leu Gly Arg Tyr Val Gln Lys Gln Thr Gly Gly Asp
 180 185 190
 Ile Leu Cys Trp Gln Gly Ala Cys Ile Val His Asp Glu Phe Lys Thr
 195 200 205
 Gln Ala Leu Thr Arg Leu Gln Glu Glu Tyr Pro Asp Ala Ala Ile Leu
 210 215 220
 Val His Pro Glu Ser Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Ala Asp Ala Val
 225 230 235 240
 Gly Ser Thr Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ala Lys Thr Leu Pro His Gln
 245 250 255
 Arg Leu Ile Val Ala Thr Asp Arg Gly Ile Phe Tyr Lys Met Gln Gln
 260 265 270
 Ala Val Pro Asp Lys Glu Leu Leu Glu Ala Pro Thr Ala Gly Glu Gly
 275 280 285
 Ala Thr Cys Arg Ser Cys Ala His Cys Pro Trp Met Ala Met Asn Gly
 290 295 300
 Leu Gln Ala Ile Ala Glu Ala Leu Glu Gln Glu Gly Ser Asn His Glu
 305 310 315 320
 Val His Val Asp Glu Arg Leu Arg Glu Arg Ala Leu Val Pro Leu Asn
 325 330 335
 Arg Met Leu Asp Phe Ala Ala Thr Leu Arg Gly
 340 345

<210> 44
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* W3110

5

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(297)
 <223> NadC - quinolinato fosforibosiltransferasa

10

<400> 44

ES 2 656 892 T3

Met Pro Pro Arg Arg Tyr Asn Pro Asp Thr Arg Arg Asp Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Glu Arg Ile Asn Leu Asp Ile Pro Gly Ala Val Ala Gln Ala Leu Arg
 20 25 30
 Glu Asp Leu Gly Gly Thr Val Asp Ala Asn Asn Asp Ile Thr Ala Lys
 35 40 45
 Leu Leu Pro Glu Asn Ser Arg Ser His Ala Thr Val Ile Thr Arg Glu
 50 55 60
 Asn Gly Val Phe Cys Gly Lys Arg Trp Val Glu Glu Val Phe Ile Gln
 65 70 75 80
 Leu Ala Gly Asp Asp Val Thr Ile Ile Trp His Val Asp Asp Gly Asp
 85 90 95
 Val Ile Asn Ala Asn Gln Ser Leu Phe Glu Leu Glu Gly Pro Ser Arg
 100 105 110
 Val Leu Leu Thr Gly Glu Arg Thr Ala Leu Asn Phe Val Gln Thr Leu
 115 120 125
 Ser Gly Val Ala Ser Lys Val Arg His Tyr Val Glu Leu Leu Glu Gly
 130 135 140
 Thr Asn Thr Gln Leu Leu Asp Thr Arg Lys Thr Leu Pro Gly Leu Arg
 145 150 155 160
 Ser Ala Leu Lys Tyr Ala Val Leu Cys Gly Gly Ala Asn His Arg
 165 170 175
 Leu Gly Leu Ser Asp Ala Phe Leu Ile Lys Glu Asn His Ile Ile Ala
 180 185 190
 Ser Gly Ser Val Arg Gln Ala Val Glu Lys Ala Ser Trp Leu His Pro
 195 200 205
 Asp Ala Pro Val Glu Val Glu Val Glu Asn Leu Glu Glu Leu Asp Glu
 210 215 220
 Ala Leu Lys Ala Gly Ala Asp Ile Ile Met Leu Asp Asn Phe Glu Thr
 225 230 235 240
 Glu Gln Met Arg Glu Ala Val Lys Arg Thr Asn Gly Lys Ala Leu Leu
 245 250 255
 Glu Val Ser Gly Asn Val Thr Asp Lys Thr Leu Arg Glu Phe Ala Glu
 260 265 270
 Thr Gly Val Asp Phe Ile Ser Val Gly Ala Leu Thr Lys His Val Gln
 275 280 285
 Ala Leu Asp Leu Ser Met Arg Phe Arg
 290 295

<210> 45
 <211> 883
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* W3110

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(883)
<223> Ppc - Fosfoenolpiruvato carboxilasa

5

<400> 45

ES 2 656 892 T3

Met Asn Glu Gln Tyr Ser Ala Leu Arg Ser Asn Val Ser Met Leu Gly
1 5 10 15

Lys Val Leu Gly Glu Thr Ile Lys Asp Ala Leu Gly Glu His Ile Leu
20 25 30

Glu Arg Val Glu Thr Ile Arg Lys Leu Ser Lys Ser Ser Arg Ala Gly
35 40 45

Asn Asp Ala Asn Arg Gln Glu Leu Leu Thr Thr Leu Gln Asn Leu Ser
50 55 60

Asn Asp Glu Leu Leu Pro Val Ala Arg Ala Phe Ser Gln Phe Leu Asn
65 70 75 80

Leu Ala Asn Thr Ala Glu Gln Tyr His Ser Ile Ser Pro Lys Gly Glu
85 90 95

Ala Ala Ser Asn Pro Glu Val Ile Ala Arg Thr Leu Arg Lys Leu Lys
100 105 110

Asn Gln Pro Glu Leu Ser Glu Asp Thr Ile Lys Lys Ala Val Glu Ser
115 120 125

Leu Ser Leu Glu Leu Val Leu Thr Ala His Pro Thr Glu Ile Thr Arg
130 135 140

Arg Thr Leu Ile His Lys Met Val Glu Val Asn Ala Cys Leu Lys Gln
145 150 155 160

Leu Asp Asn Lys Asp Ile Ala Asp Tyr Glu His Asn Gln Leu Met Arg
165 170 175

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

Lys Leu Arg Pro Ser Pro Val Asp Glu Ala Lys Trp Gly Phe Ala Val
195 200 205

Val Glu Asn Ser Leu Trp Gln Gly Val Pro Asn Tyr Leu Arg Glu Leu
210 215 220

Asn Glu Gln Leu Glu Glu Asn Leu Gly Tyr Lys Leu Pro Val Glu Phe
225 230 235 240

Val Pro Val Arg Phe Thr Ser Trp Met Gly Gly Asp Arg Asp Gly Asn
245 250 255

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

Trp Lys Ala Thr Asp Leu Phe Leu Lys Asp Ile Gln Val Leu Val Ser
275 280 285

Glu Leu Ser Met Val Glu Ala Thr Pro Glu Leu Leu Ala Leu Val Gly
290 295 300

Glu Glu Gly Ala Ala Glu Pro Tyr Arg Tyr Leu Met Lys Asn Leu Arg
305 310 315 320

Ser Arg Leu Met Ala Thr Gln Ala Trp Leu Glu Ala Arg Leu Lys Gly

ES 2 656 892 T3

				325						330						335
Glu	Glu	Leu	Pro	Lys	Pro	Glu	Gly	Leu	Leu	Thr	Gln	Asn	Glu	Glu	Leu	
			340					345					350			
Trp	Glu	Pro	Leu	Tyr	Ala	Cys	Tyr	Gln	Ser	Leu	Gln	Ala	Cys	Gly	Met	
		355					360					365				
Gly	Ile	Ile	Ala	Asn	Gly	Asp	Leu	Leu	Asp	Thr	Leu	Arg	Arg	Val	Lys	
	370					375					380					
Cys	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Val	Arg	Ile	Asp	Ile	Arg	Gln	Glu	Ser	Thr	
385					390				395						400	
Arg	His	Thr	Glu	Ala	Leu	Gly	Glu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	
				405					410					415		
Asp	Tyr	Glu	Ser	Trp	Ser	Glu	Ala	Asp	Lys	Gln	Ala	Phe	Leu	Ile	Arg	
			420					425					430			
Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Arg	Pro	Leu	Leu	Pro	Arg	Asn	Trp	Gln	Pro	Ser	
		435					440					445				
Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Val	Leu	Asp	Thr	Cys	Gln	Val	Ile	Ala	Glu	Ala	
	450					455					460					
Pro	Gln	Gly	Ser	Ile	Ala	Ala	Tyr	Val	Ile	Ser	Met	Ala	Lys	Thr	Pro	
465					470					475					480	
Ser	Asp	Val	Leu	Ala	Val	His	Leu	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Gly	Ile	Gly	
				485					490					495		
Phe	Ala	Met	Pro	Val	Ala	Pro	Leu	Phe	Glu	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu	Asn	
			500					505					510			
Asn	Ala	Asn	Asp	Val	Met	Thr	Gln	Leu	Leu	Asn	Ile	Asp	Trp	Tyr	Arg	
		515					520					525				
Gly	Leu	Ile	Gln	Gly	Lys	Gln	Met	Val	Met	Ile	Gly	Tyr	Ser	Asp	Ser	
	530					535					540					
Ala	Lys	Asp	Ala	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Ser	Trp	Ala	Gln	Tyr	Gln	Ala	
545					550				555						560	
Gln	Asp	Ala	Leu	Ile	Lys	Thr	Cys	Glu	Lys	Ala	Gly	Ile	Glu	Leu	Thr	
				565					570					575		
Leu	Phe	His	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Ile	Gly	Arg	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala	
			580					585					590			
His	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser	Gln	Pro	Pro	Gly	Ser	Leu	Lys	Gly	Gly	Leu	
		595					600					605				
Arg	Val	Thr	Glu	Gln	Gly	Glu	Met	Ile	Arg	Phe	Lys	Tyr	Gly	Leu	Pro	
	610					615					620					
Glu	Ile	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	Ser	Leu	Tyr	Thr	Gly	Ala	Ile	Leu	Glu	
625					630					635					640	
Ala	Asn	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Pro	Lys	Glu	Ser	Trp	Arg	Arg	Ile	
				645					650					655		
Met	Asp	Glu	Leu	Ser	Val	Ile	Ser	Cys	Asp	Val	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Val	

ES 2 656 892 T3

Ile Gly Val Tyr Lys Asp Glu Thr Gly Lys Thr Pro Val Leu Thr Ser
35 40 45

Val Lys Lys Ala Glu Gln Tyr Leu Leu Glu Asn Glu Thr Thr Lys Asn
50 55 60

Tyr Leu Gly Ile Asp Gly Ile Pro Glu Phe Gly Arg Cys Thr Gln Glu
65 70 75 80

Leu Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ala Leu Ile Asn Asp Lys Arg Ala Arg
85 90 95

Thr Ala Gln Thr Pro Gly Gly Thr Gly Ala Leu Arg Val Ala Ala Asp
100 105 110

Phe Leu Ala Lys Asn Thr Ser Val Lys Arg Val Trp Val Ser Asn Pro
115 120 125

Ser Trp Pro Asn His Lys Ser Val Phe Asn Ser Ala Gly Leu Glu Val
130 135 140

Arg Glu Tyr Ala Tyr Tyr Asp Ala Glu Asn His Thr Leu Asp Phe Asp
145 150 155 160

Ala Leu Ile Asn Ser Leu Asn Glu Ala Gln Ala Gly Asp Val Val Leu
165 170 175

Phe His Gly Cys Cys His Asn Pro Thr Gly Ile Asp Pro Thr Leu Glu
180 185 190

Gln Trp Gln Thr Leu Ala Gln Leu Ser Val Glu Lys Gly Trp Leu Pro
195 200 205

Leu Phe Asp Phe Ala Tyr Gln Gly Phe Ala Arg Gly Leu Glu Glu Asp
210 215 220

Ala Glu Gly Leu Arg Ala Phe Ala Ala Met His Lys Glu Leu Ile Val
225 230 235 240

Ala Ser Ser Tyr Ser Lys Asn Phe Gly Leu Tyr Asn Glu Arg Val Gly
245 250 255

Ala Cys Thr Leu Val Ala Ala Asp Ser Glu Thr Val Asp Arg Ala Phe
260 265 270

Ser Gln Met Lys Ala Ala Ile Arg Ala Asn Tyr Ser Asn Pro Pro Ala
275 280 285

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

Ala Ile Trp Glu Gln Glu Leu Thr Asp Met Arg Gln Arg Ile Gln Arg
305 310 315 320

Met Arg Gln Leu Phe Val Asn Thr Leu Gln Glu Lys Gly Ala Asn Arg
325 330 335

Asp Phe Ser Phe Ile Ile Lys Gln Asn Gly Met Phe Ser Phe Ser Gly
340 345 350

Leu Thr Lys Glu Gln Val Leu Arg Leu Arg Glu Glu Phe Gly Val Tyr
355 360 365

ES 2 656 892 T3

Ala Val Ala Ser Gly Arg Val Asn Val Ala Gly Met Thr Pro Asp Asn
370 375 380

Met Ala Pro Leu Cys Glu Ala Ile Val Ala Val Leu
385 390 395

- 5 <210> 47
- <211> 900
- <212> PRT
- <213> *Escherichia coli* W3110

- 10 <220>
- <221> PEPTIDO
- <222> (1)..(900)
- <223> Proteína de fusión - Aspartato oxidasa-HL1-Quinolinato sintasa

- <400> 47

ES 2 656 892 T3

Met Asn Thr Leu Pro Glu His Ser Cys Asp Val Leu Ile Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ala Leu Arg Leu Ala Asp Gln His Gln
 20 25 30
 Val Ile Val Leu Ser Lys Gly Pro Val Thr Glu Gly Ser Thr Phe Tyr
 35 40 45
 Ala Gln Gly Gly Ile Ala Ala Val Phe Asp Glu Thr Asp Ser Ile Asp
 50 55 60
 Ser His Val Glu Asp Thr Leu Ile Ala Gly Ala Gly Ile Cys Asp Arg
 65 70 75 80
 His Ala Val Glu Phe Val Ala Ser Asn Ala Arg Ser Cys Val Gln Trp
 85 90 95
 Leu Ile Asp Gln Gly Val Leu Phe Asp Thr His Ile Gln Pro Asn Gly
 100 105 110
 Glu Glu Ser Tyr His Leu Thr Arg Glu Gly Gly His Ser His Arg Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Ala Ala Asp Ala Thr Gly Arg Glu Val Glu Thr Thr Leu
 130 135 140
 Val Ser Lys Ala Leu Asn His Pro Asn Ile Arg Val Leu Glu Arg Ser
 145 150 155 160
 Asn Ala Val Asp Leu Ile Val Ser Asp Lys Ile Gly Leu Pro Gly Thr
 165 170 175
 Arg Arg Val Val Gly Ala Trp Val Trp Asn Arg Asn Lys Glu Thr Val
 180 185 190
 Glu Thr Cys His Ala Lys Ala Val Val Leu Ala Thr Gly Gly Ala Ser
 195 200 205
 Lys Val Tyr Gln Tyr Thr Thr Asn Pro Asp Ile Ser Ser Gly Asp Gly
 210 215 220
 Ile Ala Met Ala Trp Arg Ala Gly Cys Arg Val Ala Asn Leu Glu Phe
 225 230 235 240

ES 2 656 892 T3

Asn Gln Phe His Pro Thr Ala Leu Tyr His Pro Gln Ala Arg Asn Phe
 245 250 255
 Leu Leu Thr Glu Ala Leu Arg Gly Glu Gly Ala Tyr Leu Lys Arg Pro
 260 265 270
 Asp Gly Thr Arg Phe Met Pro Asp Phe Asp Glu Arg Gly Glu Leu Ala
 275 280 285
 Pro Arg Asp Ile Val Ala Arg Ala Ile Asp His Glu Met Lys Arg Leu
 290 295 300
 Gly Ala Asp Cys Met Phe Leu Asp Ile Ser His Lys Pro Ala Asp Phe
 305 310 315 320
 Ile Arg Gln His Phe Pro Met Ile Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Leu Gly
 325 330 335
 Ile Asp Leu Thr Gln Glu Pro Val Pro Ile Val Pro Ala Ala His Tyr
 340 345 350
 Thr Cys Gly Gly Val Met Val Asp Asp His Gly Arg Thr Asp Val Glu
 355 360 365
 Gly Leu Tyr Ala Ile Gly Glu Val Ser Tyr Thr Gly Leu His Gly Ala
 370 375 380
 Asn Arg Met Ala Ser Asn Ser Leu Leu Glu Cys Leu Val Tyr Gly Trp
 385 390 395 400
 Ser Ala Ala Glu Asp Ile Thr Arg Arg Met Pro Tyr Ala His Asp Ile
 405 410 415
 Ser Thr Leu Pro Pro Trp Asp Glu Ser Arg Val Glu Asn Pro Asp Glu
 420 425 430
 Arg Val Val Ile Gln His Asn Trp His Glu Leu Arg Leu Phe Met Trp
 435 440 445
 Asp Tyr Val Gly Ile Val Arg Thr Thr Lys Arg Leu Glu Arg Ala Leu
 450 455 460
 Arg Arg Ile Thr Met Leu Gln Gln Glu Ile Asp Glu Tyr Tyr Ala His
 465 470 475 480
 Phe Arg Val Ser Asn Asn Leu Leu Glu Leu Arg Asn Leu Val Gln Val
 485 490 495
 Ala Glu Leu Ile Val Arg Cys Ala Met Met Arg Lys Glu Ser Arg Gly
 500 505 510
 Leu His Phe Thr Leu Asp Tyr Pro Glu Leu Leu Thr His Ser Gly Pro
 515 520 525
 Ser Ile Leu Ser Pro Gly Asn His Tyr Ile Asn Arg Ile Leu Ala Glu
 530 535 540
 Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Leu Gln Met Ser Val Met Phe Asp Pro
 545 550 555 560
 Asp Thr Ala Ile Tyr Pro Phe Pro Pro Lys Pro Thr Pro Leu Ser Ile
 565 570 575

ES 2 656 892 T3

Asp Glu Lys Ala Tyr Tyr Arg Glu Lys Ile Lys Arg Leu Leu Lys Glu
 580 585 590
 Arg Asn Ala Val Met Val Ala His Tyr Tyr Thr Asp Pro Glu Ile Gln
 595 600 605
 Gln Leu Ala Glu Glu Thr Gly Gly Cys Ile Ser Asp Ser Leu Glu Met
 610 615 620
 Ala Arg Phe Gly Ala Lys His Pro Ala Ser Thr Leu Leu Val Ala Gly
 625 630 635 640
 Val Arg Phe Met Gly Glu Thr Ala Lys Ile Leu Ser Pro Glu Lys Thr
 645 650 655
 Ile Leu Met Pro Thr Leu Gln Ala Glu Cys Ser Leu Asp Leu Gly Cys
 660 665 670
 Pro Val Glu Glu Phe Asn Ala Phe Cys Asp Ala His Pro Asp Arg Thr
 675 680 685
 Val Val Val Tyr Ala Asn Thr Ser Ala Ala Val Lys Ala Arg Ala Asp
 690 695 700
 Trp Val Val Thr Ser Ser Ile Ala Val Glu Leu Ile Asp His Leu Asp
 705 710 715 720
 Ser Leu Gly Glu Lys Ile Ile Trp Ala Pro Asp Lys His Leu Gly Arg
 725 730 735
 Tyr Val Gln Lys Gln Thr Gly Gly Asp Ile Leu Cys Trp Gln Gly Ala
 740 745 750
 Cys Ile Val His Asp Glu Phe Lys Thr Gln Ala Leu Thr Arg Leu Gln
 755 760 765
 Glu Glu Tyr Pro Asp Ala Ala Ile Leu Val His Pro Glu Ser Pro Gln
 770 775 780
 Ala Ile Val Asp Met Ala Asp Ala Val Gly Ser Thr Ser Gln Leu Ile
 785 790 795 800
 Ala Ala Ala Lys Thr Leu Pro His Gln Arg Leu Ile Val Ala Thr Asp
 805 810 815
 Arg Gly Ile Phe Tyr Lys Met Gln Gln Ala Val Pro Asp Lys Glu Leu
 820 825 830
 Leu Glu Ala Pro Thr Ala Gly Glu Gly Ala Thr Cys Arg Ser Cys Ala
 835 840 845
 His Cys Pro Trp Met Ala Met Asn Gly Leu Gln Ala Ile Ala Glu Ala
 850 855 860
 Leu Glu Gln Glu Gly Ser Asn His Glu Val His Val Asp Glu Arg Leu
 865 870 875 880
 Arg Glu Arg Ala Leu Val Pro Leu Asn Arg Met Leu Asp Phe Ala Ala
 885 890 895
 Thr Leu Arg Gly
 900

ES 2 656 892 T3

<210> 48
 <211> 905
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* W3110

5

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(905)
 <223> Proteína de fusión - Aspartato oxidasa-HL2-Quinolinato sintasa

10

<400> 48

```

Met Asn Thr Leu Pro Glu His Ser Cys Asp Val Leu Ile Ile Gly Ser
  1           5           10           15

Gly Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ala Leu Arg Leu Ala Asp Gln His Gln
          20           25           30

Val Ile Val Leu Ser Lys Gly Pro Val Thr Glu Gly Ser Thr Phe Tyr
          35           40           45

Ala Gln Gly Gly Ile Ala Ala Val Phe Asp Glu Thr Asp Ser Ile Asp
  50           55           60

Ser His Val Glu Asp Thr Leu Ile Ala Gly Ala Gly Ile Cys Asp Arg
  65           70           75           80

His Ala Val Glu Phe Val Ala Ser Asn Ala Arg Ser Cys Val Gln Trp
          85           90           95

Leu Ile Asp Gln Gly Val Leu Phe Asp Thr His Ile Gln Pro Asn Gly
 100           105           110

Glu Glu Ser Tyr His Leu Thr Arg Glu Gly Gly His Ser His Arg Arg
 115           120           125

Ile Leu His Ala Ala Asp Ala Thr Gly Arg Glu Val Glu Thr Thr Leu
 130           135           140

Val Ser Lys Ala Leu Asn His Pro Asn Ile Arg Val Leu Glu Arg Ser
 145           150           155           160

Asn Ala Val Asp Leu Ile Val Ser Asp Lys Ile Gly Leu Pro Gly Thr
 165           170           175

Arg Arg Val Val Gly Ala Trp Val Trp Asn Arg Asn Lys Glu Thr Val
 180           185           190

Glu Thr Cys His Ala Lys Ala Val Val Leu Ala Thr Gly Gly Ala Ser
 195           200           205

Lys Val Tyr Gln Tyr Thr Thr Asn Pro Asp Ile Ser Ser Gly Asp Gly
 210           215           220

Ile Ala Met Ala Trp Arg Ala Gly Cys Arg Val Ala Asn Leu Glu Phe
 225           230           235           240

Asn Gln Phe His Pro Thr Ala Leu Tyr His Pro Gln Ala Arg Asn Phe
 245           250           255

Leu Leu Thr Glu Ala Leu Arg Gly Glu Gly Ala Tyr Leu Lys Arg Pro
    
```

ES 2 656 892 T3

260					265					270					
Asp	Gly	Thr	Arg	Phe	Met	Pro	Asp	Phe	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Ala
		275					280					285			
Pro	Arg	Asp	Ile	Val	Ala	Arg	Ala	Ile	Asp	His	Glu	Met	Lys	Arg	Leu
	290					295					300				
Gly	Ala	Asp	Cys	Met	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser	His	Lys	Pro	Ala	Asp	Phe
305					310					315					320
Ile	Arg	Gln	His	Phe	Pro	Met	Ile	Tyr	Glu	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly
				325					330					335	
Ile	Asp	Leu	Thr	Gln	Glu	Pro	Val	Pro	Ile	Val	Pro	Ala	Ala	His	Tyr
			340					345						350	
Thr	Cys	Gly	Gly	Val	Met	Val	Asp	Asp	His	Gly	Arg	Thr	Asp	Val	Glu
		355					360					365			
Gly	Leu	Tyr	Ala	Ile	Gly	Glu	Val	Ser	Tyr	Thr	Gly	Leu	His	Gly	Ala
	370					375					380				
Asn	Arg	Met	Ala	Ser	Asn	Ser	Leu	Leu	Glu	Cys	Leu	Val	Tyr	Gly	Trp
385					390					395					400
Ser	Ala	Ala	Glu	Asp	Ile	Thr	Arg	Arg	Met	Pro	Tyr	Ala	His	Asp	Ile
				405					410					415	
Ser	Thr	Leu	Pro	Pro	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Val	Glu	Asn	Pro	Asp	Glu
			420					425					430		
Arg	Val	Val	Ile	Gln	His	Asn	Trp	His	Glu	Leu	Arg	Leu	Phe	Met	Trp
		435					440					445			
Asp	Tyr	Val	Gly	Ile	Val	Arg	Thr	Thr	Lys	Arg	Leu	Glu	Arg	Ala	Leu
	450					455					460				
Arg	Arg	Ile	Thr	Met	Leu	Gln	Gln	Glu	Ile	Asp	Glu	Tyr	Tyr	Ala	His
465					470					475					480
Phe	Arg	Val	Ser	Asn	Asn	Leu	Leu	Glu	Leu	Arg	Asn	Leu	Val	Gln	Val
				485					490					495	
Ala	Glu	Leu	Ile	Val	Arg	Cys	Ala	Met	Met	Arg	Lys	Glu	Ser	Arg	Gly
			500					505					510		
Leu	His	Phe	Thr	Leu	Asp	Tyr	Pro	Glu	Leu	Leu	Thr	His	Ser	Gly	Pro
		515					520					525			
Ser	Ile	Leu	Ser	Pro	Gly	Asn	His	Tyr	Ile	Asn	Arg	Ile	Leu	Ala	Glu
	530					535					540				
Ala	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Leu	Gln	Met	Ser
545					550					555					560
Val	Met	Phe	Asp	Pro	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Pro	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
				565					570					575	
Thr	Pro	Leu	Ser	Ile	Asp	Glu	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Glu	Lys	Ile	Lys
			580					585					590		
Arg	Leu	Leu	Lys	Glu	Arg	Asn	Ala	Val	Met	Val	Ala	His	Tyr	Tyr	Thr

ES 2 656 892 T3

	595		600		605										
Asp	Pro	Glu	Ile	Gln	Gln	Leu	Ala	Glu	Glu	Thr	Gly	Gly	Cys	Ile	Ser
	610					615					620				
Asp	Ser	Leu	Glu	Met	Ala	Arg	Phe	Gly	Ala	Lys	His	Pro	Ala	Ser	Thr
625					630					635					640
Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Val	Arg	Phe	Met	Gly	Glu	Thr	Ala	Lys	Ile	Leu
				645					650					655	
Ser	Pro	Glu	Lys	Thr	Ile	Leu	Met	Pro	Thr	Leu	Gln	Ala	Glu	Cys	Ser
			660					665						670	
Leu	Asp	Leu	Gly	Cys	Pro	Val	Glu	Glu	Phe	Asn	Ala	Phe	Cys	Asp	Ala
	675						680					685			
His	Pro	Asp	Arg	Thr	Val	Val	Val	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ser	Ala	Ala	Val
	690					695					700				
Lys	Ala	Arg	Ala	Asp	Trp	Val	Val	Thr	Ser	Ser	Ile	Ala	Val	Glu	Leu
705					710					715					720
Ile	Asp	His	Leu	Asp	Ser	Leu	Gly	Glu	Lys	Ile	Ile	Trp	Ala	Pro	Asp
				725					730					735	
Lys	His	Leu	Gly	Arg	Tyr	Val	Gln	Lys	Gln	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu
			740					745					750		
Cys	Trp	Gln	Gly	Ala	Cys	Ile	Val	His	Asp	Glu	Phe	Lys	Thr	Gln	Ala
		755					760					765			
Leu	Thr	Arg	Leu	Gln	Glu	Glu	Tyr	Pro	Asp	Ala	Ala	Ile	Leu	Val	His
	770					775						780			
Pro	Glu	Ser	Pro	Gln	Ala	Ile	Val	Asp	Met	Ala	Asp	Ala	Val	Gly	Ser
785				790						795					800
Thr	Ser	Gln	Leu	Ile	Ala	Ala	Ala	Lys	Thr	Leu	Pro	His	Gln	Arg	Leu
				805					810					815	
Ile	Val	Ala	Thr	Asp	Arg	Gly	Ile	Phe	Tyr	Lys	Met	Gln	Gln	Ala	Val
			820					825					830		
Pro	Asp	Lys	Glu	Leu	Leu	Glu	Ala	Pro	Thr	Ala	Gly	Glu	Gly	Ala	Thr
		835					840					845			
Cys	Arg	Ser	Cys	Ala	His	Cys	Pro	Trp	Met	Ala	Met	Asn	Gly	Leu	Gln
	850					855					860				
Ala	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Gln	Glu	Gly	Ser	Asn	His	Glu	Val	His
865					870					875					880
Val	Asp	Glu	Arg	Leu	Arg	Glu	Arg	Ala	Leu	Val	Pro	Leu	Asn	Arg	Met
				885					890						895
Leu	Asp	Phe	Ala	Ala	Thr	Leu	Arg	Gly							
			900					905							

<210> 49
 <211> 910

ES 2 656 892 T3

<212> PRT
 <213> *Escherichia coli* W3110

5 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(910)
 <223> Proteína de fusión - Aspartato oxidasa-HL3-Quinolinato sintasa

10 <400> 49

Met	Asn	Thr	Leu	Pro	Glu	His	Ser	Cys	Asp	Val	Leu	Ile	Ile	Gly	Ser
1				5					10					15	
Gly	Ala	Ala	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	Ala	Asp	Gln	His	Gln
			20					25					30		
Val	Ile	Val	Leu	Ser	Lys	Gly	Pro	Val	Thr	Glu	Gly	Ser	Thr	Phe	Tyr
		35					40					45			
Ala	Gln	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Thr	Asp	Ser	Ile	Asp
	50					55					60				
Ser	His	Val	Glu	Asp	Thr	Leu	Ile	Ala	Gly	Ala	Gly	Ile	Cys	Asp	Arg
65					70					75					80
His	Ala	Val	Glu	Phe	Val	Ala	Ser	Asn	Ala	Arg	Ser	Cys	Val	Gln	Trp
				85					90					95	
Leu	Ile	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Phe	Asp	Thr	His	Ile	Gln	Pro	Asn	Gly
			100					105					110		
Glu	Glu	Ser	Tyr	His	Leu	Thr	Arg	Glu	Gly	Gly	His	Ser	His	Arg	Arg
		115					120					125			
Ile	Leu	His	Ala	Ala	Asp	Ala	Thr	Gly	Arg	Glu	Val	Glu	Thr	Thr	Leu
	130					135					140				
Val	Ser	Lys	Ala	Leu	Asn	His	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Ser
145					150					155					160
Asn	Ala	Val	Asp	Leu	Ile	Val	Ser	Asp	Lys	Ile	Gly	Leu	Pro	Gly	Thr
				165					170					175	
Arg	Arg	Val	Val	Gly	Ala	Trp	Val	Trp	Asn	Arg	Asn	Lys	Glu	Thr	Val
			180					185					190		
Glu	Thr	Cys	His	Ala	Lys	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Ser
		195					200					205			
Lys	Val	Tyr	Gln	Tyr	Thr	Thr	Asn	Pro	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Asp	Gly
	210					215					220				
Ile	Ala	Met	Ala	Trp	Arg	Ala	Gly	Cys	Arg	Val	Ala	Asn	Leu	Glu	Phe
225					230					235					240
Asn	Gln	Phe	His	Pro	Thr	Ala	Leu	Tyr	His	Pro	Gln	Ala	Arg	Asn	Phe
				245					250					255	
Leu	Leu	Thr	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Leu	Lys	Arg	Pro
			260					265					270		
Asp	Gly	Thr	Arg	Phe	Met	Pro	Asp	Phe	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Ala
		275					280					285			

ES 2 656 892 T3

Pro Arg Asp Ile Val Ala Arg Ala Ile Asp His Glu Met Lys Arg Leu
 290 295 300
 Gly Ala Asp Cys Met Phe Leu Asp Ile Ser His Lys Pro Ala Asp Phe
 305 310 315 320
 Ile Arg Gln His Phe Pro Met Ile Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Leu Gly
 325 330 335
 Ile Asp Leu Thr Gln Glu Pro Val Pro Ile Val Pro Ala Ala His Tyr
 340 345 350
 Thr Cys Gly Gly Val Met Val Asp Asp His Gly Arg Thr Asp Val Glu
 355 360 365
 Gly Leu Tyr Ala Ile Gly Glu Val Ser Tyr Thr Gly Leu His Gly Ala
 370 375 380
 Asn Arg Met Ala Ser Asn Ser Leu Leu Glu Cys Leu Val Tyr Gly Trp
 385 390 395 400
 Ser Ala Ala Glu Asp Ile Thr Arg Arg Met Pro Tyr Ala His Asp Ile
 405 410 415
 Ser Thr Leu Pro Pro Trp Asp Glu Ser Arg Val Glu Asn Pro Asp Glu
 420 425 430
 Arg Val Val Ile Gln His Asn Trp His Glu Leu Arg Leu Phe Met Trp
 435 440 445
 Asp Tyr Val Gly Ile Val Arg Thr Thr Lys Arg Leu Glu Arg Ala Leu
 450 455 460
 Arg Arg Ile Thr Met Leu Gln Gln Glu Ile Asp Glu Tyr Tyr Ala His
 465 470 475 480
 Phe Arg Val Ser Asn Asn Leu Leu Glu Leu Arg Asn Leu Val Gln Val
 485 490 495
 Ala Glu Leu Ile Val Arg Cys Ala Met Met Arg Lys Glu Ser Arg Gly
 500 505 510
 Leu His Phe Thr Leu Asp Tyr Pro Glu Leu Leu Thr His Ser Gly Pro
 515 520 525
 Ser Ile Leu Ser Pro Gly Asn His Tyr Ile Asn Arg Ile Leu Ala Glu
 530 535 540
 Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala
 545 550 555 560
 Ala Leu Gln Met Ser Val Met Phe Asp Pro Asp Thr Ala Ile Tyr Pro
 565 570 575
 Phe Pro Pro Lys Pro Thr Pro Leu Ser Ile Asp Glu Lys Ala Tyr Tyr
 580 585 590
 Arg Glu Lys Ile Lys Arg Leu Leu Lys Glu Arg Asn Ala Val Met Val
 595 600 605
 Ala His Tyr Tyr Thr Asp Pro Glu Ile Gln Gln Leu Ala Glu Glu Thr
 610 615 620

ES 2 656 892 T3

Gly Gly Cys Ile Ser Asp Ser Leu Glu Met Ala Arg Phe Gly Ala Lys
625 630 635 640

His Pro Ala Ser Thr Leu Leu Val Ala Gly Val Arg Phe Met Gly Glu
645 650 655

Thr Ala Lys Ile Leu Ser Pro Glu Lys Thr Ile Leu Met Pro Thr Leu
660 665 670

Gln Ala Glu Cys Ser Leu Asp Leu Gly Cys Pro Val Glu Glu Phe Asn
675 680 685

Ala Phe Cys Asp Ala His Pro Asp Arg Thr Val Val Val Tyr Ala Asn
690 695 700

Thr Ser Ala Ala Val Lys Ala Arg Ala Asp Trp Val Val Thr Ser Ser
705 710 715 720

Ile Ala Val Glu Leu Ile Asp His Leu Asp Ser Leu Gly Glu Lys Ile
725 730 735

Ile Trp Ala Pro Asp Lys His Leu Gly Arg Tyr Val Gln Lys Gln Thr
740 745 750

Gly Gly Asp Ile Leu Cys Trp Gln Gly Ala Cys Ile Val His Asp Glu
755 760 765

Phe Lys Thr Gln Ala Leu Thr Arg Leu Gln Glu Glu Tyr Pro Asp Ala
770 775 780

Ala Ile Leu Val His Pro Glu Ser Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Ala
785 790 795 800

Asp Ala Val Gly Ser Thr Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ala Lys Thr Leu
805 810 815

Pro His Gln Arg Leu Ile Val Ala Thr Asp Arg Gly Ile Phe Tyr Lys
820 825 830

Met Gln Gln Ala Val Pro Asp Lys Glu Leu Leu Glu Ala Pro Thr Ala
835 840 845

Gly Glu Gly Ala Thr Cys Arg Ser Cys Ala His Cys Pro Trp Met Ala
850 855 860

Met Asn Gly Leu Gln Ala Ile Ala Glu Ala Leu Glu Gln Glu Gly Ser
865 870 875 880

Asn His Glu Val His Val Asp Glu Arg Leu Arg Glu Arg Ala Leu Val
885 890 895

Pro Leu Asn Arg Met Leu Asp Phe Ala Ala Thr Leu Arg Gly
900 905 910

<210> 50
<211> 915
5 <212> PRT
<213> *Escherichia coli* W3110

<220>
10 <221> PEPTIDO
<222> (1)..(915)

ES 2 656 892 T3

<223> Proteína de fusión - Aspartato oxidasa-HL4-Quinolinato sintasa

<400> 50

```

Met Asn Thr Leu Pro Glu His Ser Cys Asp Val Leu Ile Ile Gly Ser
 1           5           10           15
Gly Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ala Leu Arg Leu Ala Asp Gln His Gln
      20           25           30
Val Ile Val Leu Ser Lys Gly Pro Val Thr Glu Gly Ser Thr Phe Tyr
      35           40           45
Ala Gln Gly Gly Ile Ala Ala Val Phe Asp Glu Thr Asp Ser Ile Asp
      50           55           60
Ser His Val Glu Asp Thr Leu Ile Ala Gly Ala Gly Ile Cys Asp Arg
 65           70           75           80
His Ala Val Glu Phe Val Ala Ser Asn Ala Arg Ser Cys Val Gln Trp
      85           90
Leu Ile Asp Gln Gly Val Leu Phe Asp Thr His Ile Gln Pro Asn Gly
      100           105           110
Glu Glu Ser Tyr His Leu Thr Arg Glu Gly Gly His Ser His Arg Arg
      115           120           125
Ile Leu His Ala Ala Asp Ala Thr Gly Arg Glu Val Glu Thr Thr Leu
      130           135           140
Val Ser Lys Ala Leu Asn His Pro Asn Ile Arg Val Leu Glu Arg Ser
      145           150           155           160
Asn Ala Val Asp Leu Ile Val Ser Asp Lys Ile Gly Leu Pro Gly Thr
      165           170           175
Arg Arg Val Val Gly Ala Trp Val Trp Asn Arg Asn Lys Glu Thr Val
      180           185           190
Glu Thr Cys His Ala Lys Ala Val Val Leu Ala Thr Gly Gly Ala Ser
      195           200           205
Lys Val Tyr Gln Tyr Thr Thr Asn Pro Asp Ile Ser Ser Gly Asp Gly
      210           215           220
Ile Ala Met Ala Trp Arg Ala Gly Cys Arg Val Ala Asn Leu Glu Phe
      225           230           235           240
Asn Gln Phe His Pro Thr Ala Leu Tyr His Pro Gln Ala Arg Asn Phe
      245           250           255
Leu Leu Thr Glu Ala Leu Arg Gly Glu Gly Ala Tyr Leu Lys Arg Pro
      260           265           270
Asp Gly Thr Arg Phe Met Pro Asp Phe Asp Glu Arg Gly Glu Leu Ala
      275           280           285
Pro Arg Asp Ile Val Ala Arg Ala Ile Asp His Glu Met Lys Arg Leu
      290           295           300
Gly Ala Asp Cys Met Phe Leu Asp Ile Ser His Lys Pro Ala Asp Phe
      305           310           315           320

```

ES 2 656 892 T3

Ile Arg Gln His Phe Pro Met Ile Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Leu Gly
325 330 335

Ile Asp Leu Thr Gln Glu Pro Val Pro Ile Val Pro Ala Ala His Tyr
340 345 350

Thr Cys Gly Gly Val Met Val Asp Asp His Gly Arg Thr Asp Val Glu
355 360 365

Gly Leu Tyr Ala Ile Gly Glu Val Ser Tyr Thr Gly Leu His Gly Ala
370 375 380

Asn Arg Met Ala Ser Asn Ser Leu Leu Glu Cys Leu Val Tyr Gly Trp
385 390 395 400

Ser Ala Ala Glu Asp Ile Thr Arg Arg Met Pro Tyr Ala His Asp Ile
405 410 415

Ser Thr Leu Pro Pro Trp Asp Glu Ser Arg Val Glu Asn Pro Asp Glu
420 425 430

Arg Val Val Ile Gln His Asn Trp His Glu Leu Arg Leu Phe Met Trp
435 440 445

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

Arg Arg Ile Thr Met Leu Gln Gln Glu Ile Asp Glu Tyr Tyr Ala His
465 470 475 480

Phe Arg Val Ser Asn Asn Leu Leu Glu Leu Arg Asn Leu Val Gln Val
485 490 495

Ala Glu Leu Ile Val Arg Cys Ala Met Met Arg Lys Glu Ser Arg Gly
500 505 510

Leu His Phe Thr Leu Asp Tyr Pro Glu Leu Leu Thr His Ser Gly Pro
515 520 525

Ser Ile Leu Ser Pro Gly Asn His Tyr Ile Asn Arg Ile Leu Ala Glu
530 535 540

Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala
545 550 555 560

Ala Ala Lys Ala Ala Ala Leu Gln Met Ser Val Met Phe Asp Pro Asp
565 570 575

Thr Ala Ile Tyr Pro Phe Pro Pro Lys Pro Thr Pro Leu Ser Ile Asp
580 585 590

Glu Lys Ala Tyr Tyr Arg Glu Lys Ile Lys Arg Leu Leu Lys Glu Arg
595 600 605

Asn Ala Val Met Val Ala His Tyr Tyr Thr Asp Pro Glu Ile Gln Gln
610 615 620

Leu Ala Glu Glu Thr Gly Gly Cys Ile Ser Asp Ser Leu Glu Met Ala
625 630 635 640

Arg Phe Gly Ala Lys His Pro Ala Ser Thr Leu Leu Val Ala Gly Val
645 650 655

ES 2 656 892 T3

Arg Phe Met Gly Glu Thr Ala Lys Ile Leu Ser Pro Glu Lys Thr Ile
660 665 670

Leu Met Pro Thr Leu Gln Ala Glu Cys Ser Leu Asp Leu Gly Cys Pro
675 680 685

Val Glu Glu Phe Asn Ala Phe Cys Asp Ala His Pro Asp Arg Thr Val
690 695 700

Val Val Tyr Ala Asn Thr Ser Ala Ala Val Lys Ala Arg Ala Asp Trp
705 710 715 720

Val Val Thr Ser Ser Ile Ala Val Glu Leu Ile Asp His Leu Asp Ser
725 730 735

Leu Gly Glu Lys Ile Ile Trp Ala Pro Asp Lys His Leu Gly Arg Tyr
740 745 750

Val Gln Lys Gln Thr Gly Gly Asp Ile Leu Cys Trp Gln Gly Ala Cys
755 760 765

Ile Val His Asp Glu Phe Lys Thr Gln Ala Leu Thr Arg Leu Gln Glu
770 775 780

Glu Tyr Pro Asp Ala Ala Ile Leu Val His Pro Glu Ser Pro Gln Ala
785 790 795 800

Ile Val Asp Met Ala Asp Ala Val Gly Ser Thr Ser Gln Leu Ile Ala
805 810 815

Ala Ala Lys Thr Leu Pro His Gln Arg Leu Ile Val Ala Thr Asp Arg
820 825 830

Gly Ile Phe Tyr Lys Met Gln Gln Ala Val Pro Asp Lys Glu Leu Leu
835 840 845

Glu Ala Pro Thr Ala Gly Glu Gly Ala Thr Cys Arg Ser Cys Ala His
850 855 860

Cys Pro Trp Met Ala Met Asn Gly Leu Gln Ala Ile Ala Glu Ala Leu
865 870 875 880

Glu Gln Glu Gly Ser Asn His Glu Val His Val Asp Glu Arg Leu Arg
885 890 895

Glu Arg Ala Leu Val Pro Leu Asn Arg Met Leu Asp Phe Ala Ala Thr
900 905 910

Leu Arg Gly
915

<210> 51
<211> 920
5 <212> PRT
<213> *Escherichia coli* W3110

<220>
10 <221> PEPTIDO
<222> (1)..(920)
<223> Proteína de fusión - Aspartato oxidasa-HL5-Quinolinato sintasa

<400> 51

ES 2 656 892 T3

Met Asn Thr Leu Pro Glu His Ser Cys Asp Val Leu Ile Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ala Leu Arg Leu Ala Asp Gln His Gln
 20 25 30
 Val Ile Val Leu Ser Lys Gly Pro Val Thr Glu Gly Ser Thr Phe Tyr
 35 40 45
 Ala Gln Gly Gly Ile Ala Ala Val Phe Asp Glu Thr Asp Ser Ile Asp
 50 55 60
 Ser His Val Glu Asp Thr Leu Ile Ala Gly Ala Gly Ile Cys Asp Arg
 65 70 75 80
 His Ala Val Glu Phe Val Ala Ser Asn Ala Arg Ser Cys Val Gln Trp
 85 90 95
 Leu Ile Asp Gln Gly Val Leu Phe Asp Thr His Ile Gln Pro Asn Gly
 100 105 110
 Glu Glu Ser Tyr His Leu Thr Arg Glu Gly Gly His Ser His Arg Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Ala Ala Asp Ala Thr Gly Arg Glu Val Glu Thr Thr Leu
 130 135 140
 Val Ser Lys Ala Leu Asn His Pro Asn Ile Arg Val Leu Glu Arg Ser
 145 150 155 160
 Asn Ala Val Asp Leu Ile Val Ser Asp Lys Ile Gly Leu Pro Gly Thr
 165 170 175
 Arg Arg Val Val Gly Ala Trp Val Trp Asn Arg Asn Lys Glu Thr Val
 180 185 190
 Glu Thr Cys His Ala Lys Ala Val Val Leu Ala Thr Gly Gly Ala Ser
 195 200 205
 Lys Val Tyr Gln Tyr Thr Thr Asn Pro Asp Ile Ser Ser Gly Asp Gly
 210 215 220
 Ile Ala Met Ala Trp Arg Ala Gly Cys Arg Val Ala Asn Leu Glu Phe
 225 230 235 240
 Asn Gln Phe His Pro Thr Ala Leu Tyr His Pro Gln Ala Arg Asn Phe
 245 250 255
 Leu Leu Thr Glu Ala Leu Arg Gly Glu Gly Ala Tyr Leu Lys Arg Pro
 260 265 270
 Asp Gly Thr Arg Phe Met Pro Asp Phe Asp Glu Arg Gly Glu Leu Ala
 275 280 285
 Pro Arg Asp Ile Val Ala Arg Ala Ile Asp His Glu Met Lys Arg Leu
 290 295 300
 Gly Ala Asp Cys Met Phe Leu Asp Ile Ser His Lys Pro Ala Asp Phe
 305 310 315 320
 Ile Arg Gln His Phe Pro Met Ile Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Leu Gly

ES 2 656 892 T3

Met Asn Thr Leu Pro Glu His Ser Cys Asp Val Leu Ile Ile Gly Ser
1 5 10 15

Gly Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ala Leu Arg Leu Ala Asp Gln His Gln
20 25 30

Val Ile Val Leu Ser Lys Gly Pro Val Thr Glu Gly Ser Thr Phe Tyr
35 40 45

Ala Gln Gly Gly Ile Ala Ala Val Phe Asp Glu Thr Asp Ser Ile Asp
50 55 60

Ser His Val Glu Asp Thr Leu Ile Ala Gly Ala Gly Ile Cys Asp Arg
65 70 75 80

His Ala Val Glu Phe Val Ala Ser Asn Ala Arg Ser Cys Val Gln Trp
85 90 95

Leu Ile Asp Gln Gly Val Leu Phe Asp Thr His Ile Gln Pro Asn Gly
100 105 110

Glu Glu Ser Tyr His Leu Thr Arg Glu Gly Gly His Ser His Arg Arg
115 120 125

Ile Leu His Ala Ala Asp Ala Thr Gly Arg Glu Val Glu Thr Thr Leu
130 135 140

Val Ser Lys Ala Leu Asn His Pro Asn Ile Arg Val Leu Glu Arg Ser
145 150 155 160

Asn Ala Val Asp Leu Ile Val Ser Asp Lys Ile Gly Leu Pro Gly Thr
165 170 175

Arg Arg Val Val Gly Ala Trp Val Trp Asn Arg Asn Lys Glu Thr Val
180 185 190

Glu Thr Cys His Ala Lys Ala Val Val Leu Ala Thr Gly Gly Ala Ser
195 200 205

Lys Val Tyr Gln Tyr Thr Thr Asn Pro Asp Ile Ser Ser Gly Asp Gly
210 215 220

Ile Ala Met Ala Trp Arg Ala Gly Cys Arg Val Ala Asn Leu Glu Phe
225 230 235 240

Asn Gln Phe His Pro Thr Ala Leu Tyr His Pro Gln Ala Arg Asn Phe
245 250 255

Leu Leu Thr Glu Ala Leu Arg Gly Glu Gly Ala Tyr Leu Lys Arg Pro
260 265 270

Asp Gly Thr Arg Phe Met Pro Asp Phe Asp Glu Arg Gly Glu Leu Ala
275 280 285

Pro Arg Asp Ile Val Ala Arg Ala Ile Asp His Glu Met Lys Arg Leu
290 295 300

Gly Ala Asp Cys Met Phe Leu Asp Ile Ser His Lys Pro Ala Asp Phe
305 310 315 320

Ile Arg Gln His Phe Pro Met Ile Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Leu Gly
325 330 335

ES 2 656 892 T3

Ile Asp Leu Thr Gln Glu Pro Val Pro Ile Val Pro Ala Ala His Tyr
340 345 350

Thr Cys Gly Gly Val Met Val Asp Asp His Gly Arg Thr Asp Val Glu
355 360 365

Gly Leu Tyr Ala Ile Gly Glu Val Ser Tyr Thr Gly Leu His Gly Ala
370 375 380

Asn Arg Met Ala Ser Asn Ser Leu Leu Glu Cys Leu Val Tyr Gly Trp
385 390 395 400

Ser Ala Ala Glu Asp Ile Thr Arg Arg Met Pro Tyr Ala His Asp Ile
405 410 415

Ser Thr Leu Pro Pro Trp Asp Glu Ser Arg Val Glu Asn Pro Asp Glu
420 425 430

Arg Val Val Ile Gln His Asn Trp His Glu Leu Arg Leu Phe Met Trp
435 440 445

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

Arg Arg Ile Thr Met Leu Gln Gln Glu Ile Asp Glu Tyr Tyr Ala His
465 470 475 480

Phe Arg Val Ser Asn Asn Leu Leu Glu Leu Arg Asn Leu Val Gln Val
485 490 495

Ala Glu Leu Ile Val Arg Cys Ala Met Met Arg Lys Glu Ser Arg Gly
500 505 510

Leu His Phe Thr Leu Asp Tyr Pro Glu Leu Leu Thr His Ser Gly Pro
515 520 525

Ser Ile Leu Ser Pro Gly Asn His Tyr Ile Asn Arg Ile Leu Gly Gly
530 535 540

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Leu Gln Met
545 550 555 560

Ser Val Met Phe Asp Pro Asp Thr Ala Ile Tyr Pro Phe Pro Pro Lys
565 570 575

Pro Thr Pro Leu Ser Ile Asp Glu Lys Ala Tyr Tyr Arg Glu Lys Ile
580 585 590

Lys Arg Leu Leu Lys Glu Arg Asn Ala Val Met Val Ala His Tyr Tyr
595 600 605

Thr Asp Pro Glu Ile Gln Gln Leu Ala Glu Glu Thr Gly Gly Cys Ile
610 615 620

Ser Asp Ser Leu Glu Met Ala Arg Phe Gly Ala Lys His Pro Ala Ser
625 630 635 640

Thr Leu Leu Val Ala Gly Val Arg Phe Met Gly Glu Thr Ala Lys Ile
645 650 655

Leu Ser Pro Glu Lys Thr Ile Leu Met Pro Thr Leu Gln Ala Glu Cys
660 665 670

ES 2 656 892 T3

Ser Leu Asp Leu Gly Cys Pro Val Glu Glu Phe Asn Ala Phe Cys Asp
675 680 685

Ala His Pro Asp Arg Thr Val Val Val Tyr Ala Asn Thr Ser Ala Ala
690 695 700

Val Lys Ala Arg Ala Asp Trp Val Val Thr Ser Ser Ile Ala Val Glu
705 710 715 720

Leu Ile Asp His Leu Asp Ser Leu Gly Glu Lys Ile Ile Trp Ala Pro
725 730 735

Asp Lys His Leu Gly Arg Tyr Val Gln Lys Gln Thr Gly Gly Asp Ile
740 745 750

Leu Cys Trp Gln Gly Ala Cys Ile Val His Asp Glu Phe Lys Thr Gln
755 760 765

Ala Leu Thr Arg Leu Gln Glu Glu Tyr Pro Asp Ala Ala Ile Leu Val
770 775 780

His Pro Glu Ser Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Ala Asp Ala Val Gly
785 790 795 800

Ser Thr Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ala Lys Thr Leu Pro His Gln Arg
805 810 815

Leu Ile Val Ala Thr Asp Arg Gly Ile Phe Tyr Lys Met Gln Gln Ala
820 825 830

Val Pro Asp Lys Glu Leu Leu Glu Ala Pro Thr Ala Gly Glu Gly Ala
835 840 845

Thr Cys Arg Ser Cys Ala His Cys Pro Trp Met Ala Met Asn Gly Leu
850 855 860

Gln Ala Ile Ala Glu Ala Leu Glu Gln Glu Gly Ser Asn His Glu Val
865 870 875 880

His Val Asp Glu Arg Leu Arg Glu Arg Ala Leu Val Pro Leu Asn Arg
885 890 895

Met Leu Asp Phe Ala Ala Thr Leu Arg Gly
900 905

<210> 53
<211> 910
5 <212> PRT
<213> *Escherichia coli* W3110

<220>
10 <221> PEPTIDO
<222> (1)..(910)
<223> Proteína de fusión - Aspartato oxidasa-FL4-Quinolinato sintasa

<400> 53

Met Asn Thr Leu Pro Glu His Ser Cys Asp Val Leu Ile Ile Gly Ser
1 5 10 15

Gly Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ala Leu Arg Leu Ala Asp Gln His Gln
20 25 30

15

ES 2 656 892 T3

Gly Leu Tyr Ala Ile Gly Glu Val Ser Tyr Thr Gly Leu His Gly Ala
 370 375 380
 Asn Arg Met Ala Ser Asn Ser Leu Leu Glu Cys Leu Val Tyr Gly Trp
 385 390 395 400
 Ser Ala Ala Glu Asp Ile Thr Arg Arg Met Pro Tyr Ala His Asp Ile
 405 410 415
 Ser Thr Leu Pro Pro Trp Asp Glu Ser Arg Val Glu Asn Pro Asp Glu
 420 425 430
 Arg Val Val Ile Gln His Asn Trp His Glu Leu Arg Leu Phe Met Trp
 435 440 445
 Asp Tyr Val Gly Ile Val Arg Thr Thr Lys Arg Leu Glu Arg Ala Leu
 450 455 460
 Arg Arg Ile Thr Met Leu Gln Gln Glu Ile Asp Glu Tyr Tyr Ala His
 465 470 475 480
 Phe Arg Val Ser Asn Asn Leu Leu Glu Leu Arg Asn Leu Val Gln Val
 485 490 495
 Ala Glu Leu Ile Val Arg Cys Ala Met Met Arg Lys Glu Ser Arg Gly
 500 505 510
 Leu His Phe Thr Leu Asp Tyr Pro Glu Leu Leu Thr His Ser Gly Pro
 515 520 525
 Ser Ile Leu Ser Pro Gly Asn His Tyr Ile Asn Arg Ile Leu Gly Gly
 530 535 540
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ala
 545 550 555 560
 Ala Leu Gln Met Ser Val Met Phe Asp Pro Asp Thr Ala Ile Tyr Pro
 565 570 575
 Phe Pro Pro Lys Pro Thr Pro Leu Ser Ile Asp Glu Lys Ala Tyr Tyr
 580 585 590
 Arg Glu Lys Ile Lys Arg Leu Leu Lys Glu Arg Asn Ala Val Met Val
 595 600 605
 Ala His Tyr Tyr Thr Asp Pro Glu Ile Gln Gln Leu Ala Glu Glu Thr
 610 615 620
 Gly Gly Cys Ile Ser Asp Ser Leu Glu Met Ala Arg Phe Gly Ala Lys
 625 630 635 640
 His Pro Ala Ser Thr Leu Leu Val Ala Gly Val Arg Phe Met Gly Glu
 645 650 655
 Thr Ala Lys Ile Leu Ser Pro Glu Lys Thr Ile Leu Met Pro Thr Leu
 660 665 670
 Gln Ala Glu Cys Ser Leu Asp Leu Gly Cys Pro Val Glu Glu Phe Asn
 675 680 685
 Ala Phe Cys Asp Ala His Pro Asp Arg Thr Val Val Val Tyr Ala Asn
 690 695 700

ES 2 656 892 T3

Thr Ser Ala Ala Val Lys Ala Arg Ala Asp Trp Val Val Thr Ser Ser
 705 710 715 720
 Ile Ala Val Glu Leu Ile Asp His Leu Asp Ser Leu Gly Glu Lys Ile
 725 730 735
 Ile Trp Ala Pro Asp Lys His Leu Gly Arg Tyr Val Gln Lys Gln Thr
 740 745 750
 Gly Gly Asp Ile Leu Cys Trp Gln Gly Ala Cys Ile Val His Asp Glu
 755 760 765
 Phe Lys Thr Gln Ala Leu Thr Arg Leu Gln Glu Glu Tyr Pro Asp Ala
 770 775 780
 Ala Ile Leu Val His Pro Glu Ser Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Ala
 785 790 795 800
 Asp Ala Val Gly Ser Thr Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ala Lys Thr Leu
 805 810 815
 Pro His Gln Arg Leu Ile Val Ala Thr Asp Arg Gly Ile Phe Tyr Lys
 820 825 830
 Met Gln Gln Ala Val Pro Asp Lys Glu Leu Leu Glu Ala Pro Thr Ala
 835 840 845
 Gly Glu Gly Ala Thr Cys Arg Ser Cys Ala His Cys Pro Trp Met Ala
 850 855 860
 Met Asn Gly Leu Gln Ala Ile Ala Glu Ala Leu Glu Gln Glu Gly Ser
 865 870 875 880
 Asn His Glu Val His Val Asp Glu Arg Leu Arg Glu Arg Ala Leu Val
 885 890 895
 Pro Leu Asn Arg Met Leu Asp Phe Ala Ala Thr Leu Arg Gly
 900 905 910

5 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Engarce HL1 PEPTIDO
 <400> 54

Leu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala
 1 5 10

15 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Engarce HL2 PEPTIDO
 <400> 55

ES 2 656 892 T3

Leu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala
1 5 10 15

5 <210> 56
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Engarce HL3 PEPTIDO
<400> 56

Leu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Lys Ala Ala Ala
20

15 <210> 57
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Engarce HL4 PEPTIDO
<400> 57

Leu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala
20 25

25 <210> 58
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Engarce HL5 PEPTIDO
35 <400> 58

Leu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala
20 25 30

40 <210> 59
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Engarce FL3 PEPTIDO
<400> 59

Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala
1 5 10 15

ES 2 656 892 T3

<210> 60
<211> 20
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Engarce FL4 PEPTIDO

10 <400> 60

Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala
20

<210> 61
15 <211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Engarce FL1 PEPTIDO

<400> 61

Leu Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala
1 5

25 <210> 62
<211> 12
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Engarce FL2 PEPTIDO

<400> 62

35 Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 63
40 <211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Engarce FL5 PEPTIDO

<400> 63

Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

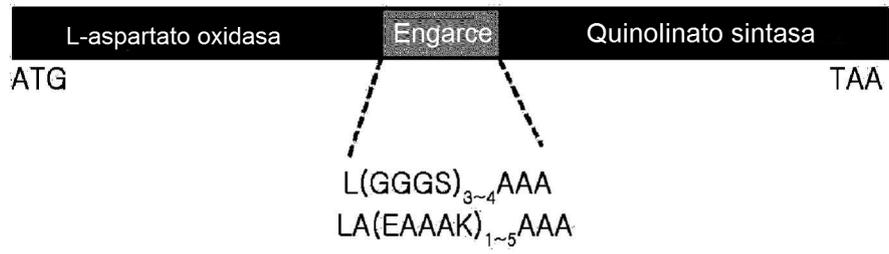
Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala
20

REIVINDICACIONES

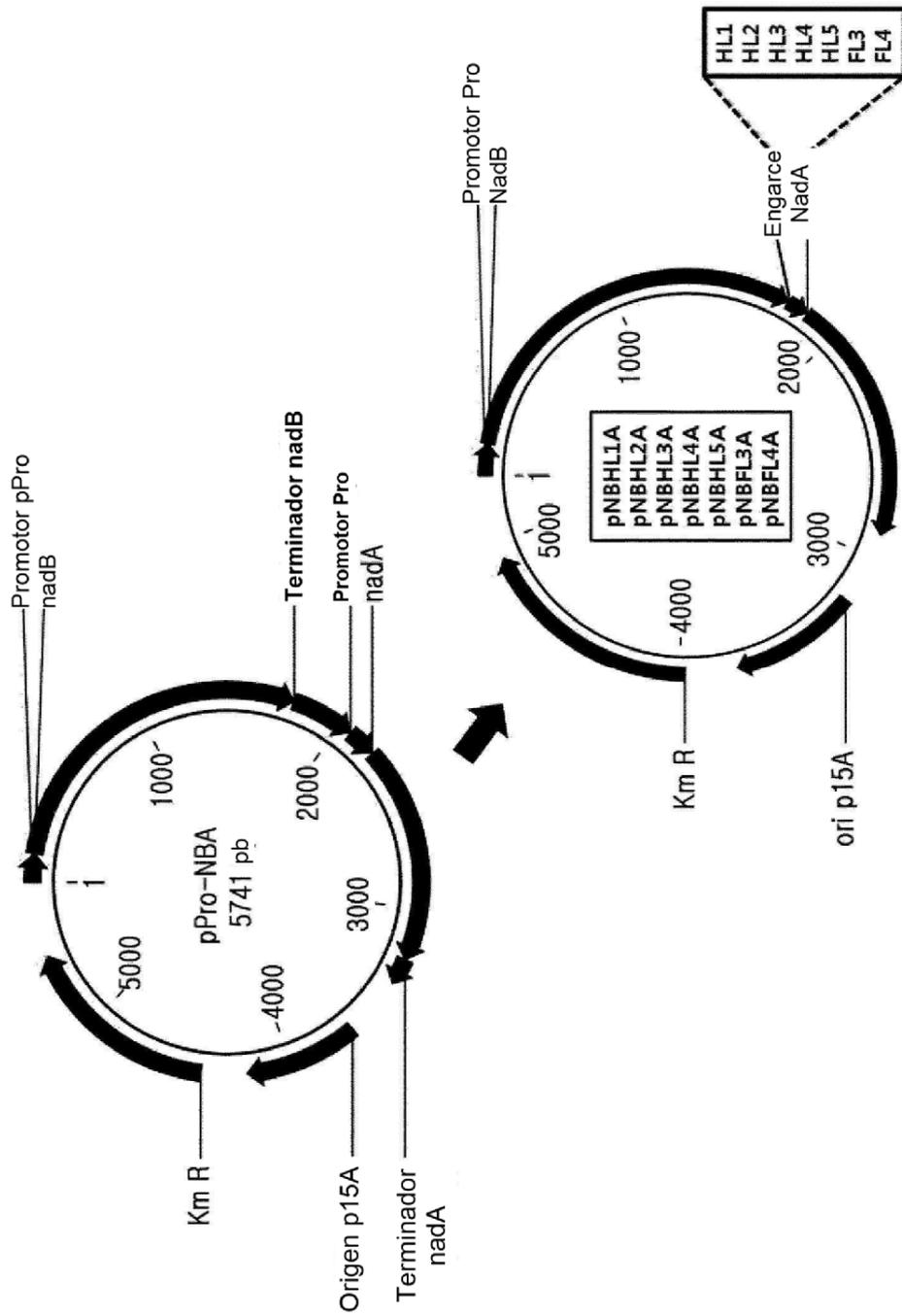
1. Un microorganismo recombinante que produce ácido quinolínico, que expresa una proteína de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidas a través de un engarce.
- 5 2. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 1, en el que L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa tienen una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 42 y SEQ ID NO. 43, respectivamente.
3. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 1, en el que el engarce se compone de 5 a 30 aminoácidos.
- 10 4. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 1, en el que el engarce tiene una secuencia de aminoácidos de LA(EAAAK)nAAA (n es un número entero de 1 a 5) o L(GGGS)nAAA (n es un número entero de 1 a 5).
5. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 1, en el que el engarce tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 60.
6. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 1, en el que la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 47, 48, 49, 50, 51, 52 y 53.
- 15 7. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 1, en el que además se debilita la actividad de quinolinato fosforibosiltransferasa, en comparación con la actividad endógena de un microorganismo nativo.
8. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 7, en el que se debilita la actividad de quinolinato fosforibosiltransferasa a través de un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en 1) delección parcial o total de un gen que codifica la enzima, 2) modificación de una secuencia de control de expresión para reducir la expresión del gen, 3) modificación de la secuencia del gen en el cromosoma para debilitar la actividad de la proteína actividad y 4) combinaciones de los mismos.
- 20 9. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 1, en el que se potencian además las actividades de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en fosfoenolpiruvato carboxilasa, L-aspartato aminotransferasa y la proteína de fusión.
- 25 10. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 9, en el que se potencia la actividad de la proteína a través de un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en 1) aumentar el número de copias del gen que codifica la enzima, 2) modificar una secuencia de control de la expresión para aumentar la expresión del gen, 3) modificar la secuencia del gen en el cromosoma para potenciar la actividad de la enzima y 4) combinaciones de los mismos.
- 30 11. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 1, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Erterbacter* sp., *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp. y *Brevibacterium* sp.
12. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 1, en el que el microorganismo es *E.coli*.
- 35 13. El microorganismo recombinante de acuerdo con reivindicación 1, en el que el microorganismo se identifica por el No. de acceso KCCM11235P o KCCM11236P.
14. Un procedimiento para producir ácido quinolínico, que comprende:
 - (a) cultivo de un microorganismo recombinante que expresa una proteína de fusión de L-aspartato oxidasa y quinolinato sintasa unidas a través de un engarce en un medio que comprende una fuente de carbono; y
 - (b) recuperación de ácido quinolínico producido durante el cultivo.

40

[FIG. 1]



[FIG. 2]



[FIG. 3]

