

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 445**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21	(2006.01) C12N 15/63	(2006.01)
C12N 9/02	(2006.01) C12N 15/70	(2006.01)
C12N 9/04	(2006.01) C07K 14/245	(2006.01)
C12N 9/06	(2006.01) C12P 7/44	(2006.01)
C12N 9/10	(2006.01)	
C12N 9/88	(2006.01)	
C12N 15/52	(2006.01)	
C12N 15/53	(2006.01)	
C12N 15/54	(2006.01)	
C12N 15/60	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2013 PCT/US2013/023690**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13116244**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2013 E 13743123 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2809771**

54 Título: **Producción de ácido mucónico a partir de microorganismos modificados genéticamente**

30 Prioridad:

30.01.2012 US 201261632777 P

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

12.04.2018

73 Titular/es:

**MYRIANT CORPORATION (100.0%)
66 Cummings Park
Woburn, MA 01801, US**

72 Inventor/es:

**YOCUM, R., ROGERS;
GONG, WEI;
DOLE, SUDHANSHU;
SILLERS, RYAN;
GANDHI, MEGHAL;
PERO, JANICE, G. y
SPENCER, MICHELLE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 663 445 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

Producción de ácido mucónico a partir de microorganismos modificados genéticamente

La presente invención se encuentra en el campo de la producción de materias primas químicas renovables utilizando biocatalizadores que han sido modificados genéticamente para aumentar su capacidad de convertir recursos de carbono renovables en compuestos útiles. Más específicamente, la presente invención proporciona un microorganismo modificado genéticamente que produce ácido *cis,cis*-mucónico a partir de una fuente de carbono no aromática, que comprende un gen que codifica una enzima shikimato deshidrogenasa con pérdida de función parcial "leaky", en donde dicha enzima shikimato deshidrogenasa con pérdida de función parcial confiere prototrofia para aminoácidos y vitaminas aromáticos, pero sin conducir a una secreción significativa de compuestos aromáticos.

El ácido adípico es un producto químico de gran volumen utilizado en la fabricación de Nylon 66. Actualmente, el ácido adípico se prepara a partir de productos petroquímicos, pero la síntesis no es respetuosa con el medio ambiente (Niu et al., 2002). Alternativamente, el ácido adípico puede prepararse a partir de cualquiera de los tres isómeros del ácido mucónico (*cis,cis*; *cis,trans*; *trans,trans*) mediante hidrogenación química. Sería deseable producir ácido mucónico a partir de recursos renovables por fermentación con un microorganismo, seguido de hidrogenación a ácido adípico, ya que tal ruta al ácido adípico sería más ecológica que la ruta petroquímica tradicional.

Los esfuerzos actuales hacia la producción microbiana de ácido mucónico se pueden agrupar bajo tres categorías, a saber: (1) Una ruta de degradación aromática para la producción de ácido mucónico, en la que se alimentan varios compuestos aromáticos y la porción de anillo benceno de los compuestos aromáticos se abre mediante escisión oxidativa; (2) Una ruta de acumulación de muconato, en la que la cadena principal de ácido mucónico se forma a partir de diversos compuestos C2, C3, C4 o lisina; y (3) Una ruta de ácido mucónico biosintético de aminoácidos aromáticos, en la que el ácido mucónico se construye a partir de 3-deshidroshikimato, un intermedio en la ruta biosintética de aminoácidos aromáticos en muchos organismos.

Muchos microorganismos son capaces de degradar compuestos aromáticos que contienen un anillo de benceno, tales como fenol, catecol y ácido benzoico, utilizando vías que escinden el anillo aromático para proporcionar compuestos terminales o intermedios que son compuestos no aromáticos tales como el ácido *cis,cis*-mucónico, o el ácido 3-carboxi-*cis,cis*-mucónico (Niu et al., 2002; Pérez-Pantoja et al., 2008). En el pasado, varios grupos han intentado explotar esta capacidad de los microbios en la producción de ácido *cis,cis*-mucónico a nivel industrial (Mizuno et al., 1988; Yoshikawa et al., 1990; Choi et al., 1997). A finales de la década de 1980, Celgene Corporation de EE. UU. y Mitsubishi Chemical Industries de Japón participaron activamente en el desarrollo de un procedimiento para fabricar ácido mucónico a partir de tolueno y ácido benzoico, respectivamente, como lo demuestran varias patentes de Estados Unidos y Japón concedidas en esta área.

Se ha informado que varios organismos microbianos producen ácido *cis,cis*-mucónico utilizando tolueno, ácido benzoico, benceno o catecol. Por ejemplo, con el catecol como fuente de carbono, se puede lograr la producción de ácido *cis,cis*-mucónico con un rendimiento de conversión casi 100% molar utilizando células de *E. coli* recombinantes que expresan el gen *catA*, que codifica la catecol 1,2-dioxigenasa mt-2 de *Pseudomonas putida* responsable de catalizar la escisión en posición orto de catecol, como biocatalizador (Kaneko et al., 2011). Se han descrito biorreactores para la producción continua de ácido mucónico utilizando este sistema.

Este enfoque de producción microbiana de ácido *cis,cis*-mucónico utilizando compuestos de carbono C6 cíclicos nunca se convirtió en una realidad comercial; sin embargo, ha habido un interés académico continuo en la comprensión del funcionamiento de las enzimas en la ruta de degradación para la producción de ácido mucónico en microbios.

Una solicitud de patente internacional publicada recientemente (WO 2011/017560) reivindica biocatalizadores que tienen una ruta de muconato y un método para producir ácido mucónico utilizando estos biocatalizadores. En resumen, esta solicitud de patente publicada describe cuatro vías diferentes para producir ácido mucónico. La primera ruta para la producción de ácido mucónico comienza con succinil-CoA y acetil-CoA. La segunda ruta para la producción de ácido mucónico comienza con semialdehído piruvato y malonato. La tercera ruta para la producción de ácido mucónico comienza con piruvato y semialdehído succínico. La cuarta ruta para la producción de ácido mucónico comienza con la lisina. Todas estas vías para la producción de ácido mucónico propuestas en esta solicitud de patente se basan en el modelado informático y aún no se ha visto si tales biocatalizadores se podrían crear alguna vez con una productividad y rendimiento comercialmente aceptables para el ácido mucónico.

Una ruta de fermentación hacia el ácido *cis,cis*-mucónico utilizando un sistema de *E. coli* modificado genéticamente ha sido descrita en la bibliografía científica (Niu et al., 2002) y en la bibliografía de patentes (documento US 5.616.496; US 5.487.987; WO 2011/085311 A1), pero los procedimientos de la técnica anterior deben mejorarse sustancialmente con respecto al título, el rendimiento y la idoneidad para la producción comercial a gran escala para que sean económicamente atractivos. Ha habido dos informes de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* que fueron modificadas genéticamente para producir ácido *cis,cis*-mucónico a partir de glucosa, pero los títulos

publicados fueron solo de 1,5 mg/L y 140 mg/L (Weber et al., 2012; Curran et al., 2012). Con estos títulos, ninguno de estos procedimientos con levadura sería atractivo para la producción comercial. En la presente memoria se describe un procedimiento para producir ácido *cis,cis*-mucónico o ácido *cis,trans*-mucónico, mediante fermentación que se mejora sustancialmente en comparación con los procedimientos publicados bien conocidos en la técnica con respecto a la idoneidad para la producción comercial a gran escala.

Uno de los objetivos de la invención descrita aquí es producir ácido *cis,cis*-mucónico por fermentación de un microorganismo partiendo de una fuente de carbono no aromática, renovable, tal como un azúcar u otro compuesto de carbono simple que puede derivarse de plantas fotosintéticas, utilizando un organismo modificado genéticamente que sea adecuado para la producción comercial a gran escala.

En 2002, Niu et al. publicaron una ruta "libre de benceno" para producir ácido adípico que utilizaba un procedimiento de fermentación para producir ácido *cis,cis*-mucónico y a continuación un procedimiento químico catalítico para convertir el ácido *cis,cis*-mucónico en ácido adípico. Este procedimiento fue patentado, pero por lo que saben los presentes inventores, este procedimiento no ha sido comercializado, (documentos US 5.487.987; US 5.616.496). La porción de fermentación de este procedimiento publicado utilizó cepas modificadas genéticamente de *E. coli*, el mejor de las cuales fue denominada WN1/pWN2.248. La ruta utiliza una porción de la ruta biosintética del aminoácido aromático nativo (también conocida como la "vía del ácido shikímico", la "vía del shikimato", la "vía del corismato", la "vía aromática común", la "vía aromática central", o simplemente la "vía aromática", parte de la cual se ilustra en la Figura 1. En esta memoria descriptiva, se considera que cualquier etapa bioquímica aguas abajo de una fuente de carbono alimentada a un organismo, por ejemplo glucosa, y que conduce directa o indirectamente al corismato es parte de la ruta del ácido shikímico, incluyendo, por ejemplo, las etapas catalizadas por Glf, Glk, Zwf, TktA, TalB y Pps. Además, el procedimiento publicado utiliza tres enzimas heterólogas que convierten el 3-deshidroshikimato (un intermediario en la ruta aromática) al ácido *cis,cis*-mucónico a través de los intermediarios protocatecuato y catecol. La cepa anfitriona modificada genéticamente es un derivado de *E. coli* K-12 que tiene un genotipo de *aroE353*, *serA::(aroB, aroZ)*, *lacZ::(tktA, aroZ)*, donde *aroB* codifica la 3-deshidroquinato sintasa (en lo sucesivo denominada AroB), *tktA* codifica transcetolasa, y *aroZ* es un gen heterólogo de *Klebsiella pneumoniae* que codifica 3-deshidroshikimato deshidrogenasa (denominada en lo sucesivo "AroZ"). La cepa diseñada contiene un plásmido multicopia, pWN2.248, que deriva de pBR322 y contiene casetes de genes para expresar *catA*, *catX*, *aroY*, *aroF* (resistente a la retroalimentación), *serA*, *lacI^q*, y resistencia a la ampicilina. Los genes heterólogos *catA* y *catX* eran de *Acinetobacter calcoaceticus* y codifican catecol 1,2-dioxigenasa (denominada en lo sucesivo "CatA") y una proteína ("CatX") de función desconocida que podría potenciar la actividad de CatA. En la bibliografía, el gen *catX* también se denomina "orfI" (Neidle y Ornston, 1986). En esta memoria descriptiva de patente, los autores de la presente invención se referirán al par de genes *catA* más *catX* de *Acinetobacter* como "*catAX*". El gen heterólogo *aroY* era de *Klebsiella pneumoniae* y codifica protocatecuato descarboxilasa (denominado en lo sucesivo "AroY").

Se ha publicado una solicitud de patente más reciente, relacionada con las patentes expedidas anteriormente, (documento WO 2011/085311 A1) En esta solicitud, se usó la misma cepa mencionada anteriormente, WN1/pWN2.248, para producir ácido *cis,cis*-mucónico, que a continuación se isomerizó a ácido *cis,trans*-mucónico,

Sin embargo, la cepa WN1/pWN2.248 no es adecuada para la producción comercial a gran escala, por lo que es necesario un procedimiento mucho mejor. La presente invención proporciona biocatalizadores mejorados para la producción fermentativa de ácido *cis,cis*-mucónico.

El procedimiento descrito en el documento WO 2011/085311 A1 tiene muchas otras características que lo hacen poco práctico para la implementación a gran escala comercial. La mutación *aroE353* que se incluyó en el biocatalizador WN1/pWN2.248 utilizado en la producción fermentativa de funciones de ácido *cis,cis*-mucónico para bloquear el flujo de carbono en la parte inferior de la ruta de shikimato para maximizar el flujo a la ruta deseada a ácido *cis,cis*-mucónico. Sin embargo, la mutación *aroE* es una mutación "nula" (una mutación que hace que el gen sea inactivo para todos los fines prácticos), que tiene el efecto de convertir la cepa en un auxótrofo para los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y vitaminas aromáticas o intermediarios de tipo vitamina preparados a partir de la ruta del shikimato (ácido p-hidroxibenzoico, ácido p-aminobenzoico y ácido 2,3-dihidroxibenzoico). Los aminoácidos aromáticos son relativamente costosos, y su requerimiento añadiría una gran carga al coste de producir ácido *cis,cis*-mucónico. Por lo tanto, también existe la necesidad de un procedimiento que no requiera la adición de estos costosos nutrientes al medio de crecimiento.

Otro problema más asociado con el biocatalizador actualmente disponible para la producción de ácido *cis,cis*-mucónico está relacionado con la necesidad de mantener un plásmido multicopia para expresar algunos de los genes necesarios (Niu et al., 2002). Los plásmidos multicopia a menudo son demasiado inestables para ser utilizados en procedimientos industriales a gran escala. Además, al menos uno de los genes en los plásmidos se expresa a partir de un promotor, *P_{tac}*, que requiere isopropiltiogalactósido (IPTG) o lactosa para la inducción, y esos dos productos químicos son demasiado costosos para permitir un procedimiento económicamente atractivo. Por lo tanto, existe una necesidad de cepas más estables que tengan casetes de expresión integrados de manera estable en el cromosoma de la cepa de producción, y existe la necesidad de altos niveles de expresión de promotores constitutivos para aliviar la necesidad de inductores químicos para los promotores.

La presente invención se refiere a los siguientes artículos:

1. Un microorganismo modificado genéticamente que produce ácido cis,cis-mucónico a partir de una fuente de carbono no aromático, que comprende un gen que codifica una enzima shikimato deshidrogenasa, en donde dicha enzima shikimato deshidrogenasa con pérdida de función parcial confiere prototrofia a los aminoácidos aromáticos y vitaminas, pero sin conducir a una secreción significativa de compuestos aromáticos.

2. Un microorganismo modificado genéticamente como en el apartado 1, en donde dicho microorganismo modificado genéticamente es una bacteria.

3. Un microorganismo modificado genéticamente como en el apartado 1, en donde dicho microorganismo modificado genéticamente es *Escherichia coli*.

4. Un microorganismo modificado genéticamente como en el apartado 1, que comprende adicionalmente uno o más genes exógenos seleccionados de un grupo que consiste en *aroZ*, *qa-4*, *asbF*, *aroY*, *quiC* y *catAX*, en donde dichos genes exógenos codifican proteínas funcionales en una ruta del ácido mucónico.

5. Un microorganismo modificado genéticamente como en el apartado 1, que comprende adicionalmente uno o más genes exógenos seleccionados de un grupo que consiste en *aroB*, *aroD*, *aroF*, *aroG*, *aroH*, *tktA*, *talB*, *rpe*, y *rpi*, donde dichos genes exógenos codifican proteínas funcionales en una ruta del ácido shikímico.

6. Un microorganismo modificado genéticamente como en el apartado 1, en donde la actividad de una proteína reguladora negativa de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos codificada por un gen *tyrR* o su homólogo se reduce o elimina sustancialmente.

7. Un microorganismo modificado genéticamente como en el apartado 1, que comprende adicionalmente un gen *aroG** que codifica una enzima DAHP sintasa que es sustancialmente resistente a la inhibición por fenilalanina.

8. Un organismo modificado genéticamente del apartado 7, que comprende un gen *aroG** que codifica una enzima DAHP sintasa que se selecciona de un grupo que consiste en *aroG*20-893*, *AroG*20-897*, *aroG*20-899*, *agog*20-901*, *aroG*111*, *agog*211*, *agog*272*, *aroG*311*, *aroG*312*, *aroG*411*, *aroG*412*, y *aroG*511*.

La presente invención proporciona microorganismos modificados por ingeniería genética que producen ácido cis,cis-mucónico a partir de fuentes de carbono no aromáticas de acuerdo con el apartado 1 anterior. Los microorganismos modificados genéticamente no necesitan contener plásmidos exógenos para producir ácido mucónico, aunque tienen ciertos genes exógenos o heterólogos necesarios para lograr el fenotipo deseado. Los genes exógenos introducidos en los microorganismos se integran de forma estable en el ADN cromosómico. Como resultado de esta integración en el ADN cromosómico de los genes exógenos, se elimina por completo la necesidad del uso de antibióticos u otros métodos selectivos para mantener los plásmidos que portan ADN exógeno. Además, se utilizan promotores fuertes que no requieren inductores químicos para expresar los genes necesarios para la ruta desde la fuente de carbono, tal como glucosa, a ácido cis,cis-mucónico.

En una realización de la presente invención, se modifica genéticamente la actividad de un regulador negativo de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. En un aspecto de la presente invención, la actividad del regulador negativo TyrR se reduce sustancialmente mediante el control de la expresión del gen *tyrR* que codifica la proteína TyrR. En otro aspecto de la presente invención, la actividad del regulador negativo TyrR se elimina por completo eliminando o inactivando el *tyrR* gen del ADN cromosómico del microorganismo.

En otra realización de la presente invención, la inhibición por retroalimentación de ciertas enzimas en la ruta de aminoácidos aromáticos debido a ciertos metabolitos se supera mediante manipulaciones genéticas. En la mayoría de las cepas de *E. coli* de tipo salvaje, desoxiarabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) sintasa se produce en forma de tres diferentes isozimas que se sabe que están codificadas por tres genes diferentes, a saber *aroG*, *aroF* y *aroH*. Las proteínas codificadas por cada uno de estos tres genes están sujetas a la inhibición por retroalimentación de uno o más metabolitos de la ruta del ácido shikímico responsable de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. En un aspecto de la presente invención, el gen *aroG* de tipo salvaje es reemplazado por un gen *aroG* modificado que codifica una proteína AroG que es resistente a la inhibición por retroalimentación por uno o más metabolitos de la ruta de aminoácidos aromáticos dentro de la célula microbiana. En otro aspecto de la presente invención, el gen *aroF* de tipo salvaje es reemplazado por un gen *aroF* que codifica una proteína AroF que es resistente a la inhibición por retroalimentación por uno o más metabolitos de la ruta de aminoácidos aromáticos dentro de la célula microbiana. En otro aspecto más de la presente invención, el gen *aroH* de tipo salvaje es reemplazado por un gen *aroH* que codifica una proteína AroH que es resistente a la inhibición por retroalimentación por uno o más metabolitos de la ruta de aminoácidos aromáticos dentro de la célula microbiana. En otra realización más de la presente invención, el biocatalizador seleccionado para la producción comercial de ácido cis,cis-mucónico puede tener más de una isozima resistente a la retroalimentación para desoxiarabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) sintasa.

En otra realización de la presente invención, se potencia la actividad de una o más de las enzimas implicadas en el flujo de carbono a través de la ruta de aminoácidos aromáticos dentro de la célula microbiana. En un aspecto de la presente invención, la mejora de la actividad de una o más enzimas implicadas en el funcionamiento de una ruta de aminoácidos aromáticos y/o una ruta del ácido mucónico se lleva a cabo mediante manipulación genética. En una realización preferida de la presente invención, se potencia la expresión de uno o más de los genes que codifican enzimas o proteínas AroF, AroG, AroH, AroB, TktA, TalB, AroZ, QutC, qa-4, asbF, QuiC, AroY, Rpe, Rpi, Pps, CatA y CatX o sus homólogos o análogos dando lugar al aumento de actividad de dichas enzimas. Rpe es una ribulosa-5-fosfato epimerasa, Rpi es una ribulosa-5-fosfato isomerasa, y Pps es una fosfoenol piruvato sintetasa ((Neidhardt y Curtiss, 1996). Si la cepa anfitriona es una levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, o un hongo filamentoso, por ejemplo, *Neurospora crassa*, varias de las enzimas que catalizan reacciones en la ruta del shikimato se pueden combinar en una gran proteína o polipéptido, denominados Aro1p, codificados por el gen ARO1 en el caso de *S. cerevisiae*. Aro1p combina las funciones de AroB, AroD, AroE, AroK (o AroL) y AroA). Como tal, para los propósitos de esta invención, Aro1p, y ARO1, o una porción de los mismos, se pueden usar como un sustituto, o además de, AroB, AroD, AroE, AroK, y/o AroA.

En otra realización más de la presente invención, el flujo a través de la eritrosa-4-fosfato dentro de la célula bacteriana se potencia por medio de enzimas que expresan en exceso en el funcionamiento de la ruta de la pentosa fosfato. En un aspecto de la presente invención se modifica genéticamente la producción en exceso de la enzima transaldolasa codificada por el gen *talB* o *talA*. En otro aspecto de la presente invención, la expresión de los genes que codifican ambas enzimas transaldolasa y transcetolasa se potencia mediante manipulaciones genéticas. En otro aspecto más de la presente invención, la expresión de los genes que codifican cualquiera o ambas ribulosa-5-fosfato epimerasa y ribulosa-5-fosfato isomerasa se potencia mediante manipulaciones genéticas.

En otra realización de la presente invención, la PEP (fosfoenol piruvato) disponible para el funcionamiento de la ruta de aminoácidos aromáticos se incrementa a través de la manipulación genética. En un aspecto de la presente invención, la competición por la reserva de PEP disminuye por eliminación y/o complementación del sistema de fosfotransferasa (PTS) dependiente de PEP para la captación de glucosa con un sistema independiente de PEP para la captación de glucosa. En otra realización más de la presente invención, la disponibilidad de PEP aumenta al aumentar la expresión de un gen que codifica una PEP sintetasa, tal como *pps*.

Las figuras muestran:

FIG. 1. Vía para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en *E. coli*.

FIG. 2. Vía para la producción de ácido mucónico en *E. coli*.

FIG. 3. Cromatografía que muestra los patrones utilizados para el análisis de HPLC de ácido mucónico total e intermedios bioquímicos.

FIG. 4. Cromatografía que muestra los estándares utilizados para el análisis por HPLC de isómeros de ácido mucónico.

FIG. 5. Título para la producción de DHS en la cepa MYR34 de *E. coli* transformada con plásmidos pCP32AMP, pCP14 y pCP54. La cepa MYR34 de *E. coli* tiene una delección en el gen *aroE*. El plásmido pCP32AMP expresa el gen *aroG* que codifica la DAHP sintasa. El plásmido pCP14 expresa el gen *aroB* que codifica DHQ sintasa. El plásmido pCP54 expresa ambos genes *aroB* y *aroG*.

FIG. 6. Título para la producción de DHS en las cepas MYR34 y MYR170 de *E. coli* transformadas con plásmidos pCP32AMP y pCP54. La variedad MYR34 de *E. coli* tiene una delección del gen *aroE*. La cepa MYR170 tiene una delección del gen *aroE* y una segunda copia del gen *aroB* bajo el control del promotor P₁₅ integrado en el locus *ack* del ADN cromosómico del anfitrión. El plásmido pCP32AMP expresa el gen *aroG* que codifica la DAHP sintasa. El plásmido pCP54 expresa ambos genes *aroB* y *aroG*.

FIG. 7. Título para la producción de ácido cis,cis-mucónico en las cepas MYR34 y MYR170 de *E. coli* transformadas con el plásmido pMG37 solo o con ambos plásmidos pMG37 y pCP32AMP. La cepa MYR34 de *E. coli* tiene una delección del gen *aroE*. La cepa MYR170 tiene una delección del gen *aroE* y una segunda copia del gen *aroB* bajo el control del promotor P₁₅ integrado en el locus *ack* del ADN cromosómico del anfitrión. El plásmido pCP32AMP expresa el gen *aroB* que codifica la DAHP sintasa. El plásmido pMG37 expresa los genes *aroZ*, *aroY*, y *catAX*, que codifican proteínas funcionales en la ruta del ácido mucónico.

FIG. 8. Título para la producción de DHS en la cepa MYR170 de *E. coli* transformada con un plásmido que expresa el gen *aroG* solo (pCP32AMP) o los genes *aroG* y *tktA* simultáneamente (pCP50). La cepa MYR170 tiene una delección del gen *aroE* y una segunda copia del gen *aroB* bajo el control del promotor P₁₅ integrado en el locus *ack* del ADN cromosómico del anfitrión.

FIG. 9. Rendimiento de DHS de las tinciones MYR34 y MYR170 de *E. coli* transformada con plásmidos pCP32AMP y pCP50. El rendimiento de DHS se calcula como gramos de DHS producidos por gramo de glucosa consumida. El plásmido pCP32AMP expresa el gen *aroG* mientras que pCP50 expresa *aroG* y *tktA*. La

cepa bacteriana MYR34 tiene una delección en el gen *aroE*. La cepa MYR170 de *E. coli* se obtiene de MYR34 y tiene un gen *aroB* adicional integrado en el locus *ack* en el ADN cromosómico.

FIG. 10. Título de DHS de las cepas MYR170 y MYR261 de *E. coli* transformada con plásmidos pCP32AMP y pCP50. El plásmido pCP32AMP expresa el gen *aroG*, mientras que pCP50 expresa los genes *aroB* y *tktA*. La cepa MYR170 tiene una delección del gen *aroE* y una segunda copia del gen *aroB* bajo el control del promotor P_{15} integrado en el locus *ack* del ADN cromosómico del anfitrión. La cepa MYR261 de *E. coli* se obtiene de la cepa MYR170 de *E. coli*. La cepa MYR261 de *E. coli* tiene una segunda copia del gen *tktA* con su promotor nativo integrado en el locus *poxB* del ADN cromosómico.

FIG. 11. Producción de ácido mucónico y ácido acético en cepas MYR170, MYR261 y MYR305 de *E. coli* transformadas con el plásmido pCP32AMP que expresa *aroG* que codifica DAHP sintasa en la ruta biosintética del ácido shikímico el plásmido pMG37 que expresa los genes *aroZ*, *aroY* y *catAX* que codifican proteínas funcionales en la ruta del ácido mucónico. La cepa MYR170 tiene una delección en el gen *aroE* y una copia adicional del gen *aroB* bajo el control del promotor P_{15} insertado en locus *ack* en el ADN cromosómico del anfitrión. MYR261 y MYR305 son derivados de la cepa MYR170. MYR261 tiene una copia adicional de gen *tktA* integrado en el locus *poxB* en el ADN cromosómico del anfitrión, mientras que MYR305 tiene una delección en el locus *poxB* en el ADN cromosómico del anfitrión.

FIG. 12. Conversión de DHS endógeno producido por la cepa MYR34 de *E. coli* en ácido mucónico. La cepa MYR34 de *E. coli* tiene una delección en el gen *aroE* que codifica shikimato deshidrogenasa. Como resultado, hay una acumulación de DHS. Cuando la cepa MYR34 se transforma con un plásmido que expresa *aroZ*, *aroY* y *catAX*, los genes que codifican proteínas funcionales en la ruta del ácido mucónico, hay conversión de DHS en ácido mucónico. Sin embargo, no se produce conversión de DHS en ácido mucónico cuando la cepa MYR34 es transformada con el vector plasmídico vacío (pCL1921) sin ningún gen exógeno.

FIG.13. Comparación de homólogos de *AroZ* por su capacidad para desviar DHS en la ruta del ácido mucónico. Se clonaron tres diferentes homólogos de *aroZ*, a saber *quiC* de *Acinetobacter sp. ADP1*, *asbF* de *Bacillus thuringiensis*, y *qa-4* de *Neurospora crassa* bajo el promotor P_{26} en un plásmido de bajo número de copias que también expresaba los genes *catAX* y *aroY* de los promotores P_{15} y λP_R respectivamente. Estas tres construcciones de plásmidos diferentes se expresaron en MYR34 mediante transformación y se midió la cantidad de ácido mucónico producido.

FIG. 14. Copias únicas de *catAX*, *aroY* y *quiC* se integraron cromosómicamente en la cepa MYR170 de *E. coli* ($\Delta aroE$, $\Delta ack::P_{15}-aroB$) dando como resultado MYR352 (SEQ ID No. 41). MYR170 también se transformó con plásmido pMG37 de bajo número de copias que portaba todos los genes necesarios para el funcionamiento de la ruta del ácido mucónico que conduce a la cepa MYR219. Tanto MYR352 como MYR219 se transformaron con YEp24 (vector vacío de número de copias medio) o pCP32AMP (plásmido que expresa *aroG* de número de copias medio) o pCP50 (plásmido que expresa *aroG* y *tktA* de número de copias medio) y la cantidad de PCA, catecol y ácido mucónico producidos se cuantificaron utilizando el método de HPLC.

FIG. 15. Eliminación de la acumulación de catecol en MYR352 mediante el aumento de la expresión de *catAX*. MYR352 se transformó con un plásmido que expresaba *aroY* solo (pMG27) o un plásmido que expresaba *quiC* solo (pMG39) o un plásmido que expresaba los tres genes de la ruta del ácido mucónico a saber *catAX*, *aroY* y *quiC* (pMG37) o un plásmido que expresaba solo dos genes en la ruta del ácido mucónico a saber *catAX* y *aroY* (pMG33). La expresión en exceso de *catAX* solo fue suficiente para evitar la acumulación de catecol.

FIG. 16. Crecimiento de cepas utilizando diferentes sistemas para importar glucosa. La delección de *ptsHI* y *galP* (MYR31) conduce a la falta de crecimiento en medio mínimo de glucosa, mientras que la instalación de genes *glf* y *glk* (MYR217) devuelve el crecimiento. La cepa de control MYR34 es $\Delta aroE$, pero por otra parte de tipo salvaje. Los tres aminoácidos aromáticos y tres vitaminas aromáticas se añadieron al medio para permitir el crecimiento de las cepas auxótrofas.

FIG. 17. Producción de DHS en cepas MYR34 y MYR217 de *E. coli*. Cuando se transformó con plásmidos que conducen a la producción de DHS, MYR217, que utiliza *glf-glk* para la importación de glucosa, produjo un título más alto de DHS que los transformantes de MYR34, que utiliza el sistema de fosfotransferasa (PTS).

FIG. 18. Producción de ácido mucónico por la cepa MYR428 de *E. coli* en un fermentador de 7 litros. La cepa MYR261 de *E. coli* con un genotipo de $\Delta aroE \Delta ackA::PAG_{15}-aroB \Delta poxB aktA$ se transformó con los plásmidos pCP32AMP y pMG37 para generar la cepa MYR428 de *E. coli*.

Según se utiliza en esta solicitud de patente, la frase "por ejemplo" o "tal como" pretende indicar que hay más de un método, enfoque, solución o composición de la materia para el tema en cuestión, y no se pretende que el ejemplo proporcionado se limite a ese ejemplo.

El término "heterólogo" se refiere a un gen o proteína que no se encuentra de forma natural o nativa en un organismo, pero que puede introducirse en un organismo mediante ingeniería genética, tal como mediante

transformación, apareamiento o transducción. Un gen heterólogo puede integrarse (insertarse) en un cromosoma o estar contenido en un plásmido. El término "exógeno" se refiere a un gen o proteína que se ha introducido o alterado en un organismo con el fin de aumentar, disminuir o eliminar una actividad mediante ingeniería genética, tal como mediante transformación, apareamiento, transducción o mutagénesis. Un gen o proteína exógenos pueden ser heterólogos, o pueden ser un gen o proteína que son nativo del organismo anfitrión, pero alterado por uno o más métodos, por ejemplo, mutación, delección, cambio de promotor, cambio de terminador, duplicación, o la inserción de una o más copias adicionales en el cromosoma o en un plásmido. Así, por ejemplo, si se inserta una segunda copia del gen *aroB* en un sitio en el cromosoma que es distinto del sitio nativo, la segunda copia sería exógena.

El término "microorganismo" según se utiliza en la presente invención incluye bacterias, arqueas, levaduras, algas y hongos filamentosos que pueden usarse para la producción comercial de ácido cis,cis-mucónico a través de un procedimiento de fermentación.

Para la nomenclatura, un gen o región codificante suele nombrarse con letras minúsculas en cursiva, por ejemplo "aroZ", mientras que la enzima o proteína codificada por un gen puede nombrarse con las mismas letras, pero con la primera letra en mayúscula y sin cursivas, por ejemplo "AroZ" o "Aro1p", el último de los cuales es un ejemplo de la convención utilizada en levaduras para designar una enzima o proteína. La "p" es una abreviatura de proteína, codificada por el gen designado. La enzima o proteína también se puede denominar con un nombre más descriptivo, por ejemplo, AroZ también se puede denominar 3-deshidroxishikimato deshidratasa. Un gen o región codificante que codifica un ejemplo de una enzima que tiene una actividad catalítica particular puede tener varios nombres diferentes debido a orígenes históricamente diferentes, o debido a que el gen proviene de diferentes especies. Por ejemplo, el gen que codifica la 3-deshidroxishikimato deshidratasa de *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus Anthracis* puede ser denominado *asbF* en lugar de *aroZ*, el gen relacionado de *Aspergillus nidulans* puede ser denominado *qutC*, el gen relacionado de *Neurospora crassa* puede ser denominado *qa-4*, y el gen relacionado de *Acinetobacter baylyi* (también conocido como *Acinetobacter calcoaceticus* y *Acinetobacter* Sp. ADP1) puede ser denominado *quiC*.

Un "plásmido" significa una molécula de ADN circular o lineal que es sustancialmente más pequeña que un cromosoma, separada del cromosoma o cromosomas de un microorganismo, y que se replica por separado del cromosoma o los cromosomas. Un "plásmido" puede estar presente en aproximadamente una copia por célula o en más de una copia por célula. El mantenimiento de un plásmido dentro de una célula microbiana en general requiere una selección con antibiótico, pero también se puede usar la complementación de una auxotrofia.

El término "cromosoma" o "ADN cromosómico" según se utiliza en esta invención en el contexto de una célula bacteriana es una molécula circular de ADN que es sustancialmente más grande que un plásmido y no requiere ninguna selección con antibióticos.

Un "casete de expresión" significa una secuencia de ADN que puede ser parte de un cromosoma o plásmido que contiene al menos un promotor y un gen o región que codifica una enzima u otra proteína, de modo que la región codificante es expresada por el promotor y la enzima o proteína es producida por una célula anfitriona que contiene la secuencia de ADN. Un "casete de expresión" puede ser al menos parcialmente sintético, o construirse por métodos de ingeniería genética, de modo que la región codificante se expresa a partir de un promotor que no está asociado de forma natural con la región codificante. Opcionalmente, el "casete de expresión" puede contener un terminador de la transcripción que puede ser o no un terminador que está asociado de forma natural con la región codificante. Un "casete de expresión" puede tener regiones codificantes para más de una proteína, en cuyo caso puede denominarse operón, o un operón sintético.

"Expresión en exceso" de un gen o región codificante significa hacer que la enzima o proteína codificada por ese gen o región codificante se produzca en un microorganismo anfitrión a un nivel que es más alto que el nivel encontrado en la versión de tipo salvaje del microorganismo anfitrión bajo condiciones de crecimiento iguales o similares. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante uno o más de los siguientes métodos: 1) instalar un promotor más fuerte, 2) instalar un sitio de unión al ribosoma más fuerte, tal como una secuencia de ADN 5'-AGGAGG, situada entre cuatro y diez bases aguas arriba del codón de inicio de la traducción, 3) instalar un terminador o un terminador más fuerte, 4) mejorar la elección de codones en uno o más sitios en la región codificante, 5) mejorar la estabilidad del ARNm, y 6) aumentar el número de copias del gen, ya sea introduciendo copias múltiples en el cromosoma o colocando el casete en un plásmido multicopia. Se dice que una enzima o proteína producida a partir de un gen que está expresado en exceso se "produce en exceso". Un gen que está siendo "expresado en exceso" o una proteína que está siendo "producida en exceso" puede ser una que es nativa de un microorganismo anfitrión, o puede ser una que ha sido trasplantada por métodos de ingeniería genética de un organismo diferente a un microorganismo anfitrión, en cuyo caso, la enzima o proteína y el gen o región codificante que codifican la enzima o proteína se denominan "foráneos" o "heterólogos". Los genes y proteínas foráneos o heterólogos están, por definición, expresados en exceso y producidos en exceso, ya que no están presentes en el organismo anfitrión no modificado genéticamente.

Un "homólogo" de un primer gen, secuencia de ADN o proteína es un segundo gen, ADN, secuencia, o proteína que realiza una función biológica similar a la de dicho primer gen, secuencia de ADN o proteína, y que tiene al menos 25% de identidad de secuencia (cuando se comparan secuencias de proteínas o se compara la secuencia de proteína derivada de secuencias de genes) con dicho primer gen o proteína, según se determina mediante el

programa informático BLAST para la comparación de secuencias (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997), y que permite supresiones e inserciones. Un ejemplo de un homólogo del gen *aroG* de *E. coli* sería el gen *aroG* de *Salmonella typhimurium*.

Un "análogo" de un primer gen, secuencia de ADN o proteína es un segundo gen, secuencia de ADN o proteína que desempeña una función biológica similar a la de dicho primer gen, secuencia de ADN o proteína, pero cuando hay menos de 25% de identidad de secuencia (cuando se comparan secuencias de proteína o se compara la secuencia de proteína derivada de secuencias de gen) con dicho primer gen, secuencia de ADN o proteína, según se determina por el programa informático BLAST para comparación de secuencia (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997), y permite supresiones e inserciones. Un ejemplo de un análogo de la proteína AroZ de *Klebsiella pneumoniae* sería la proteína QutC de *Aspergillus nidulans*, ya que ambas proteínas son enzimas que catalizan la reacción de deshidroxiquimato deshidratasa 3, pero no existe una homología de secuencia significativa entre las dos enzimas o sus respectivos genes. Un científico conocedor de la técnica sabrá que muchas enzimas y proteínas que tienen una función biológica concreta, por ejemplo, la DAHP sintasa o la 3-deshidroshikimato deshidratasa, se pueden encontrar en muchos organismos diferentes, ya sea como homólogos o análogos, y dado que los miembros de dichas familias de enzimas o proteínas comparten la misma función, aunque pueden ser de estructura ligera o sustancialmente diferente, en muchos casos se pueden usar diferentes miembros de la misma familia para realizar la misma función biológica utilizando los métodos actuales de ingeniería genética. Por lo tanto, por ejemplo, la enzima AroZ y la enzima QutC catalizan la misma reacción, DHS deshidratasa, por lo que una de ellas dará como resultado la producción de ácido cis,cis-mucónico en el contexto adecuado, y la elección de cuál usar en última instancia se puede realizar eligiendo la que conduce a un título más alto de ácido cis,cis-mucónico bajo condiciones de fermentación similares.

Una "fuente de carbono no aromática" o un "compuesto no aromático" es un compuesto que contiene carbono que puede usarse para alimentar a un microorganismo de la invención como fuente de carbono y/o energía, en la cual el compuesto no contiene un anillo de seis miembros relacionado con el benceno. Los ejemplos de fuentes de carbono no aromáticas incluyen glucosa, xilosa, lactosa, glicerol, acetato, arabinosa, galactosa, manosa, maltosa o sacarosa. Un "compuesto aromático" es un compuesto que contiene uno o más anillos de seis miembros relacionados con el benceno. Un ejemplo de un compuesto aromático es catecol, o 1,2-dihidroxibenceno.

Un "promotor constitutivo fuerte" es una secuencia de ADN que normalmente se encuentra aguas arriba (en el lado 5' de un gen cuando se representa en la orientación 5' a 3' convencional) de una secuencia de ADN o un gen que se transcribe mediante una ARN polimerasa, y que causa que dicha secuencia o gen de ADN se exprese por transcripción mediante una ARN polimerasa a un nivel que se detecta fácilmente directa o indirectamente mediante cualquier procedimiento de ensayo apropiado. Los ejemplos de los procedimientos de ensayo apropiados incluyen 1) transcriptasa inversa cuantitativa más PCR, 2) ensayo enzimático de una enzima codificada, 3) gel de proteína teñido con azul Coomassie, o 4) producción medible de un metabolito que se produce indirectamente como resultado de dicha transcripción, y tal transcripción medible que se produce independientemente de la presencia o ausencia de una proteína que regula específicamente el nivel de transcripción, un metabolito o un químico inductor. Un ejemplo de un promotor que no es un "promotor constitutivo fuerte" es el promotor P_{lac} de *E. coli*, ya que está reprimido por un represor en ausencia de lactosa o del inductor IPTG. Utilizando métodos bien conocidos en la técnica, se puede usar un "promotor constitutivo fuerte" para reemplazar un promotor nativo (un promotor que de otro modo existiría naturalmente aguas arriba de una secuencia o gen de ADN), dando como resultado un casete de expresión que puede colocarse en un plásmido o cromosoma y que proporciona un nivel de expresión de una secuencia o gen de ADN deseado a un nivel que es mayor que el nivel del promotor nativo. Un promotor constitutivo fuerte puede ser específico para una especie o género, pero a menudo un promotor constitutivo fuerte de una bacteria puede funcionar bien en una bacteria distantemente relacionada. Por ejemplo, un promotor de *Bacillus subtilis* o un fago que normalmente crece en *B. subtilis* puede funcionar bien en *E. coli*. Un "promotor constitutivo fuerte" es sustancialmente diferente de los promotores inducibles, como P_{lac} , que se han usado en la producción de la técnica anterior de ácido cis,cis-mucónico y típicamente requieren un costoso cambio químico u otro cambio ambiental para el nivel deseado de función (Niu et al., 2002). Ejemplos de promotores constitutivos fuertes son P_{15} , P_{26} , de fago SP01 de *Bacillus subtilis* y colifago lambda P_R (SEQ ID NO. 1, 2 y 3).

Una "ruta mucónica" o "ruta de ácido mucónico" se refiere a una ruta bioquímica de DHS a PCA a catecol a cis, ácido cis-mucónico, y un "gen de la ruta mucónica" o "gen de la ruta del ácido mucónico" es un gen que codifica una enzima que catalizan una etapa en una ruta mucónica, o codifica una función auxiliar que sirve para potenciar la actividad de una de dichas enzimas, por ejemplo, *aroZ*, *aroY*, *catA*, *catX*, y *qutC*. DHS es una abreviatura de 3-deshidroshikimato, y PCA es una abreviatura de ácido protocatecuico. Un "plásmido mucónico" es un plásmido que contiene uno o más genes de la ruta mucónica.

Algunas de las manipulaciones genéticas utilizadas en la presente invención se centran en la ruta común para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos presente en las células bacterianas como se muestra en la Figura 1. La ruta común para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos como se representa en la Figura 1 de DAHP sintasa a corismato sintasa también se conoce como la "vía del ácido shikímico".

Existe un volumen sustancial de trabajos publicados sobre ingeniería genética de microorganismos para la producción de aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano (documentos US 4.681.852, US 4.753.883,

US 6.180.373, Solicitud de Patente Europea 86300748.0). Los enfoques incluyen el uso de diversas combinaciones de enzimas resistentes a la retroalimentación (AroF, AroG, PheA, TyrA), desregulación de la represión de la transcripción (*TyrR*), aumento de la fuerza del promotor (P_{tac} , P_{lac}) y aumento del número de copias de uno o más genes (*tktA*). Sin embargo, no se probaron muchas combinaciones específicas de los enfoques anteriores, ya sea porque había demasiadas combinaciones para intentar sin excesiva experimentación, o porque no se conocían cuáles serían las mejores combinaciones. Más importante aún, todavía no se conoce la idoneidad de cualquiera de estas combinaciones de manipulaciones genéticas para desarrollar un biocatalizador para la producción comercial de ácido mucónico utilizando fuentes de carbono renovables y no aromáticas.

La ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos es bien conocida para muchos microorganismos, especialmente para *E. coli* (Neidhardt y Curtiss, 1996). En una célula de tipo salvaje, la ruta está estrechamente regulada por la inhibición de la retroalimentación y la represión de la transcripción. La primera etapa comprometida está catalizada por deoxi-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) sintasa, de las cuales hay tres isoenzimas codificadas por *aroF*, *aroG* y *aroH*. Las tres isozimas, AroF, AroG y AroH, inhiben la retroalimentación de los productos de la ruta amino biosintética aromática, a saber, mediante tirosina, fenilalanina y triptófano, respectivamente. Los mutantes resistentes a la retroalimentación de los tres son bien conocidos (Draths et al., 1992; Lutke-Eversloh y Stephanopoulos, 2007; Hu et al., 2003; Shumilin et al., 1999). Un aspecto de la presente invención implica el uso de alelos resistentes a la retroalimentación de los genes *AroF*, *aroG*, y *aroH* para expresar proteínas enzimáticas AroF, AroH y AroH que son resistentes a la inhibición por retroalimentación por los productos de la ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos. La transcripción de varios de los operones implicados en la ruta aromática está regulada por el represor codificado por el gen *tyrR* o el represor codificado por el gen *trpR*, o ambos (Neidhardt et al., 1996). De particular importancia es la regulación negativa de la transcripción de *aroG* y *aroF* por la proteína TyrR cuando se une con uno o más de los aminoácidos aromáticos. Un aspecto de la presente invención implica la eliminación de la regulación negativa por genes *tyrR* o *trpR* mediante la eliminación de estos genes del cromosoma de la cepa bacteriana del anfitrión.

El objeto de esta invención es la creación de nuevas combinaciones de casetes modificado genéticamente con nuevos elementos modificados genéticamente con el fin de aumentar los parámetros de fermentación y la idoneidad para la producción comercial a gran escala de una cepa productora de ácido *cis,cis*-mucónico. En particular, la técnica anterior para la producción de ácido *cis,cis*-mucónico no ilustra ciertas combinaciones de elementos genéticos, por ejemplo, pero sin limitación, diversas combinaciones de un AroG resistente a la retroalimentación producido en exceso, un AroF resistente a la retroalimentación producido en exceso, un *tktA* expresado en exceso, un *TaA* expresado en exceso, casetes integrados cromosómicamente para expresar un *aroZ*, *aroY*, y un *catAX* (o análogos u homólogos de los mismos) de promotores constitutivos fuertes, y un alelo de *aroE* con pérdida de función parcial, que los autores de la presente invención definen como un gen que codifica una enzima AroE que confiere prototrofia a los aminoácidos aromáticos y vitaminas, pero sin producir una secreción significativa de compuestos aromáticos.

Todos los ejemplos específicos de construcciones de cepas descritas en la presente memoria derivan de una cepa C de *E. coli* de tipo salvaje (ATCC 8739), o Cepas K-12 de *E. coli* (YMC9 o MM294) pero los elementos genéticos descritos en la presente memoria se pueden ensamblar en cualquier otra cepa de *E. coli*, y los casetes de expresión o análogos y homólogos apropiados de los elementos genéticos descritos en la presente memoria pueden ensamblarse en cualquier otro microorganismo adecuado, tales como otras especies de bacterias, arqueas, levaduras, algas y hongos filamentosos que puedan usarse para la producción comercial de ácido *cis,cis*-mucónico a través de un procedimiento de fermentación.

En *E. coli*, la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos de la glucosa comienza con la rama no oxidativa de la ruta de la pentosa fosfato (PPP). Cuatro enzimas clave en la ruta de la pentosa fosfato no oxidante son transcetolasa, transaldolasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa y ribulosa-5-fosfato isomerasa. Estas enzimas catalizan las reacciones que conducen a la formación de eritrosa 4-fosfato (E4P) a partir de azúcares de hexosa o pentosa. Para aumentar la disponibilidad de E4P en *E. coli*, el gen *tktA* que codifica la transcetolasa puede expresarse en exceso (Niu et al., 2002). Del mismo modo, también se espera que la expresión en exceso del gen de la transaldolasa aumente la disponibilidad de E4P en algunas circunstancias (Bongaerts et al., 2001). En otro aspecto más de la presente invención, la expresión de los genes de la transcetolasa y transaldolasa se potencia mediante manipulaciones genéticas que conducen a un aumento en la actividad de las enzimas transcetolasa y transaldolasa. En otro aspecto más de la invención, el flujo a través de la rama no oxidativa de la PPP aumenta al producir en exceso ribulosa-5-fosfato epimerasa y ribulosa-5-fosfato isomerasa.

La primera etapa comprometida y la reacción más estrictamente regulada en la ruta común de los aminoácidos aromáticos es la condensación de fosfoenolpiruvato (PEP) y E4P para producir desoxiarabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) por DAHP sintasa (codificada por *aroG*, *aroF*, y *aroH*). La D-glucosa consumida por *E. coli* se lleva a la biosíntesis aromática en parte a través de la PPP, y en parte a través de la glucólisis. El flujo de glucosa en la ruta aromática aumenta en gran medida cuando la transcetolasa (*tktA*) y una isozima de DAHP sintasa (*aroG*) se amplifican a través de la transformación con un plásmido que aumenta su expresión al aumentar su número de copias (Niu et al., 2002). En un aspecto preferido de la presente invención, los genes *aroG* y *tktA* exógenos se integran en el ADN cromosómico con el fin de amplificar las actividades de las enzimas transcetolasa y DAHP

sintasa.

En otra realización de la presente invención, el flujo a través de PEP dentro de la célula microbiana se potencia aumentando el PEP disponible para la síntesis de DAHP. Muchos géneros de células bacterianas consumen PEP en el transporte de glucosa a través de la membrana celular utilizando un sistema de fosfotransferasa (PTS) en el que se consume una molécula de PEP por cada molécula de glucosa transportada a través de la membrana bacteriana externa. Al reemplazar o complementar el PTS dependiente de PEP con mecanismos de captación de glucosa no dependientes de PEP (independientes de PEP), es posible aumentar el tamaño de la reserva de PEP disponible para la ruta biosintética de aminoácidos aromáticos dentro de la célula microbiana. Por ejemplo, el sistema PTS para la absorción de azúcar puede ser reemplazado o complementado por un sistema de captación de azúcar basado en GalP o el sistema transportador de azúcar basado en proteínas Glf/Glk (Chandran et al., 2003; Yi et al., 2003). En un aspecto preferido de la presente invención además de eliminar el sistema PTS para la captación de azúcar con el fin de conservar la reserva de PEP dentro de la célula microbiana, el sistema de captación de azúcar basado en GalP también se inactiva con el fin de conservar el ATP dentro de la célula microbiana. En una célula microbiana que es defectuosa en el funcionamiento del sistema PTS y un sistema de captación de azúcar basado en GalP (Δ PTS/ Δ galP), la captación de azúcar puede lograrse mediante la introducción de un gen exógeno que codifica Glf, o genes exógenos que codifican proteínas Glf (proteína de difusión facilitada por glucosa) y Glk (glucoquinasa). Según se utiliza en la presente invención, la expresión proteína de difusión facilitada por glucosa se refiere a cualquier proteína Glf así como a cualquier otra proteína que sea funcionalmente equivalente a Glf y a funciones para transportar azúcares a las células microbianas por difusión facilitada. En un aspecto de la presente invención, el gen que codifica la proteína facilitadora de glucosa Glf se introduce en la célula microbiana que es Δ PTS/ Δ galP y la glucosa transportada a la célula microbiana es fosforilada por la glucosa cinasa endógena. En otro aspecto de la presente invención, los genes que codifican las proteínas Glf y Glk se introducen en una célula microbiana que es Δ PTS/ Δ galP. En un aspecto preferido de la presente invención, los genes *glf* y *glk* exógeno introducidos en la célula microbiana se integran en el ADN cromosómico del anfitrión.

En otra realización de la presente invención, cuando la fuente de carbono para el crecimiento y la energía requiere gluconeogénesis (por ejemplo, si la fuente de carbono es acetato o succinato), la reserva de PEP puede aumentarse al aumentar la actividad de las enzimas carboxilantes ya presentes en la célula. por ejemplo, PEP carboxiquinasa, que está codificada por *pck* en *E. coli* o introduciendo una enzima carboxilante exógena. En una realización preferida, el gen exógeno introducido que codifica una enzima carboxilante está integrado de manera estable en el cromosoma anfitrión. Los genes que codifican la enzima carboxilante pueden derivar de una variedad de especies microbianas. Los genes que codifican las enzimas carboxilantes pueden someterse adicionalmente a manipulaciones genéticas de modo que la expresión de la enzima carboxilante dentro del biocatalizador para la producción de ácido cis,cis-mucónico se potencia significativamente.

En otra realización más de la presente invención, la reserva de PEP dentro de la célula microbiana se incrementa disminuyendo o eliminando la actividad de las enzimas piruvato quinasas tales como PykA y PykF que utilizan PEP como sustrato.

A partir de DAHP, la ruta de aminoácidos aromáticos procede a través de varios compuestos intermedios a corismato (CHA), un punto de ramificación para la biosíntesis de tres aminoácidos aromáticos, a saber, L-Tirosina (L-Tyr), L-Fenilalanina (L-Phe), y L-Triptófano (L-Trp).

En las etapas iniciales de la ruta común de aminoácidos aromáticos, la 3-deshidroquinato (DHQ) sintasa (AroB) elimina el grupo fosfato de DAHP, lo que conduce a la formación de DHQ. La enzima DHQ deshidratasa (AroD) elimina una molécula de agua de DHQ lo que lleva a la formación de 3-deshidroshikimato (DHS) que posteriormente se reduce a shikimato (SHK) por la shikimato deshidrogenasa (AroE). La shikimato quinasa I/II (AroK, AroL) fosforila shikimato a shikimato 3-fosfato (S3P). Hay una condensación de S3P con PEP que conduce a la formación de 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato (EPSP). La formación de EPSP está mediada por la EPSP sintasa (AroA). Un grupo fosfato de EPSP es eliminado por la corismato sintasa (AroC) lo que conduce a la formación de corismato (CHA).

Como se muestra en la Figura 2, la ruta de aminoácidos aromáticos se puede bloquear a nivel de conversión de 3-deshidroshikimato (DHS) en shikimato (SHK) debido a una mutación en el gen *aroE* que conduce a la acumulación de DHS (Niu et al., 2002). La introducción de un gen *aroZ* exógeno funciona convirtiendo DHS en protocatecuato (PCA). El PCA se convierte posteriormente en catecol a través de una reacción de descarboxilación mediada por una enzima AroY. El catecol se convierte finalmente en ácido cis-cis mucónico (ccMuA) mediante la acción de un producto del gen *catA*. El ccMuA puede ser utilizado por la maleil acetoacetato isomerasa para producir ácido mucónico trans-trans (ttMuA). La ruta biosintética de DHS a ccMuA y ttMuA se denomina ruta del ácido mucónico. Los tres genes diferentes responsables de la conversión de DHS en ccMuA se pueden obtener a partir de diversas especies microbianas y se pueden introducir en un microorganismo seleccionado para la producción de ácido mucónico tal como *Escherichia coli*. En una realización preferida de la presente invención, los genes exógenos que codifican las proteínas implicadas en la ruta del ácido mucónico se integran en el ADN cromosómico del anfitrión.

Al redirigir la ruta de aminoácidos aromáticos a la producción de ácido cis,cis-mucónico la mutación del gen *aroE* es crítica. El gen *aroE* puede ser completamente inactivado y conducir a un bloqueo total en la biosíntesis de

aminoácidos aromáticos como se hizo con la cepa WN1/pWN2.248 de *E. coli* descrita para la producción de ácido mucónico (Niu et al., 2002). Un inconveniente importante con la cepa WN1/pWN2.248 de *E. coli* y cepas relacionadas es que debido a la inactivación completa del gen *aroE*, esta cepa se ha vuelto auxótrofa para los ácidos aromáticos como la fenilalanina, la tirosina y el triptófano, y las vitaminas aromáticas o los compuestos similares a las vitaminas mencionados anteriormente. Como resultado, esta cepa durante su crecimiento para la producción de ácido cis,cis-mucónico requiere la adición exógena de estos seis compuestos (o un intermediario común tal como el shikimato), lo que aumenta sustancialmente el coste de la producción comercial de ácido cis,cis-mucónico utilizando tal cepa. Un enfoque novedoso para superar esta dependencia de una fuente exógena de aminoácidos aromáticos es utilizar una cepa con una mutación de pérdida de función parcial en *aroE*. El mutante *aroE* permitiría un flujo limitado de carbono a ácido shikímico a la vez que se acumularían cantidades significativas de DHS que a continuación estarían disponibles para la conversión en PCA mediante la acción de una enzima AroZ. Por lo tanto, el uso de una forma mutante con pérdida de función parcial de *aroE* eliminaría la dependencia de los aminoácidos aromáticos exógenos, al mismo tiempo que desviaría el flujo de carbono a ácido cis,cis-mucónico.

Los genes que codifican la síntesis de las proteínas AroZ, AroY y CatA esenciales para la conversión de DHS en ácido cis,cis-mucónico pueden derivarse de muchas especies microbianas. En una realización, estos genes exógenos se integran en el cromosoma anfitrión del biocatalizador que se está desarrollando. En una realización preferida, la expresión de estos genes exógenos dentro del biocatalizador es impulsada por un promotor constitutivo sin la necesidad de ningún inductor.

La enzima 3-deshidroshikimato deshidratasa (AroZ; EC 4.2.1.118) es necesaria para la biosíntesis del protocatecuato intermedio. En esta especificación, "AroZ" se referirá a cualquier enzima que catalice la reacción de 3-deshidroshikimato deshidratasa. En la *técnica anterior*, esta enzima se expresa a partir del gen *aroZ* de *Klebsiella pneumoniae* cepa A170-40 (ATCC25597) (Niu et al., 2002, Draths y Frost, 1995). Sin embargo, la actividad específica de AroZ varía ampliamente entre organismos, de 0,1 a 261 micromoles/min/mg (Wheeler et al., 1996; Fox et al., 2008; Pfleger et al, 2008), por lo que puede obtenerse una mejora significativa expresando un gen *aroZ* también conocido como *asbF* (Fox et al., 2008; Pfleger et al, 2008), *qutC* (Wheeler et al, 1996), *qa-4* (Rutledge, 1984), y *quiC*, de un organismo que tiene una actividad específica más alta que *K. pneumoniae*, por ejemplo *Acinetobacter baylyi*, *Aspergillus nidulans* (Wheeler et al, 1996), ahora también conocido como *Emericella nidulans*, o *Neurospora crassa*, (Rutledge, 1984; Stroman et al, 1978), o *Podospora anserina*, también conocida como *Podospora pauciseta* (Hansen et al, 2009).

Como ejemplo concreto, la secuencia de codificante para el gen *qa-4* de *N. crassa* que codifica 3-deshidroshikimato deshidratasa se puede obtener mediante cualquiera de diversos métodos bien conocidos, por ejemplo, síntesis de ADN de gen completo, clonación de ADNc, o mediante una combinación de clonación de ADN genómico y PCR o síntesis del conector de ADN sintético. Como no hay intrones en el gen *qa-4*, la región codificante puede obtenerse por PCR a partir de ADN genómico (Rutledge, 1984). La secuencia proteica de la enzima *qa-4* (SEQ ID No. 4) y la secuencia de DNA del gen nativo (SEQ ID No. 5) son conocidas.

Alternativamente, se puede construir un casete de expresión para la 3-deshidroshikimato deshidratasa de *A. nidulans*. La secuencia codificante para la enzima QutC de *A. nidulans* puede obtenerse mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos, por ejemplo, síntesis de ADN de gen completo, clonación de ADNc, o mediante una combinación de clonación de ADN genómico y PCR o síntesis del conector de ADN sintético. Se conocen la secuencia proteica de QutC (SEQ ID NO. 6) y la secuencia de ADN del gen nativo, que no contiene intrones (SEQ ID NO. 7; número de acceso GenBank M77665.1). Se puede obtener un casete de expresión mediante síntesis de ADN, o mediante una combinación de clonación genómica y PCR, para que la enzima QutC pueda producirse con precisión en *E. coli*. Al expresar una secuencia codificante para QutC de un promotor fuerte y constitutivo en *E. coli*, se puede obtener expresión suficiente de una o dos copias del gen integrado en el cromosoma, obviando la necesidad de mantener más de dos copias del casete de expresión en un plásmido multicopia como se ha descrito en la *técnica anterior* (Niu et al., 2002).), y que puede conducir a inestabilidad. El método descrito anteriormente puede usarse en general para obtener una secuencia de ADN que codifica una enzima deseada, y esa secuencia codificante puede usarse a continuación para construir un casete de expresión diseñado para funcionar en *E. coli* u otro organismo anfitrión microbiano apropiado.

La actividad específica de AroZ también puede mejorarse utilizando la secuencia de proteína de la *técnica anterior* (Niu et al., 2002) pero construyendo un casete de expresión mejorado, por ejemplo, en donde se ha instalado un promotor más fuerte y/o sitio de unión a ribosoma (RBS) en frente de la región codificante, como se describe en el Ejemplo 4.

El gen *aroZ* que codifica AroZ (3-deshidroshikimato deshidratasa) de la cepa A170-40 de *Klebsiella pneumoniae* se puede obtener como se describe en la *técnica anterior*. La secuencia de ADN del gen y el ADN circundante se puede determinar por métodos bien conocidos en la *técnica*. Un gen heterólogo de la invención tal como *aroZ* puede integrarse en un casete de expresión utilizando una secuencia de ADN nativa o puede sintetizarse con una secuencia con codones optimizados para el organismo anfitrión deseado. Un gen *aroZ* se puede clonar como se describe (Draths y Frost, 1995) a partir de cualquier otro microbio que contenga un gen *aroZ* activo, por ejemplo la cepa 342 de *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* Sp. ADP1 (*Acinetobacter baylyi* ADP1), *Bacillus thuringiensis*, *Emericella*

nidulans, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas putida* W619, y muchos otros.

La enzima protocatecuato descarboxilasa (AroY; EC 4.1.1.63) es necesaria para la biosíntesis del catecol intermedio. En esta memoria descriptiva, "AroY" se referirá a cualquier enzima que catalice la reacción de protocatecuato descarboxilasa. En el estado de la técnica, esta enzima se expresa a partir del gen *aroY* de la cepa A170-40 de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC25597) en un plásmido multicopia (Niu et al., 2002). Sin embargo, una vez más puede obtenerse una mejora en el procedimiento produciendo suficiente enzima a partir de una o dos copias de un casete de expresión integrado en el cromosoma del organismo anfitrión. Esto se puede lograr obteniendo un gen *aroY* de un organismo que produce naturalmente una enzima AroY que tiene una actividad específica más alta que la de la enzima AroY de *K. pneumoniae* de la técnica anterior, o aumentando el nivel de expresión de AroY de *K. pneumoniae* construyendo un casete de expresión que, por ejemplo, utiliza un promotor constitutivo fuerte y/o RBS fuerte como se describió anteriormente en el Ejemplo 4. La secuencia de proteína para AroY de la cepa A170-40 de *K. pneumoniae* se proporciona en el SEQ ID NO. 8. El gen correspondiente, *aroY*, se puede clonar como se ha descrito anteriormente (Draths y Frost, 1995), o basándose en la secuencia de la proteína, se puede sintetizar con codones optimizados para el organismo anfitrión deseado.

El gen *aroY* puede obtenerse a partir de cualquier otro microorganismo que contenga un homólogo o análogo, por ejemplo, la cepa NCTC418 de *K. pneumoniae* (ATCC15380), *Klebsiella pneumoniae* 342, y *Arxula adenivorans* (Sietmann et al, 2010). La secuencia de ADN del gen *aroY* de *Klebsiella pneumoniae* 342 y el ADN circundante se proporciona como SEQ ID NO. 9.

La enzima catecol 1,2-dioxigenasa (CatA; EC 1.13.11.1) es necesaria para la última etapa de la biosíntesis del ácido cis,cis-mucónico. En esta memoria descriptiva, "CatA" se referirá a cualquier enzima que catalice la reacción de catecol 1,2-dioxigenasa. En la técnica anterior, esta enzima se expresa a partir del gen *catA* de la cepa ADP1 de *Acinetobacter calcoaceticus* en un plásmido multicopia (Niu et al., 2002). La cepa fuente, cepa ADP1 de *Acinetobacter calcoaceticus*, aparentemente ha sido renombrada *Acinetobacter* Sp. ADP1 y *Acinetobacter baylyi* ADP1 (Neidle y Ornston, 1986; Barbe et al., 2004; de Berardinis et al, 2008). En este ejemplo de la técnica anterior, el gen *catA* se expresó desde un promotor P_{lac}, que requiere lactosa o IPTG (isopropiltiogalactósido) como inductor. Estos compuestos son demasiado costosos para su uso en fermentaciones comerciales, por lo que de nuevo, se necesitan mejoras significativas en el procedimiento, tanto para eliminar la necesidad de un inductor costoso como para crear una cepa más estable integrando el casete de expresión en el cromosoma. Esto se puede lograr construyendo un casete de expresión para el gen *catA* que utiliza un promotor constitutivo fuerte, RBS fuerte y/o ARNm más estable como se ha descrito anteriormente en los otros Ejemplos.

La secuencia de ADN del gen *catA* y secuencias circundantes de *Acinetobacter baylyi* ADP1 se proporciona en SEQ ID NO. 10. La secuencia de proteína para CatA de la misma cepa se proporciona en SEQ ID NO. 11. En una realización preferida, el casete de expresión para *catA* contiene uno o dos marcos de lectura abiertos adicionales que existen naturalmente aguas abajo de *catA*, para aumentar el nivel de expresión del gen *catA* (Schirmer y Hillen, 1998). Muchos otros organismos pueden ser una fuente de gen *catA*, por ejemplo *Pseudomonas arvilla*, *Pseudomonas fluorescens* (Nakazawa et al., 1967; Kojima et al, 1967), Cepa 2065 de *Streptomyces* Sp. (Iwagami et al, 2000), *Cupriavidus necator* 335T, y muchos otros (Pérez-Pantoja et al, 2008).

Con el fin de mejorar el flujo de carbono hacia el ácido cis,cis-mucónico, es necesario bloquear otras rutas que se ramifican fuera de la ruta de aminoácidos aromáticos, además de reducir el flujo de carbono de DHS a shikimato (SHK) mediante el uso de un mutante *aroE* con pérdida de función parcial. Algunas bacterias, por ejemplo en el género *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, contienen un gen llamado *pobA*, que codifica una enzima, p-hidroxibenzoato hidroxilasa, que convierte el DHS en ácido gálico. Aunque no se ha encontrado un homólogo o análogo de PobA en *E. coli*, cepas de *E. coli* modificadas genéticamente para producir DHS secretan cantidades medibles de ácido gálico (Li y Frost, 1999), por lo que es probable que tal enzima exista en *E. coli*. Además, el PCA derivado de DHS se puede convertir en ácido gálico mediante la acción de la enzima p-hidroxibenzoato hidroxilasa (PobA) codificada por el gen *pobA*. El ácido gálico así producido puede convertirse posteriormente en pirogalol. Una forma de bloquear el flujo de carbono a ácido gálico y pirogalol en el biocatalizador seleccionado para un ácido cis,cis-mucónico mejorado es bloquear o disminuir la actividad de la proteína p-hidroxibenzoato hidroxilasa (PobA) a través de manipulaciones genéticas. Del mismo modo, DHQ, el precursor de DHS también puede ser activado por la shikimato deshidrogenasa codificada por *aroE* conduciendo a la producción de ácido quinico. En una realización de la presente invención, la enzima mutante AroE con pérdida de función parcial se selecciona o escruta adicionalmente para determinar su incapacidad o reducción de capacidad para convertir DHQ en ácido quinánico.

Existen varias ventajas en la producción de ácido trans,trans-mucónico en lugar de ácido cis,cis-mucónico. Se prefiere el ácido trans,trans-mucónico sobre el ácido cis,cis-mucónico en la reacción de Diels Alder con etileno para la producción de ácido tereftálico. Un biocatalizador con una ruta aromática manipulada genéticamente produce ácido cis,cis-mucónico que se puede convertir en ácido trans,trans-mucónico fuera de la célula utilizando procedimientos de conversión química. Por otro lado, mediante la introducción de una enzima maleilacetatoacetato isomerasa o isomerasa similar en el biocatalizador, es posible convertir el ácido cis,cis-mucónico en ácido trans,trans-mucónico dentro del biocatalizador bacteriano.

La memoria descriptiva de esta solicitud de patente proporciona diversos aspectos diferentes de la invención relacionados con la construcción de una cepa microbiana para la producción eficaz de ácido mucónico. Un experto en la técnica puede compilar varios aspectos diferentes de la presente invención para construir un biocatalizador con una eficacia muy alta para la producción de ácido mucónico.

Sección experimental

Observaciones generales

Preparaciones de cepas e inóculos: En la Tabla 1 se proporciona una lista de las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en la presente memoria. Todos los ejemplos específicos de construcciones de cepas descritos en la presente memoria derivan de una Cepa C de *E. coli* de tipo salvaje. (ATCC 8739), o cepas K-12 de *E. coli* (YMC9 o MM294) pero los elementos genéticos descritos en la presente memoria se pueden ensamblar en cualquier otra cepa adecuada de *E. coli*, y los casetes de expresión o análogos y homólogos apropiados de los elementos genéticos descritos en la presente memoria pueden ensamblarse en cualquier otro microorganismo adecuado, como otras especies de bacterias, arqueas, levaduras, algas y hongos filamentosos que puedan utilizarse para la producción comercial de ácido cis,cis-mucónico a través de un procedimiento de fermentación.

E. coli C es capaz de fermentar glucosa al 10% en medios minerales AM1. El medio AM1 contiene 2,63 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,87 g/L de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, MgSO_4 1,5 mM, betaína 1,0 mM y 1,5 mL/L de elementos traza. Los elementos traza se preparan como una provisión de partida 1000X y contienen los siguientes componentes: 1,6 g/L de FeCl_3 , 0,2 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L de CuCl_2 , 0,2 g/L de $\text{ZnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L de NaMoO_4 , 0,05 g/L de H_3BO_3 y 0,33 g/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. El pH del caldo de fermentación se mantiene a 7,0 con KOH 1,0 - 10,0 M o hidróxido de amonio 1,0 - 9,0 M.

Fermentaciones: Las fermentaciones se iniciaron haciendo un aislamiento en una placa de NBS-glucosa al 2% (Jantama et al., 2008a) de nueva aportación a partir de una provisión de partida de glicerol al 40% de una cepa de *E. coli* modificada genéticamente y almacenada en un congelador a -80°C . Los plásmidos, si están presentes, se retienen incluyendo los antibióticos apropiados en las placas de agar y los medios líquidos. La ampicilina (sal de sodio) se utiliza a 150 mg/L, espectinomomicina HCL a 100 mg/L, tetraciclina HCl a 15 mg/L y sulfato de kanamicina a 50 mg/L. Después de 24 a 48 horas (37°C), se recoge una sola colonia en 25 mL del mismo medio en un matraz oscilante. Después de oscilar a 200 rpm a 37°C hasta que las células hayan crecido a una DO_{600} de aproximadamente 1,0, el cultivo se enfría sobre hielo y se agrega un volumen igual de glicerol estéril al 80%. Se congelan alícuotas de 2 mL a -80°C para su uso como inóculos para las fermentaciones.

Crecimiento celular: La masa celular se estimó midiendo la densidad óptica a 550 nm (DO_{550}) o 600 nm (DO_{600}) utilizando un espectrofotómetro Thermo Electronic Spectronic 20.

Análisis de compuestos intermedios en la ruta del ácido shikímico y las rutas del ácido mucónico: El ácido mucónico total producido en caldos de fermentación, que incluye ácido cis,cis-mucónico y ácido cis,trans-mucónico, y otros intermedios bioquímicos se analizaron mediante HPLC con un aparato Waters Alliance y verificando la absorbancia a 210 nm o el índice de refracción a 45°C , utilizando patrones adquiridos a Sigma-Aldrich. La columna era una BioRad Aminex HPX-87H ejecutada a 50°C con ácido sulfúrico 8 mM como fase móvil a un caudal de 0,6 mL/min durante 40 minutos. En la Figura 3 se muestra un cromatógrafo de patrones adquiridos (Sigma-Aldrich). Para preparar la HPLC, las muestras de fermentación se diluyen 10 o 100 veces en tampón de fosfato de potasio 0,05 M, pH 7,0, para preservar la forma cis,cis del ácido mucónico de la isomerización a la forma cis,trans.

Para separar los isómeros del ácido mucónico, las muestras preparadas como anteriormente se ejecutaron en un segundo sistema de HPLC. El aparato era un HPLC Agilent 1200, la columna era una Eclipse XDB-C18 de Agilent, 4,6 x 150 mm ejecutada a 30 grados centígrados con una fase móvil de KH_2PO_4 50 mM en metanol del 30% ajustado a pH 3,0 con ácido fosfórico. El caudal fue de 1 mL/min durante 4 minutos, con detección mediante absorbancia a 278 nm. El patrón de ácido cis,trans-mucónico se creó disolviendo el ácido cis,cis-mucónico en agua y permitiendo que experimentara isomerización espontánea catalizada por ácido durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente, hasta que el pico de HPLC se hubo desplazado completamente a una nueva posición. Los otros patrones fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. En la Figura 4 se muestra un cromatógrafo que muestra los patrones.

Composición del medio de producción de ácido mucónico para el procedimiento de fermentación: Cada litro de medio de fermentación contiene 50 mL/L de KH_2PO_4 1M, 10 mL de ácido cítrico de 200 g/L + citrato férrico de 25 g/L, 1,2 mL de ácido sulfúrico al 98% y una gota de Antifoam 204. Estos componentes se mezclaron con suficiente agua para dejar espacio para la adición de otros componentes a continuación. Después del tratamiento en autoclave, se agregaron los siguientes componentes: 10, 20, 30 o 40 mL de glucosa al 50% (para proporcionar 5, 10, 15 o 20 g/L final), 2 mL de MgSO_4 1M, 1 mL de CaCl_2 0,1 M, 10 mL de elementos 1000X Trace (Jantama et al., 2008a), 1, 2, 4 u 8 mL de fenilalanina de 50 g/L + tirosina de 50 g/L + triptófano de 50 g/L (para obtener 0,5, 0,1, 0,2, o 0,4 g/L final), 10 mL de ácido p-hidroxibenzoico de 1 g/L + ácido p-aminobenzoico de 1 g/L de + ácido 2,3-dihidroxibenzoico de 1 g/L, y, según sea necesario, 1 mL de ampicilina (sal sódica) de 150 mg/ml y/o 1 mL de

Espectinomicina HCl de 100 mg/ml.

Para las fermentaciones de alimentación discontinua, el frasco de alimentación contenía 600 g/L de glucosa anhidra y 32 mL/L de fenilalanina de 50 g/L + tirosina de 50 g/L + triptófano de 50 g/L. Se utilizó NH₄OH 9M como base para mantener el pH del medio de fermentación.

Para los matraces oscilantes, se sustituyeron las sales de NBS (Jantama et al., 2008a) más tampón MOPS 0,2 M, pH 7,4, por la mezcla pre-autoclave descrita anteriormente, pero la glucosa y los otros aditivos fueron los mismos.

Las fermentaciones de alimentación discontinua se realizaron en fermentadores científicos New Brunswick de 7L con pH, OD, temperatura, glucosa y velocidad de alimentación controlados por controladores DCU o soporte lógico Biocommand. La temperatura se mantuvo a 37°C, el pH se mantuvo a 7,0 con agua amoniacal 9 N y el oxígeno disuelto (OD) se mantuvo a 30% de saturación de aire mientras se aumentaba la velocidad del impulsor de 750 rpm a 1200 rpm. La concentración de glucosa inicial en el medio deseado fue de aproximadamente 5 a 25 g/L. Se añadió una solución de glucosa al fermentador cuando la concentración de glucosa se redujo por debajo de 5 g/L, y la velocidad de alimentación de glucosa se controló mediante el nivel de oxígeno disuelto. El tiempo de fermentación total fue de 48 horas y el título final fue de 16 g/L de ácido mucónico.

Construcción de plásmidos que expresan genes de la ruta del ácido mucónico: Los tres genes heterólogos requeridos para la conversión de DHS en ácido mucónico se clonaron individualmente o combinados en un plásmido de bajo número de copias, pCL1921 (Lerner e Inouye, 1990). La secuencia de ADN de pCL1921 se proporciona en SEC ID NO. 20 en la Tabla 3. En resumen, las secuencias codificante de los análogos u homólogos de *catAX*, *aroY* y *aroZ* fueron sometidos a optimización de codones para determinar la expresión en *E. coli* y sintetizados comercialmente (GeneArt, Invitrogen). A continuación, estas secuencias se amplificaron mediante PCR utilizando un cebador directo que porta un único sitio de unión al ribosoma y un cebador inverso que porta una secuencia terminadora única para cada gen. El fragmento de PCR resultante se digirió con enzimas de restricción y se clonó aguas abajo de una secuencia promotora constitutiva única mediante procedimientos de clonación molecular convencionales. Las secuencias promotoras se clonaron mediante amplificación por PCR a partir de las secuencias de ADN de origen descritas previamente (Solicitud de Patente de los Estados Unidos. 20090191610; Patente de Estados Unidos 7244593) seguido de digestión de restricción y clonación molecular convencional. La secuencia de promotor-RBS-secuencia codificante-terminador constituía conjuntamente un casete de expresión. A continuación, se combinaron casetes de expresión individuales para generar plásmidos que expresaban uno, dos o los tres genes de la ruta del ácido mucónico.

Ejemplo 1

Aumento de la expresión de *aroG* y *aroF*.

El gen *tyrR* de *E. coli* puede mutarse mediante cualquiera de una serie de métodos bien conocidos, tal como mutagénesis química o por radiación y escrutinio (por ejemplo, mediante PCR y secuenciación de ADN) o selección para determinar la resistencia a análogos (por ejemplo, resistencia a 4-fluorotirosina), mutagénesis por transposones, mutagénesis por bacteriófago Mu, o transformación. En una realización preferida, la mutación en el gen *tyrR* es una mutación nula (una mutación que no deja actividad detectable), y en una realización más preferible, se elimina al menos una porción del gen *tyrR*. Esto se puede lograr, por ejemplo, utilizando un método de transformación en dos etapas que utiliza moléculas de ADN lineal (Jantama et al, 2008a, Jantama et al, 2008b). En la primera etapa, se integra un casete *cam^R*, *sacB* en el locus *tyrR* para reemplazar la mayoría o la totalidad del marco de lectura abierto de *tyrR* mediante doble recombinación y seleccionando mediante resistencia al cloranfenicol. En la segunda etapa, un ADN lineal que comprende una versión del gen *tyrR* con delección se integra mediante doble recombinación, seleccionando mediante resistencia a sacarosa al 5% en un medio rico tal como LB. Las eliminaciones correctas se identifican y confirman mediante la reacción en cadena de la polimerasa de diagnóstico (PCR). El propósito de la delección de *tyrR* es aumentar la expresión de *aroG* y *aroF*. Un enfoque alternativo que logra un resultado similar es reemplazar el promotor nativo en frente de *aroG* y/o *aroF* con un promotor constitutivo fuerte y añadir, si fuera necesario, un terminador de transcripción. En el Ejemplo 4 de más abajo se proporcionan más detalles sobre cómo se logra esto en general.

El último de los dos enfoques descritos anteriormente para superar la represión de las actividades AroG y AroF por la proteína TyrR es preferible, ya que la delección de *tyrR* puede causar una expresión en exceso no deseada de genes tales como *aroLM* (Neidhardt y Curtiss, 1996). En el Ejemplo 4 de más abajo se proporcionan más detalles sobre cómo se logra esto en general.

Ejemplo 2

AroG y AroF resistentes a la retroalimentación

Las mutaciones en el gen *aroG* que conducen a una enzima AroG resistente a la retroalimentación (3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintasa o DAHPS) son bien conocidas en la técnica (Shumilin et al., 1999, Kikuchi et

al., 1997, Shumilin et al., 2002). También son bien conocidos los métodos para crear, identificar y caracterizar tales mutaciones (Ger et al., 1994, Hu et al., 2003). Una mutación preferible es aquella que conduce a la resistencia completa a la inhibición por fenilalanina. Se puede introducir cualquiera de las mutaciones resistentes a la retroalimentación conocidas publicadas en un gen *aroG* contenido en el cromosoma o en un plásmido mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos, un ejemplo de los cuales es la PCR mutagénica en la que se sintetiza la mutación deseada como parte de un oligonucleótido cebador de PCR (Hu et al., 2003). La correcta instalación de la mutación se confirma mediante la secuenciación del ADN. La secuencia del gen *aroG* de tipo salvaje de *E. coli* C se proporciona en SEQ ID NO. 18. Una mutación preferida es una mutación puntual que cambia el aminoácido 150 de AroG de prolina a leucina, por ejemplo cambiando el codón 150 de CCA a CTA (Hu et al., 2003). En una realización más preferida, el codón 150 se cambia de CCA a CTG, que es un codón preferido en *E. coli*. Este alelo particular de *aroG* es preferible, ya que la DAHP sintasa codificada es completamente resistente a la inhibición por fenilalanina hasta 3 mM, y tiene una actividad específica similar a la enzima de tipo salvaje (Hu et al., 2003).

Se pueden obtener alelos de *aroG* resistentes a la retroalimentación adicionales mediante mutagénesis y selección para determinar la resistencia a uno o más análogos de fenilalanina, tales como beta-2-tienilalanina, p-fluorofenilalanina, p-clorofenilalanina, o-fluorofenilalanina y o-clorofenilalanina, y a continuación demostrar que la mutación que causa la resistencia está vinculada al gen *aroG* (Ger et al., 1994; Patente de Estados Unidos Núm. 4.681.852). El enlace a *aroG* se puede demostrar directamente mediante secuenciación de ADN o ensayo enzimático en presencia y ausencia de fenilalanina, (Ger et al., 1994) o indirectamente mediante transducción y selección mediada por fago para un marcador genético en o cerca del locus *aroG* que se puede seleccionar, ya sea a favor o en contra (Patente de Estados Unidos Núm. 4.681.852). Tal marcador genético puede ser una delección o mutación puntual en el propio gen *aroG*, o una mutación en cualquier gen adecuado estrechamente relacionado, tal como *nadA* en caso de *E. coli*. Como un ejemplo en *E. coli*, después de la mutagénesis y la selección para determinar la resistencia al análogo de fenilalanina, se pueden utilizar mutantes individuales o grupos de mutantes como donantes para la transducción mediada por P1 en un receptor no sometido a tratamiento previo en el que se han suprimido los tres genes de DAHP sintasa, *aroG*, *aroF*, y *aroH*, y seleccionar para crecer en un medio mínimo apropiado. Los transductantes se enriquecerán a continuación en mutaciones en el gen o los genes deseados. Alternativamente, después de la mutagénesis y la selección de la resistencia análoga, se pueden utilizar mutantes individuales o grupos de mutantes como donantes para la transducción mediada por P1 en una cepa receptora no sometida a tratamiento previo que contiene una mutación nula en el gen *nadA*, seleccionando de nuevo para determinar el crecimiento en un medio mínimo apropiado que carece de nicotinamida. Otro enfoque es seleccionar mutantes resistentes en un fondo de cepa que contiene un transposón, por ejemplo Tn10, inserción cerca del gen *aroG*, tal como en el gen *nadA*. La transducción de P1 de mutantes resistentes análogos a un fondo de cepa que no contenga dicho transposón y la selección con tetraciclina u otra resistencia adecuada a antibióticos producirá el enriquecimiento en las mutaciones *aroG* deseadas. En todos estos enfoques, la resistencia a la retroalimentación se confirma finalmente mediante el ensayo enzimático y la secuenciación del ADN del gen. Los autores de la presente invención se referirán a los alelos de *aroG* que son resistentes a la inhibición por retroalimentación como *aroG**.

La cepa WM191 ($\Delta tyrR$, $\Delta aroF$) se obtuvo de YMC9 (ATCC 33927). El método de reemplazo de genes de dos etapas (Jantama et al., 2008a) se utilizó para instalar delecciones limpias tanto en *tyrR* como en *aroF*, para proporcionar la cepa WM191. A continuación, se transdujo un alelo *nadA::Tn10* de CAG12147 (CGSC 7351, Coli Genetic Stock Center, Yale University) para proporcionar la cepa WM189 ($\Delta tyrR$, $\Delta aroF$, *nadA::Tn10*). La selección fue en LB más tetraciclina HCl (15 mg/L). La cepa RY890 ($\Delta tyrR::kan$, *aroF363*) se obtuvo de MM294 (ATCC 33625) en tres etapas mediante transducción de P1. Las cepas donantes, por orden, fueron JW1316-1 (CGSC 9179, Coli Genetic Stock Center, Universidad de Yale), NK6024 (CGSC 6178, Coli Genetic Stock Center, Universidad de Yale) y AB3257 (CGSC 3257, Coli Genetic Stock Centre, Yale University), y las tres selecciones, en orden, fueron LB más sulfato de kanamicina (50 mg/L), LB más hidrócloruro de tetraciclina (15 mg/L) y glucosa mínima de NBS (Jantama et al., 2008a) con tiamina HCl (5 mg/L).

WM189 se mutagenizó con luz UV a aproximadamente 20% de supervivencia y se sembró en medio de glucosa mínimo NBS (Jantama et al., 2008a) que contenía o-fluorofenilalanina (1 mM), tiamina (5 mg/L) y nicotinamida (1 mM). Las colonias de cada una de varias placas se recogieron en grupos separados, y se realizaron productos lisados de P1vir en cada grupo. Estos productos lisados se utilizaron para transducir WM191 a resistencia a tetraciclina (15 mg/L) en medio LB, y las colonias obtenidas se replicaron en placas con medio de glucosa mínimo NBS que contenía o-fluorofenilalanina 1 mM, tiamina (5 mg/L) y nicotinamida (1 mM). Se supuso que las réplicas de colonias que sobrevivieron tanto a la tetraciclina como al análogo contenían una mutación resistente a la retroalimentación en *aroG*. Se eligieron ocho colonias individuales de 5 grupos independientes para la secuenciación del ADN. Las regiones codificantes de *aroG* se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa y se secuenciaron. Los resultados, que se muestran en la Tabla 4, revelaron que cada una de las ocho cepas contenía una mutación puntual en su gen *aroG*. Algunos de los alelos eran idénticos a los alelos publicados, pero algunos eran novedosos.

Se usó un producto lisado de P1vir de uno de los grupos descritos anteriormente para transducir RY890 (que tiene un alelo de tipo salvaje de *aroG*) a resistencia a tetraciclina y resistencia a o-fluorofenilalanina (0,3 mM) mediante siembra de placas por duplicado tal como se describió anteriormente. Se seleccionaron cuatro colonias, denominadas RY893, RY897, RY899 y RY901, para la secuenciación del ADN (Tabla 4), y nuevamente, dos de los

alelos fueron idénticos a un alelo publicado, pero dos fueron nuevos. La cepa RY902, que es isogénica para las últimas cuatro cepas, pero contiene un gen *aroG* de tipo salvaje, se construyó como control, por transducción de CAG12147. Estas cinco cepas se cultivaron durante la noche en matraces oscilantes en 25 mL de glucosa mínima NBS (15 g/L) más tiamina HCl (5 mg/L) y nicotinamida (1 mM). Las células resultantes se recogieron mediante centrifugación, se resuspendieron para enjuagarlas con 10 mL de agua, se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en 0,5 mL de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0. Las células suspendidas se lisaron mediante agitación vortical con tres gotas de cloroformo, y el producto lisado bruto se sometió a ensayo para determinar la actividad de DAHP sintasa utilizando un método similar al descrito en la bibliografía (Hu et al., 2003), con las siguientes modificaciones. El tampón de fosfato era 50 mM (concentración final), pH 7,0, la concentración final de eritrosa-4-fosfato era 2 mM, la concentración final de fosfoenol piruvato era 5 mM, la temperatura de incubación era 30°C y la reacción se detuvo a los 10 minutos. Los autores de la presente invención definieron 1 mU como la actividad que produjo 1 nMol de DAHP por minuto por miligramo de proteína. Para someter a ensayo la resistencia a la retroalimentación, cada producto lisado bruto se sometió a ensayo con o sin fenilalanina a una concentración final 18 mM. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 5. Las enzimas mostraron actividad específica y resistencia a la fenilalanina variables, pero todas las versiones de mutantes seleccionados que se sometieron a ensayo fueron significativamente más resistentes que los controles de tipo salvaje.

Los alelos de *aroG* de RY893, RY899, RY901 y RY902, descritos anteriormente, se introdujeron en un fondo de cepa que produce ácido mucónico de la siguiente manera. Se utilizaron P1vir lisados de las cepas donantes *aroG** y *aroGwt* para transducir MYR219 (*E. coli* C, Δ *aroE*, Δ *ack::P₁₅-aroB*, pMG37) a resistencia a tetraciclina HCl (15 mg/L), para proporcionar nuevas cepas RY903, RY909, RY911 y RY912, respectivamente. Cada una de estas cepas se transdujo a continuación a resistencia a sulfato de kanamicina (50 mg/L) utilizando un producto lisado de P1vir de JW1316-1, para introducir el alelo Δ *tyrR::kan*, para proporcionar las cepas RY913, RY919, RY921 y RY922, respectivamente. La selección con espectinomicina se mantuvo durante todo el tiempo para mantener el plásmido mucónico. Las cuatro cepas resultantes se cultivaron durante 48 horas a 37°C en matraces oscilantes en 25 mL de medio mínimo NBS (Jantama et al., 2008a) que contenía suplementos de 20 g/L de glucosa, tampón MOPS 0,2 M, pH 7,4, nicotinamida (1 mM), fenilalanina (100 mg/L), tirosina (100 mg/L), triptófano (100 mg/L), ácido p-hidroxibenzoico (1 mg/L), ácido p-aminobenzoico (1 mg/L), ácido 2,3-dihidroxibenzoico (1 mg/L), rojo fenol (10 mg/L) y sulfato de amonio (1 g/L). El pH se mantuvo próximo a 7 según se estimó a simple vista a partir del color del rojo fenol, frente a un patrón de pH 7,0, mediante la adición manual de alícuotas de 1 mL de KOH 1,0 M a demanda a los matraces oscilantes. El ácido mucónico producido se analizó mediante HPLC como se describió anteriormente, y los resultados se muestran en la Tabla 6. Las tres cepas que contenían un alelo de *aroG** resistente a la retroalimentación produjeron más ácido mucónico que la cepa isogénica que contiene el alelo de *aroG* de tipo salvaje. En un experimento separado descrito en la presente memoria, cepa MYR205, que contenía *aroG* en el plásmido multicopia pCP32AMP, produjo 1,5 g/L de ácido mucónico en un matraz oscilante. Por lo tanto, los autores de la presente invención han demostrado que la combinación de Δ *tyrR* y *aroG** de copia única cromosómica puede funcionar bien en comparación con un plásmido *aroG* isogénico que contiene cepa para producir ácido mucónico en matraces oscilantes. La estabilidad genética superior inherente de los alelos cromosómicos en comparación con los alelos plasmídicos, más la atenuación de la necesidad de un medio selectivo para mantenerse en un plásmido, hace que las nuevas cepas descritas en la presente memoria sean más adecuadas para fermentaciones comerciales a gran escala. Adicionalmente, no se requirió ningún inductor químico para la expresión de los genes de la ruta del ácido mucónico. Por lo tanto, las cepas de la presente invención descrita anteriormente se mejoran con respecto a las de la técnica anterior (Niu et al., 2002), todas las cuales contienen el gen para la expresión en exceso de DAHP sintasa en un plásmido multicopia no deseable.

De forma similar a la descrita anteriormente para AroG, una mutación que conduce a una isozima AroF o AroH que es resistente a la inhibición por retroalimentación mediante tirosina puede instalarse en un plásmido o en el cromosoma. Una mutación preferida es una mutación puntual que cambia el aminoácido 148 de AroF de prolina a leucina, por ejemplo cambiando el codón 148 de CCG a CTG (Weaver et al., 1990), para proporcionar un gen llamado *aroF**. Otros alelos de *aroF** pueden aislarse por resistencia a análogos de tirosina (por ejemplo, o-fluorotirosina, m-fluorotirosina, p-fluorofenilalanina, etc.) de forma análoga a la descrita anteriormente para los alelos de *aroG**. Los alelos *aroF** pueden seleccionarse, enriquecerse y transducirse mediante unión a un transposón o a una inserción de resistencia a kanamicina, por ejemplo, en un Δ *yfiR::kan* estrechamente ligado como en una cepa como JW2584 (CGSC 10051, Coli Genetic Stock Center, Universidad de Yale).

Ejemplo 3

Deleción de *aroE* a partir del ADN cromosómico y producción de ácido mucónico

En este ejemplo, se investigó el efecto de la expresión en exceso de *aroB* y *aroG* en plásmidos multicopia así como en la expresión de genes que codifican proteínas funcionales en la ruta del ácido mucónico. Se utilizó la cepa MYR34 que contiene una deleción en el gen *aroE* que codifica la shikimato deshidrogenasa como cepa parental en estos estudios. La eliminación de la copia cromosómica de *aroE* se llevó a cabo de una manera similar a la descrita anteriormente en el Ejemplo 1. Cuando MYR34 se transformó con el plásmido pCP32AMP que expresaba en exceso el gen *aroG* que codificaba la proteína DAHP sintasa funcional en la ruta del ácido shikímico, hubo un aumento significativo en la acumulación de DHS. Cuando MYR34 se transformó con el plásmido que expresa *aroB* de un

promotor constitutivo, no se observó un aumento significativo de acumulación de DHS. Sin embargo, cuando la cepa MYR34 de *E. coli* se transformó con el plásmido que expresa ambos genes *aroB* y *aroG*, hubo un aumento de acumulación de DHS que se observó con MYR34 transformada con *aroG* solo, lo que sugiere que *aroB* es un cuello de botella secundario en la producción de DHS (Figura 5).

En los experimentos presentados en la Figura 6, se examinó efecto de una copia adicional del gen *aroB* integrado en el ADN cromosómico del anfitrión. En la cepa MYR170 de *E. coli* derivada de MYR34, una copia adicional del gen *aroB* bajo el control del promotor P_{15} se integró en el cromosoma del anfitrión en el locus *ack*. Cuando la cepa MYR170 se transformó con el plásmido pCP32AMP, hubo un ligero aumento de la acumulación de DHS en comparación con la acumulación de DHS detectada en la cepa MYR34 transformada con el mismo plásmido. Este ligero aumento de la acumulación de DHS en MYR170 se puede atribuir a una copia adicional del gen *aroB* integrado en el ADN cromosómico del anfitrión. Cuando MYR170 se transformó con pCP54 expresando ambos genes *aroB* y *aroG*, hubo un aumento adicional de la acumulación de DHS sugiriendo que *aroB* es un cuello de botella secundario en la producción de DHS.

La Figura 7 proporciona los resultados sobre la producción de ácido mucónico con las cepas MYR34 y MYR170 de *E. coli*. Habiendo establecido que en las cepas MYR34 y MYR170 de delección de *aroE*, con la expresión en exceso de los genes *aroB* y *aroG* hay una acumulación de DHS, se hicieron esfuerzos para ver si la expresión de los genes de "ruta mucónica" que codifican las proteínas funcionales en la ruta de producción de ácido mucónico conduciría a la conversión de DHS en ácido *cis,cis*-mucónico. En estos experimentos, las cepas de *E. coli* MYR34 y MYR170 se transformaron con el plásmido pMG37 solo o con ambos plásmidos pMG37 y pCP32AMP. El plásmido pMG37 expresa los genes *aroZ*, *aroY* y *catAX* que codifican proteínas funcionales en la ruta del ácido mucónico. La producción de ácido mucónico tanto en MYR34 como en MYR170 aumentó cuando estas cepas bacterianas se transformaron con los plásmidos pCP32AMP y pMG37 en comparación con la producción de ácido mucónico en estas dos cepas transformadas solo con el plásmido pMG37, lo que sugiere que en estas cepas la expresión de *aroB* es el cuello de botella para la producción de ácido *cis,cis*-mucónico.

Ejemplo 4

Expresión en exceso de *tktA*

La transcetolasa codificada por *tktA* es una enzima clave en la ruta de la pentosa fosfato y se cree que es limitante para la producción de eritrosa-4-fosfato, uno de los productos intermedios clave en la producción de ácido mucónico. Se sabe que la expresión en exceso de *tktA*, que codifica la transcetolasa, instalando el gen con su promotor nativo en un plásmido multicopia (Sprenger et al., 1995, 1995a), mejora el flujo en la ruta aromática (Draths et al., 1992). Sin embargo, tales plásmidos son inestables, y a menudo requieren selección con antibióticos para su mantenimiento. Otro enfoque en la técnica anterior era añadir una copia adicional del gen *tktA* al cromosoma de la cepa anfitriona (Niu et al., 2002). Sin embargo, una copia adicional de *tktA* con su promotor nativo no es suficiente para saturar la ruta aromática con eritrosa-4-fosfato, ya que su promotor nativo no está muy cerca del ideal. Como tal, el procedimiento necesita una mejora sustancial.

Se puede obtener una potenciación de la expresión en exceso de *tktA*, por ejemplo, sustituyendo el promotor *tktA* nativo en el cromosoma por un promotor constitutivo fuerte, por ejemplo un promotor P_{15} o P_{26} del fago SPO1 de *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 2, respectivamente), o el P_R promotor del bacteriófago lambda (SEQ ID NO. 3). Esto se lleva a cabo en dos etapas como se describe en el Ejemplo 1, excepto que se utiliza el casete *cam^R*, *sacB* para reemplazar el promotor de *tktA* cromosómico nativo en la primera etapa. En la segunda etapa, el promotor constitutivo fuerte se instala transformando con un ADN lineal que comprende el promotor constitutivo fuerte, flanqueado por al menos 50 bases del extremo 5' de la región codificante de *tktA* en el lado de aguas abajo y al menos 50 pares de bases de homología inmediatamente aguas arriba del promotor nativo de *tktA* en el lado aguas arriba del promotor constitutivo fuerte, y seleccionando mediante resistencia a la sacarosa. La expresión mejorada a partir de dicho casete de expresión también se consigue aumentando la estabilidad del ARNm que se transcribe a partir del casete de expresión. La mejora de la estabilidad del ARNm se logra al agregar una estructura tallo-bucle en el extremo 5' del ARNm, en el extremo 3' del ARNm o en ambos. Una estructura tallo-bucle está a menudo presente al final de un ARNm que está terminado naturalmente con un terminador de transcripción independiente de rho, pero si no lo es, se puede añadir un terminador de transcripción independiente de rho a la secuencia de ADN por medio de métodos de modificación genéticas bien conocidos (ligación, PCR, etc.). Tal terminador puede estar compuesto por una repetición invertida de entre 4 y 20 bases en cada repetición, separada por un "bucle" de 3 o más bases, y seguida de una región de una o más bases que se enriquece en T (desoxitimidina). Las repeticiones invertidas son ricas en G y C (desoxiguanidina y desoxicitidina). De manera similar, se puede construir un tallo-bucle en el extremo 5' de un ARNm insertando una secuencia de ADN inmediatamente aguas abajo desde el punto de inicio de la transcripción, pero antes del sitio de unión al ribosoma, que contiene un tallo-bucle como se describió anteriormente, pero sin la región enriquecida en T. Un ejemplo de esto se proporciona en asociación con el promotor P_{15} (SEQ ID NO. 1).

En el análisis del efecto de la expresión en exceso del gen *tktA* en el flujo de carbono a través de la ruta del ácido shikímico, se utilizó la cepa MYR170 de *E. coli* como cepa parental. MYR170 tiene una delección en el gen *aroE* que

codifica la enzima shikimato deshidrogenasa y una copia adicional del gen *aroB* en el locus *ack*.

En los experimentos descritos en las Figuras 8, 9 y 10, se utilizaron dos plásmidos diferentes, a saber, pCP32AMP y pCP50. El plásmido pCP32AMP expresa solo el gen *aroG* de la DAHP sintasa a partir de su promotor nativo y el plásmido pCP50 expresa el gen *tktA* de la transcetolasa a partir de su promotor nativo junto con el gen *aroG*. MYR170, que tenía una delección de *aroE* y una copia adicional del gen *aroB* bajo el control del promotor P₁₅ integrado en el locus *ack* del ADN cromosómico, se transformó individualmente con los plásmidos pCP32AMP y pCP50. Como se muestra en la Figura 8, la acumulación de DHS se incrementó adicionalmente con la expresión del gen *aroG* junto con el gen *tktA* en comparación con las células de *E. coli* que expresan solo el gen *aroG*.

La Figura 9 proporciona datos sobre el rendimiento de DHS en dos cepas diferentes, a saber, MYR34, MYR170 transformadas con el plásmido pCP32AMP o pCP50. La cepa MYR34 que tiene la delección del gen *aroE* produjo 0,1 gramos de DHS por gramo de glucosa consumida. El rendimiento de DHS en el MYR34 aumentó a 0,15 gramos de DHS por gramo de glucosa consumida cuando esta cepa se transformó con el plásmido pCP32AMP con expresión en exceso del gen *aroG*. MYR170 tiene una copia adicional de *aroB* gen insertada en el locus *ack*. Como resultado de la presencia de esta copia adicional del gen *aroB*, el rendimiento para la producción de DHS en la cepa MYR170 transformada con pCP32AMP fue ligeramente mayor que el rendimiento de DHS observado en la cepa MYR34 transformada con pCP32AMP. Por lo tanto, la presencia de una copia adicional de *aroB* en MYR170 causó un aumento del flujo de carbono a través de la ruta del ácido shikímico. Se observó un aumento adicional de rendimiento de DHS cuando la cepa MYR170 se transformó con el plásmido pCP50 que expresa ambos genes *aroG* y *tktA*. Por lo tanto, la presencia de una copia adicional de *tktA* representó un aumento del flujo de carbono a través de la ruta del ácido shikímico. Más específicamente, el efecto de la presencia de los genes *aroB* y *tktA* causó un efecto aditivo sobre el rendimiento de DHS.

MYR261 utilizada en los experimentos descritos en la Figura 10 fue diseñada para integrar una copia adicional del gen *tktA* en el ADN cromosómico de MYR170 en el locus *poxB*. El reemplazo del gen deseado (*poxB::tktA*) en la cepa MYR261 se confirmó mediante PCR. MYR261 se transformó con el plásmido pCP32AMP (expresión en exceso de *aroG*) o el plásmido pCP50 (expresión en exceso *aroG* y *tktA*). Como control, MYR170 se transformó con el plásmido pCP32AMP. Como indica el resultado mostrado en la Figura 10, la presencia de una copia adicional del gen *tktA* en el ADN cromosómico de MYR261 aumentó el título para la producción de DHS con el plásmido pCP32AMP cuando se comparó con el título para la producción de DHS observado en la cepa MYR170 transformada con el mismo plásmido. Un aumento adicional en el nivel de transcetolasa en la cepa MYR261 cuando se transformó con el plásmido pCP50 que expresa en exceso transcetolasa condujo a un aumento adicional del título para la producción de DHS. La enzima codificada por *poxB*, PoxB, o piruvato oxidasa, produce acetato como producto de reacción. Como tal, la eliminación de *poxB* que resulta de la inserción de *tktA* como se describe en la presente memoria, elimina una ruta potencialmente activa para la producción de acetato. Del mismo modo, la inserción simultánea de P₁₅*aroB* y eliminación de *ackA*, que codifica AckA o acetato-quinasa, como se describe más adelante en el Ejemplo 12 siguiente, elimina otra ruta potencialmente activa para el acetato. La producción de acetato generalmente no es deseable en las fermentaciones (Jantama et al., 2008b). Como tales, estas delecciones pueden ser útiles para reducir la producción de acetato.

La Figura 11 proporciona el título para la producción de ácido mucónico y ácido acético en las cepas MYR170, MYR261 y MYR305 de *E. coli* después de la transformación con los plásmidos pCP32AMP y pMG37. MYR305 se obtiene de MYR170 mediante eliminación del gen *poxB* del ADN cromosómico, mientras que MYR261 es un derivado MYR170 en donde el gen *poxB* ha sido desactivado mediante la inserción de una copia adicional del gen *tktA*. Como se mencionó anteriormente, el plásmido pCP32AMP expresa el gen *aroG* que codifica el gen para la proteína DAHP sintasa que funciona en la ruta biosintética del ácido shikímico que conduce a la acumulación de DHS debido a la eliminación del gen *aroE* en las cepas MYR170, MYR261 y MYR305 de *E. coli*. Con la expresión de los genes de la ruta mucónica a saber *aroZ*, *aroY* y *catAX* en el plásmido pMG37, el DHS se convierte en ácido cis,cis-mucónico como se ilustra en la Figura 2. Con la presencia de una copia adicional del gen *aroB* y el gen *tktA* en la cepa MYR261, hubo un ligero aumento en la producción de ácido mucónico acompañado de una disminución de la acumulación de ácido acético.

Ejemplo 5

Expresión en exceso de *talA* o *talB*

El gen *talB* codifica la transaldolasa predominante en *E. coli*, pero el gen *talA* también codifica una transaldolasa menor. Se sabe que la producción en exceso de transaldolasa mejora el flujo en la ruta aromática (Lu y Liao, 1997; Sprenger, 1995; Sprenger et al, 1995b). En la técnica anterior, esto se logró mediante la expresión en exceso del gen *tal* (ahora conocido como gen *talB*) en un plásmido multicopia de su promotor nativo (Lu et al., 1997, Sprenger et al., 1995b). Sin embargo, tales plásmidos son inestables y requieren selección con antibióticos para su mantenimiento. Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento mejorado. Se puede obtener la potenciación de la expresión de *talB*, por ejemplo, sustituyendo el promotor de *talB* nativo en el cromosoma por un promotor constitutivo fuerte, por ejemplo un promotor P₁₅ o P₂₆ del fago SPO1 de *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 2, respectivamente), o el promotor P_R del bacteriófago lambda (SEQ ID NO. 3). Esto se lleva a cabo en dos

etapas como se describe en el Ejemplo 1, excepto que se utiliza el casete *cam^R*, *sacB* para reemplazar el promotor cromosómico de *talB* nativo en la primera etapa. En la segunda etapa, el promotor constitutivo fuerte se instala mediante transformación con un ADN lineal que comprende el promotor constitutivo fuerte, flanqueado por al menos 50 bases del extremo 5' de la región codificante de *talB* en el lado de aguas abajo y al menos 50 pares de bases de homología inmediatamente aguas arriba del promotor de *talB* nativo en el lado aguas arriba del promotor constitutivo fuerte, y seleccionando para la resistencia a la sacarosa. El gen *talA* también puede ser expresado en exceso por un método similar, pero se prefiere expresar en exceso el gen *talB*, ya que codifica la actividad predominante (Sprenger, 1995; Sprenger et al, 1995b). Véase el Ejemplo 4 para más detalles sobre la construcción del casete de expresión diseñado para la expresión en exceso.

Ejemplo 6

Expresión de los genes *aroZ*, *aroY* y *catAX*

Para demostrar la conversión de DHS endógeno producido por *E. coli* en ácido mucónico, se clonaron los genes heterólogos *catAX* de *Acinetobacter sp. ADP1*, *aroY* de *Klebsiella pneumoniae*, y *quiC* de *Acinetobacter sp. ADP1*, bajo promotores constitutivos fuertes (*P₁₅*, *P_R*, y *P₂₆*, respectivamente) en un plásmido de bajo número de copias, pCL1921 (Lerner e Inouye, 1990) para generar un "plásmido mucónico" pMG37. Los derivados de la cepa MYR34 que portan el vector vacío (pCL1921) o pMG37 se cultivaron a 37°C durante 17 h. en un medio de matraz oscilante (medio mínimo NBS con un suplemento de aminoácidos aromáticos y vitaminas) que contenía glucosa al 2%. Los sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante HPLC. A diferencia de MYR34/pCL1921 que muestra acumulación de DHS, MYR34/pMG37 muestra producción de ácido mucónico (Figura 12). No se detectaron cantidades significativas de DHS o productos intermedios, tales como PCA y catecol, de la última cepa, lo que sugiere que los genes heterólogos expresados a partir de pMG37 eran funcionales y suficientes.

Ejemplo 7

Comparación de homólogos de *AroZ*

Se compararon tres homólogos y análogos de *aroZ* diferentes (Figura 13) para determinar su capacidad para desviar DHS en la ruta de producción de ácido mucónico. Se informa de que *quiC* de *Acinetobacter sp. ADP1*, *asbF* de *Bacillus thuringiensis*, y *qa-4* de *Neurospora crassa*, que codifican proteínas que tienen actividad similar a *AroZ* (Elsemore y Ornston, 1995; Fox et al, 1995; Rutledge, 1984). Cada uno de estos genes se había sometido a optimización de codones para su expresión en *E. coli* y sintetizado por GeneArt (Invitrogen), y clonado bajo un promotor *P₂₆* constitutivo fuerte en un 'plásmido mucónico' de bajo número de copias que también expresa los genes *catAX* y *aroY* a partir de los promotores *P₁₅* y *P_R*, respectivamente. Se cultivaron MYR34/pCL1921, MYR34/pMG37 (plásmido mucónico con *quiC* como *aroZ*), MYR34/pMG47 (plásmido mucónico con *asbF* como *aroZ*), y MYR34/pMG70 (plásmido mucónico con *qa-4* como *aroZ*) a 37°C durante 48 h. en matraces oscilantes con medio mínimo que contenía glucosa al 2%, los aminoácidos aromáticos y vitaminas aromáticas. Los sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante HPLC. Como era de esperar, MYR34 transformada con el vector vacío acumuló DHS y no produjo ácido mucónico. Los dos homólogos de *aroZ* y el único análogo examinados fueron funcionales para desviar DHS hacia la producción de ácido mucónico, pero en un grado variable. El derivado MYR34 que expresa el gen *quiC* fue el más robusto y mostró casi 100% de conversión de DHS en ácido mucónico con una cantidad insignificante de retención de DHS. El derivado MYR34 que expresa el homólogo de *aroZ* fúngico, *qa-4*, seguía de cerca con aproximadamente 80% de conversión de DHS en ácido mucónico y 20% de retención de DHS. Por último, el derivado MYR34 que expresa el gen *asbF* mostró solo 50% de conversión de DHS en ácido mucónico y 50% de retención de DHS. Tomados en conjunto, bajo condiciones de ensayo de matraz oscilante de los autores de la presente invención, la expresión y/o actividad del gen *quiC* parecían ser las más altas en comparación con los otros homólogos de *AroZ*.

Ejemplo 8

Integración cromosómica de *catAX*, *aroY* y *quiC*

El ácido mucónico puede ser producido por cepas que contienen solo copias únicas integradas cromosómicamente de *catA-X*, *aroY* y *quiC* expresados a partir de promotores constitutivos en el locus *adhE*.

MYR170 (Δ *aroE*, Δ *ack::P₁₅-aroB*), una gran productora de DHS, fue la cepa anfitriona utilizada para integrar los genes de la ruta del ácido mucónico en el locus *adhE* en el cromosoma (SEQ ID NO. 41). La cepa MYR352 resultante se transformó con los plásmidos YEp24 (número medio de copias, vector vacío), pCP32AMP (número medio de copias, *aroB* expresado a partir del promotor nativo), o pCP50 (número medio de copias, *aroG* y *tktA* expresados por sus respectivos promotores nativos) para generar cepas derivadas. Los dos últimos plásmidos se utilizaron para aumentar la producción de DHS. Las cepas se cultivaron a 37°C durante 72 h. en medio de matraz oscilante que contenía glucosa al 2% como se describió anteriormente. Los sobrenadantes se recogieron a las 72 h. y se analizaron mediante HPLC. Como se esperaba, los derivados de MYR352 transformados con *aroG* y *aroG/tktA* mostraron un aumento global en la formación total del producto en comparación con un control de vector vacío.

(Figura 14). Todos los transformantes de MYR352 produjeron títulos medibles de ácido mucónico, demostrando por primera vez que el ácido mucónico puede ser producido por una cepa que contiene solo genes de la "vía mucónica" integrados y sin suministro de un inductor químico de la expresión génica.

No todo el DHS que se produjo en cualquiera de estas cepas derivadas de MYR352 se convirtió en el ácido mucónico producto final. En cambio, hubo una cantidad significativa de acumulación de catecol (Figura 14), lo que sugiere que la expresión o actividad de *catAX* es limitante cuando se expresa a partir de una única copia en el cromosoma. Dado que el intermedio de acumulación principal era el catecol, es probable que la expresión génica y/o la actividad de *quiC* y *aroY* sean suficientes en el fondo de la cepa MYR352 para la síntesis de ácido mucónico.

Los derivados de la cepa MYR352 se compararon en paralelo con derivados análogos de la cepa MYR219. La cepa MYR219 es la misma que la cepa MYR170 pero contiene una copia del plásmido pMG37 que expresa los genes de la ruta del ácido mucónico. Por lo tanto, la principal diferencia entre las cepas MYR352 y MYR219 es con referencia a la dosificación de los genes de la ruta del ácido mucónico (1 copia frente a aproximadamente 5 copias, respectivamente). A diferencia de las cepas derivadas de MYR352, las cepas derivadas de MYR219 mostraron muy poca acumulación de catecol u otros compuestos intermedios, y produjeron con éxito el ácido mucónico producto final. En conjunto, estos resultados indican la necesidad de aumentar la actividad de *catAX* en cepas tales como MYR352.

Ejemplo 9

Expresión de *catAX*

La acumulación de catecol y la producción ineficaz de ácido mucónico en la cepa MYR352 se debe a la limitación de la dosis y/o la actividad del producto o productos génicos de *catAX*. Como se describió anteriormente, MYR352 contiene $\Delta aroE$, $\Delta ack::P_{15}-aroB$ y copias únicas integradas cromosómicamente de los genes *catAX*, *aroY* y *quiC* bajo promotores constitutivos fuertes. Esta cepa se transformó con control de vector vacío (YEp24) de número medio de copias o plásmido de expresión de *aroG/tktA* (pCP50) para aumentar el flujo de carbono en la ruta de síntesis de aminoácidos aromáticos y producir grandes cantidades de DHS. El crecimiento de cepas transformadas a 37°C durante 72 horas en medio de matraz oscilante complementado con glucosa al 2% como se describió anteriormente dio como resultado la acumulación de catecol intermedio. Este resultado sugiere que la actividad de *catAX* puede ser insuficiente en MYR352. Para confirmar esta hipótesis, se sometió a ensayo la capacidad de uno o más genes de la ruta del ácido mucónico expresados a partir del plásmido de bajo número de copias para aliviar la acumulación de catecol en MYR352/pCP50 (Figura 15). Específicamente, MYR352/pCP50 se transformó adicionalmente con control de vector vacío de bajo número de copias (pCL1921) o plásmidos que expresan los tres genes, dos genes o un gen de la ruta de producción de ácido mucónico. Las cepas derivadas se analizaron en un experimento de matraz oscilante como se describió anteriormente. Si bien el aumento de la dosificación de *aroY* solo (a partir de pMG27) o *quiC* solo (a partir de pMG39) no aliviaba la acumulación de catecol, la expresión de todos los genes de la ruta del ácido mucónico (a partir de pMG37) o *catAX* y *aroY* juntos (a partir de pMG33), dio como resultado una conversión satisfactoria de catecol en ácido mucónico. Además, la expresión de *catAX* solo (a partir de pMG31) fue suficiente para la producción de ácido mucónico y para evitar la acumulación de catecol.

Ejemplo 10

Construcción de una mutación de *aroE* con pérdida de función parcial

En el procedimiento de la técnica anterior para producir ácido *cis,cis*-mucónico, la cepa anfitriona contiene una mutación en el gen *aroE* denominada *aroE353*, que es una mutación nula. Como resultado, la cepa requiere el suministro de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y vitaminas aromáticas elaboradas a partir de la ruta del shikimato (ácido p-hidroxibenzoico, ácido p-aminobenzoico y ácido 2,3-dihidroxibenzoico). Los aminoácidos aromáticos son demasiado costosos para ser suministrados en un procedimiento comercialmente atractivo. Como tal, el procedimiento de la *técnica anterior* necesita una mejora sustancial. Esto se puede lograr instalando una versión del gen *aroE* con pérdida de función parcial, que los autores de la presente invención denominarán *aroE**. Las mutaciones con pérdida de función parcial se obtienen generando en primer lugar una mutación sin sentido que cambia un aminoácido en la secuencia codificante de *aroE* que da como resultado un fenotipo nulo. Esto se puede lograr mediante cualquier forma de mutagénesis y escrutinio para auxotrofia simultánea para los seis compuestos aromáticos enumerados anteriormente. Un método preferido es crear un conjunto de mutantes de genes *aroE* mediante mutagénesis por PCR propensa a errores, utilizando ADN polimerasa *Taq*, utilizando ADN genómico de tipo salvaje de *E. coli* C como molde, y utilizando cebadores oligonucleotídicos de PCR que hibridan con aproximadamente 1000 pares de bases aguas arriba y 1000 pares de bases aguas abajo de la región codificante de *aroE*. El conjunto resultante de moléculas de ADN lineal se utiliza para transformar un derivado de *E. coli* C que produce ácido *cis,cis*-mucónico y que contiene un casete integrado *cam^R*, *sacB* que ha reemplazado la región codificante de *aroE* (véase el Ejemplo 4 para un ejemplo relacionado), y seleccionar para la resistencia a la sacarosa. Los transformantes se escrutan a continuación para detectar auxótrofos que han perdido la resistencia al cloranfenicol y requieren los seis compuestos aromáticos enumerados anteriormente. Se recogen varios auxótrofos independientes y se someten a ensayo para comprobar su capacidad de reproducción sembrando aproximadamente

10⁷, 10⁸ o 10⁹ células (enjuagadas en medio mínimo de glucosa) en una placa de glucosa mínima sin los seis compuestos aromáticos. Los revertientes que dan lugar a colonias en las placas se recogen y se someten a ensayo para la producción de ácido *cis,cis*-mucónico, pero sin producción de niveles sustanciales de aminoácidos aromáticos. Entre dichos revertientes habrá cepas que porten una o más mutaciones en el gen *aroE*, de manera que la enzima AroE proporciona suficientes aminoácidos aromáticos y vitaminas para el crecimiento, pero no un excedente de estos compuestos aromáticos. Otro método para obtener un mutante *aroE* con pérdida de función parcial es instalar uno de los mutantes de *aroE* revertibles clásicos, tales como *aroE353* y *aroE24* (ambos disponibles en el Coli Genetic Stock Center en la Universidad de Yale, New Haven, CT, EE.UU.), en una cepa productora de ácido *cis,cis*-mucónico, y seleccionar para revertientes como se describió anteriormente.

Ejemplo 11

Importación de glucosa mediante difusión facilitada

Uno de los sustratos en la primera etapa comprometida de la ruta aromática es el fosfoenolpiruvato (PEP). El PEP también es la fuente de fosfato y energía para importar glucosa y algunos otros azúcares mediante el sistema de fosfotransferasa bacteriana (PTS). Por lo tanto, cuando una bacteria crece con un azúcar dependiente de PTS, existe competencia entre la PTS y la ruta aromática para PEP. Como tal, se puede lograr una mejora significativa en el flujo creciente a la ruta aromática eliminando la PTS y proporcionando una ruta alternativa para la captación de azúcar. Una solución a este problema es reemplazar la PTS por permeasa GalP de *E. coli*, un simportador de protones que funciona razonablemente bien para la captación de glucosa (Patente de Estados Unidos Núm. 6.692.794). Sin embargo, el simportador de protones todavía utiliza energía para mantener el gradiente de protones que es necesario para conducir la permeasa. Como tal, existe la necesidad de una mejora adicional del en el procedimiento.

Algunos azúcares, tales como la xilosa, pueden ser importados por una proteína transportadora que obtiene energía de la hidrólisis del ATP (trifosfato de adenosina). Una vez más, si el transportador dependiente de energía puede ser reemplazado por un transportador que requiere menos energía, se puede realizar una mejora, ya que la energía inherente al ATP se puede conservar para otros usos beneficiosos.

Se puede obtener una mejora significativa utilizando un transportador de difusión facilitada, que no gasta energía para la importación del azúcar (Parker et al, 1995; Snoep et al, 1994). Por ejemplo, el facilitador de glucosa de *Zygomonas mobilis*, codificado por el gen *glf*, puede utilizarse en lugar de, o además de, la PTS en cepas productoras de 3-deshidroxiquinonato (DHS) (Yi et al., 2003). Sin embargo, estas cepas aún dependen, al menos parcialmente, de GalP para la importación de glucosa. Puesto que GalP requiere energía en forma de un gradiente de protones para la importación de glucosa, es necesario mejorar la eficiencia de la importación de glucosa para las cepas productoras mucónicas.

Un casete para la expresión de *glf* más un gen de glucoquinasa, *glk*, también de *Z. mobilis*, se puede ensamblar con un promotor constitutivo fuerte, por ejemplo P₂₆. Este casete puede integrarse a continuación en el genoma de una cepa anfitriona en una ubicación que no interferirá con la producción del compuesto deseado, que en este caso es ácido *cis,cis*-mucónico. Un ejemplo de tal ubicación en el cromosoma de *E. coli* es el operón de degradación de treonina, *tdcABCDEF*G. Si el medio de crecimiento no contiene treonina, este operón no es necesario ni expresado, por lo que la inserción de un casete de expresión en ese operón no interfiere en el metabolismo.

Para lograr la mejora descrita anteriormente, se eliminan uno o más de los genes que codifican una función PTS, utilizando un método similar al descrito en el Ejemplo 1. Por ejemplo, se pueden suprimir uno o más de *ptsH*, *ptsI*, *ptsG*, o *ptsK*. Después se suprime *galP*. A continuación se puede instalar el casete P₂₆-*glf*, *glk* en dos etapas, similares a las descritas en el Ejemplo 1. En la primera etapa, se integra un casete *cam^R*, *sacB* en el operón *tdc*, utilizando un ADN lineal derivado de pAC21 (SEC ID NO. 15), con selección para la resistencia al cloranfenicol (30 mg/L). En la segunda etapa, el casete P₂₆-*glf*, *glk* se integra en el operón *tdc*, utilizando un ADN lineal derivado de pAC19 (SEC ID NO. 15), con selección para la resistencia a la sacarosa y escrutinio para determinar la sensibilidad al cloranfenicol, y en este caso, mejora del crecimiento en un medio de glucosa mínimo.

Para someter a ensayo si la difusión facilitada de glucosa podría sustituir los sistemas convencionales de importación de glucosa en *E. coli*, se suprimieron los genes *ptsHI* y el gen *galP* de MYR34 (Δ *aroE*), y a continuación el casete P₂₆-*glf*, *glk* se integró en el operón *tdc*, utilizando un ADN lineal derivado de pAC19 (SEC ID NO. 14), para proporcionar la cepa MYR217. MYR217 crece razonablemente bien en un medio de glucosa mínimo complementado con los tres aminoácidos aromáticos requeridos y tres compuestos aromáticos similares a las vitaminas (Figura 16). Sin embargo, la cepa MYR31, que contiene delecciones de *ptsHI* y *galP*, pero no contiene el casete *glf*, *glk* no mostró ningún crecimiento medible (Figura 16). Por lo tanto, la difusión facilitada es suficiente para reemplazar los dos sistemas convencionales de importación de glucosa en nuestro fondo de cepa.

Para someter a ensayo si la difusión facilitada es útil para producir compuestos derivados de la ruta aromática, MYR34 y MYR217 se transformaron con pCP54 (*aroG*, *aroB*) y pCP55 (*aroG*, *aroB*, *tktA*). Se comparó la producción del intermedio 3-deshidroxiquinonato aromático (DHS) en matraces oscilantes para estas dos cepas (Figura 17). Con

pCP54 o pCP55, la cepa que utiliza difusión facilitada produjo tanto o más DHS que las cepas que utilizan los sistemas convencionales de importación de glucosa. La producción de DHS es un buen indicador de la producción de ácido mucónico en cepas *E. coli* modificadas genéticamente, por lo que los autores de la presente invención pueden concluir que la difusión facilitada de glucosa es una mejora útil para la producción de ácido mucónico.

Ejemplo 12

Expresión en exceso del gen *aroB*

Se informa de que la expresión del gen *aroB* limita la velocidad de producción de ácido *cis,cis*-mucónico (Niu et al., 2002). En la técnica anterior, esto se resolvió supuestamente integrando una segunda copia del gen *aroB* con su promotor nativo. Sin embargo, esto es insuficiente para aliviar la limitación de *aroB*, ya que el promotor nativo y el sitio de unión al ribosoma del gen *aroB* están lejos de ser ideales. Como tal, el procedimiento necesita una mejora sustancial.

La potenciación de la expresión en exceso de *aroB* se puede obtener, por ejemplo, reemplazando el promotor de *aroB* en el cromosoma por un promotor constitutivo fuerte, por ejemplo un promotor P₁₅ o P₂₆ del fago SPO1 de *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 2, respectivamente), o el promotor P_R del bacteriófago lambda (SEQ ID NO. 3). Esto se logra en dos etapas como se describe en el Ejemplo 4, excepto que se utiliza el casete *cam^R*, *sacB* para reemplazar el promotor de *aroB* cromosómico nativo y/o el sitio de unión al ribosoma en la primera etapa. En la segunda etapa, se instala el promotor constitutivo fuerte mediante transformación con un ADN lineal que comprende el promotor constitutivo fuerte, seguido de un sitio de unión al ribosoma y al menos 50 bases desde el extremo 5' de la secuencia codificante de *aroB*, incluyendo el codón de inicio ATG, en el lado aguas abajo, y al menos 50 pares de bases de homología inmediatamente aguas arriba del promotor de *aroB* nativo en el lado aguas arriba del promotor constitutivo fuerte, y mediante selección para la resistencia a la sacarosa. Además de, o en lugar de, instalar un promotor más fuerte, utilizando un método similar, se puede instalar un sitio de unión al ribosoma más fuerte, por ejemplo, AGGAGG, de 4 a 10 pares de bases aguas arriba del codón de inicio de la traducción ATG de *aroB*. Una copia de dicho casete sintético, por ejemplo, un casete *PAG₁₅-aroB*, se puede integrar en el cromosoma en un locus distinto del locus *aroB* nativo, por ejemplo en el locus *ack*. La delección simultánea del gen *ack*, así como la delección del gen *poxB* como en el Ejemplo 4 puede ayudar a reducir la formación de acetato no deseado durante las fermentaciones.

Ejemplo 13

Disminución del flujo a través de la rama oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato

La eritrosa-4-fosfato que se necesita para la primera etapa comprometida en la ruta aromática se obtiene a partir de la porción no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfatos (PPP). Existen dos rutas diferentes mediante las cuales el carbono puede ingresar a la PPP. La primera es a partir de glucosa-6-fosfato por las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (codificada por el gen *zwf*), 6-fosfogluconolactonasa (codificada por el gen *pgl*) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (codificada por el gen *gnd*), para proporcionar ribulosa-5-fosfato. En la última de estas tres etapas, se pierde un carbono en forma de CO₂. Esta ruta hacia la PPP se denomina rama oxidativa de la PPP. La ribulosa-5-fosfato a continuación se convierte en una variedad de otros azúcares fosfato por la acción de isomerasas, epimerasas, transcetolasas y transaldolasas. Este grupo de reacciones reversibles, que comienza con ribulosa-5-fosfato, se denomina rama no oxidativa de la PPP. La segunda ruta por la cual el carbono puede ingresar en la PPP es a través de la fructosa-6-fosfato y la gliceraldehído-3-fosfato (ambas provienen de la ruta Embden-Myerhoff, también conocida como glicólisis), que se combinan y se reordenan mediante transaldolasa y transcetolasa para proporcionar la variedad de otros azúcares fosfato, uno de los cuales es la eritrosa-4-fosfato. Si el carbono entra en la PPP a través de esta segunda ruta, no se pierde CO₂. Con el fin de mejorar el rendimiento del ácido *cis,cis*-mucónico de la glucosa, la pérdida de CO₂ puede prevenirse mediante el bloqueo de la rama oxidativa de la PPP, de modo que todo el carbono que ingrese a la PPP tenga que pasar por una ruta no oxidativa a partir de fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato. El bloqueo de la rama oxidativa de la PPP se lleva a cabo eliminando el gen *zwf*, utilizando un método de dos etapas similar al descrito en el Ejemplo 1 para eliminar el gen *tyrR*.

Ejemplo 14

Aumento del flujo hacia y a través de PEP a la ruta aromática

Es deseable asegurar que la PEP no sea un intermedio limitante de la velocidad en la ruta al ácido *cis,cis*-mucónico. Esto se logra, por ejemplo, aumentando el reciclaje de piruvato a PEP mediante la enzima PEP sintetasa, que se logra al integrar un casete de expresión en exceso del gen *pps* como se describió anteriormente en otros ejemplos. Otro enfoque es limitar el consumo de PEP por la piruvato quinasa, que en *E. coli* está codificada por los genes *pykA* y *pykF*. En este caso, el enfoque es disminuir la actividad de la enzima o enzimas. Esto se logra eliminando uno o más genes que codifican piruvato quinasa (como se describe en el Ejemplo 1 para *tyrR*), o reduciendo la fuerza de expresión de uno o más de estos genes, por ejemplo, mutando el promotor, el sitio de unión al ribosoma, o la secuencia codificante, de manera que el nivel de actividad de piruvato quinasa disminuya. Por ejemplo, el RBS

frente al gen *pykA* de *E. coli* es 5'CGGAGTATTACATG. El codón de inicio de traducción ATG está subrayado. Esta secuencia puede mutarse a CaGAGTATTACATG, CaaAGTATTACATG, CaatGTATTACATG, CaataTATTACATG, etcétera, de modo que la secuencia de RBS se hace menos parecida al RBS consenso de AGGAGG por un cambio de base a la vez. Cada versión mutada se introduce a continuación en el cromosoma en el locus *pykA*, reemplazando el tipo salvaje, y se miden los niveles de producción de ácido cis,cis-mucónico para determinar la mejora.

Ejemplo 15

Conferir crecimiento en sacarosa

Las cepas derivadas de *E. coli* C no crecen con sacarosa como única fuente de carbono. Sin embargo, pueden modificarse genéticamente para hacerlo tal como se describe en la Solicitud de Patente PCT PCT/US11/064598. Como tal, una cepa productora de ácido cis,cis-mucónico se puede modificar mediante ingeniería genética para que crezca en sacarosa como se describe en la solicitud mencionada anteriormente.

Ejemplo 16

Un productor mejorado de ácido cis,cis-mucónico

Todas las características descritas en los Ejemplos 1 - 15 se pueden combinar en una cepa de *E. coli* instalando las características una tras otra. La cepa resultante comprende un productor mejorado de ácido cis,cis-mucónico. La cepa resultante puede mejorarse adicionalmente integrando una segunda copia de cada casete de expresión en exceso descrito anteriormente, uno cada vez, en una ubicación separada de la ubicación de la primera copia. Un ejemplo de una ubicación conveniente y segura es un sitio de restricción *BsrB1* inmediatamente aguas abajo del terminador de *rrfF*, que codifica un ARN ribosomal. El casete deseado se liga en forma de un ADN lineal romo en el único sitio *BsrB1* del plásmido pMH17F (SEQ ID NO. 17). Un ejemplo es la ligadura del casete de expresión *catAX* para proporcionar un plásmido denominado pcatAX. En paralelo, se liga un casete *cam^R*, *SacB* en forma de un fragmento romo en pMH17F para proporcionar pMH28F (SEQ ID NO. 19). Se utiliza un ADN lineal derivado de pMH28 mediante PCR o mediante corte con enzimas de restricción para depositar el casete *cam^R*, *sacB* en el sitio *rrfF*. A continuación, se utiliza un ADN lineal derivado de pcatAX mediante PCR o mediante corte con enzimas de restricción para instalar la segunda copia del casete *catAX* en el locus *rrfF*, utilizando selección en sacarosa. La cepa resultante se compara a continuación con su cepa abuela para la producción de ácido cis,cis-mucónico para determinar que *catAX* era una etapa limitante. Mediante un método similar, cada casete de los Ejemplos 2 - 15 se somete a ensayo para determinar una etapa limitadora de la velocidad. Si se encuentra que una etapa es limitante de la velocidad, se integran una o más copias adicionales del casete relevante en otras ubicaciones apropiadas en el cromosoma, lo que lleva a mejoras adicionales en la producción de ácido cis,cis-mucónico, sin la necesidad para plásmidos o promotores inducibles.

Ejemplo 17

Producción de ácido cis,cis-mucónico por fermentación

El ácido cis,cis-mucónico puede ser producido por microorganismos modificados genéticamente descritos en los ejemplos 1-15 anteriores. El medio de crecimiento puede variar ampliamente y puede ser cualquier medio que soporte un crecimiento adecuado del microorganismo. Un medio preferido es un medio mínimo que contiene sales minerales y una fuente de carbono no aromático, tal como glucosa, xilosa, lactosa, glicerol, acetato, arabinosa, galactosa, manosa, maltosa o sacarosa (véase más arriba un ejemplo de un medio de crecimiento mínimo preferido). Para cada combinación de microorganismo y medio de cultivo, las condiciones apropiadas para producir ácido cis,cis-mucónico se determinan mediante experimentos rutinarios en los que los parámetros de fermentación se cambian sistemáticamente, tal como temperatura, pH, tasa de aireación y compuesto o compuestos utilizados para mantener el pH. A medida que se produce el ácido cis,cis-mucónico, se deben introducir uno o más compuestos en el fermentador para evitar que el pH disminuya demasiado. Los compuestos preferidos para neutralizar el ácido incluyen sales alcalinas tales como óxidos, hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de amonio, sodio, potasio, calcio, magnesio o una combinación de dos o más de tales sales alcalinas.

Producción de ácido mucónico por la cepa MYR428 de *E. coli* en un fermentador de 7 litros se muestra en la Figura 18. La cepa MYR261 de *E. coli* con un genotipo $\Delta\text{aroE } \Delta\text{ackA}::\text{PAG}_{15}\text{-aroB}\Delta\text{poxB}::\text{tkTA}$ se transformó con los plásmidos pCP32AMP y pMG37 para generar MYR428. MYR428 se hizo crecer en un fermentador de 7 litros como se describió anteriormente con alimentación de glucosa durante 48 horas. El título final de ácido mucónico fue de 16 g/L (ver Figura 18).

Una vez completada la fermentación, las células se eliminan mediante floculación, centrifugación y/o filtración, y el ácido cis,cis-mucónico se purifica a partir del caldo clarificado mediante una combinación de una o más etapas posteriores, por ejemplo precipitación, cristalización, electrodialisis, cromatografía (intercambio iónico, afinidad hidrofóbica y/o tamaño), microfiltración, nanofiltración, ósmosis inversa y evaporación.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en la presente memoria	
Cepa bacteriana/Plásmido	Características
Cepas bacterianas	
ATCC8739	<i>Escherichia coli</i> "C" de tipo salvaje
MYR34	ATCC8739 Δ aroE
MYR170	ATCC8739 Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB
MYR261	ATCC8739 Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, Δ poxB::tktA
MYR305	ATCC8739 Δ aroE, Δ ackA::PAG ₁₅ aroB, Δ poxB
MYR31	ATCC8739 Δ ptsHI, Δ galP
MYR217	ATCC8739 Δ ptsHI, Δ galP, Δ tdc::glf-glK, Δ aroE
MYR352	ATCC8739 Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, Δ adhE::P ₁₅ -catAX, P _R -aroY, P ₂₆ -quiC
RY903	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-893
RY909	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-899
RY911	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-901
RY912	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroGwt
RY913	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-893, Δ tyrR::kan
RY919	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-899, Δ tyrR::kan
RY921	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroG*20-901, Δ tyrR::kan
RY922	Δ aroE, Δ ackA::P ₁₅ aroB, pMG37, aroGwt, Δ tyrR::kan
Plásmidos	
YE24	2 μ origen de levadura, URA3, Tc ^R , replicón pMB1, Ap ^R
pCP32AMP	2 μ origen de levadura, URA3, Tc ^R , replicón pMB1, Ap ^R , aroG
pCP14	2 μ origen de levadura, URA3, Tc ^R , replicón pMB1, Ap ^R , PAG ₁₅ aroB
pCP54	2 μ origen de levadura, URA3, Tc ^R , replicón pMB1, Ap ^R , PAG ₁₅ aroB, aroG
pCP50	2 μ origen de levadura, URA3, Tc ^R , replicón pMB1, Ap ^R , aroG, tktA
pCP55	2 μ origen de levadura, URA3, Tc ^R , replicón pMB1, Ap ^R , aroG, aroB, tktA
pCL1921	replicón pSC101, Spc ^R
pMG27	replicón pSC101, Spc ^R , PAG _R -aroY
pMG31	replicón pSC101, Spc ^R , PAG ₁₅ -catAX
pMG33	replicón pSC101, Spc ^R , PAG ₁₅ -catAX, P _R -aroY
pMG37	replicón pSC101, Spc ^R , PAG ₁₅ -catA-CatX, P _R -aroY, P ₂₆ -quiC
pMG39	replicón pSC101, Spc ^R , PAG ₂₆ -quiC
pMG47	replicón pSC101, Spc ^R , PAG ₁₅ -catAX, P _R -aroY, P ₂₆ -asbF
pMG70	replicón pSC101, Spc ^R , PAG ₁₅ -catAX, P _R -aroY, P ₂₆ -qa-4

Tabla 2 Información de secuencia		
Núm.	Nombre	Descripción
1	SEQ ID NO. 1	El promotor P ₁₅ del fago SP01 de <i>Bacillus subtilis</i> , con un tallo y un bucle añadido inmediatamente aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción.
2	SEQ ID NO. 2	El promotor P ₂₆ del fago SP01 de <i>Bacillus subtilis</i>
3	SEQ ID NO. 3	El promotor P _R del fago de <i>Escherichia coli</i>

Tabla 2 Información de secuencia		
Núm.	Nombre	Descripción
4	SEQ ID NO. 4	Secuencia proteica de 3-deshidroshikimato deshidratasa de <i>Neurospora crassa</i> codificada por el gen <i>qa-4</i> .
5	SEQ ID NO. 5	Secuencia de ADN genómico del gen <i>qa-4</i> de <i>Neurospora crassa</i> más secuencias circundantes.
6	SEQ ID NO. 6	Secuencia proteica de 3-deshidroshikimato deshidratasa de <i>Aspergillus nidulans</i> . codificada por el gen <i>qutC</i>
7	SEQ ID NO. 7	Secuencia de ADN genómico del gen <i>qutC</i> de <i>Aspergillus nidulans</i> más secuencias circundantes
8	SEQ ID NO. 8	Secuencia proteica de protocatecuato descarboxilasa (AroY) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC25597
9	SEQ ID NO. 9	Secuencia de ADN del gen <i>aroY</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> 342 más 2 kilobases de secuencias de ADN circundantes
10	SEQ ID NO. 10	Secuencia de ADN del gen <i>catA</i> de <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1, incluidas 410 bases de secuencia aguas arriba y dos marcos de lectura abiertos aguas abajo
11	SEQ ID NO. 11	Secuencia proteica de CatA (catecol 1,2-dioxigenasa) de <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1
12	SEQ ID NO. 12	Secuencia de ADN del gen <i>quiC</i> (3-deshidroshikimato deshidratasa) de <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
13	SEQ ID NO. 13	Secuencia de ADN con optimización de codones del <i>quiC</i> (3-deshidroshikimato deshidratasa) de <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
14	SEQ ID NO. 14	Secuencia proteica de QuiC (3-deshidroshikimato deshidrogenasa) de <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
15	SEQ ID NO. 15	Secuencia de ADN del plásmido pAC21
16	SEQ ID NO. 16	Secuencia de ADN del plásmido pAC19
17	SEQ ID NO. 17	Secuencia de ADN del plásmido pMH17F
18	SEQ ID NO. 18	Secuencia de ADN de la región codificante del gen <i>aroG</i> de tipo salvaje
19	SEQ ID NO. 19	Secuencia de ADN del plásmido pMH28F

Tabla 3. Información de secuencia - cont.		
Núm.	Nombre	Descripción
20	SEQ ID NO. 20	Secuencia de ADN del plásmido pCL1921
21	SEQ ID NO. 21	Secuencia de ADN del plásmido pMG27
22	SEQ ID NO. 22	Secuencia de ADN del plásmido pMG31
23	SEQ ID NO. 23	Secuencia de ADN del plásmido pMG33
24	SEQ ID NO. 24	Secuencia de ADN del plásmido pMG37
25	SEQ ID NO. 25	Secuencia de ADN del plásmido pMG39
26	SEQ ID NO. 26	Secuencia de ADN del plásmido pMG47
27	SEQ ID NO. 27	Secuencia de ADN del plásmido pMG70
28	SEQ ID NO. 28	Secuencia de ADN del plásmido pCP32AMP
29	SEQ ID NO. 29	Secuencia de ADN del plásmido pCP14
30	SEQ ID NO. 30	Secuencia de ADN del plásmido pCP50
31	SEQ ID NO. 31	Secuencia de ADN del plásmido pCP54
32	SEQ ID NO. 32	Secuencia de ADN del plásmido pCP55
33	SEQ ID NO. 33	Secuencia de ADN del plásmido YEP24

Tabla 3. Información de secuencia - cont.		
Núm.	Nombre	Descripción
34	SEQ ID NO. 34	Secuencia de ADN de la región <i>aroE</i> suprimida
35	SEQ ID NO. 35	Secuencia de ADN del casete $\Delta ack::P_{15}aroB$ integrado
36	SEQ ID NO. 36	Secuencia de ADN de la región $\Delta poxB$
37	SEQ ID NO. 37	Secuencia de ADN del casete $\Delta poxB::tklA$ integrado
8	SEQ ID NO. 38	Secuencia de ADN de la región $\Delta ptsHI$
39	SEQ ID NO. 9	Secuencia de ADN del casete $\Delta tdc::glf-glK$ integrado
40	SEQ ID NO. 40	Secuencia de ADN de la región $\Delta galP$
41	SEQ ID NO. 41	MYR352 $\Delta adhE::P_{15}-catAX$, P_R-aroY , $P_{26}-quiC$

Tabla 4. Alelos mutantes de <i>aroG</i> * que conducen a la resistencia a la inhibición por retroalimentación de fenilalanina			
Cepa	Número de alelo	Mutación de nucleótido	Mutación de aminoácido
RY893	<i>aroG</i> *20-893	C449T	Pro150Leu
RY897	<i>aroG</i> *20-897	C449T	Pro150Leu
RY899	<i>aroG</i> *20-899	T538C	Ser180Pro
RY901	<i>aroG</i> *20-901	C438T	Pro150Ser
MYR450	<i>aroG</i> *111	C55T	Pro19Ser
MYR451	<i>aroG</i> *211	G533A	Gly178Glu
MYR452	<i>aroG</i> *212	C540T	Ser180Phe
MYR453	<i>aroG</i> *311	Deleción del par de bases 36 a 44 pb	Deleción de Glu-Ile-Lys
MYR454	<i>aroG</i> *312	C632T	Ser211Phe
MYR455	<i>aroG</i> *411	T29A	Ile10Asn
MYR456	<i>aroG</i> *412	G533A	Gly178Glu
MYR457	<i>aroG</i> *511	C448T	Pro150Ser

Tabla 5. Medición de la actividad de AroG en extracto bruto de diversas cepas de <i>E. coli</i> recombinantes			
Cepa	Alelo <i>aroG</i> *	Actividad específica mU (Una mU = un nM de producto preparado por miligramo de proteína por minuto)	% de actividad resistente a la fenilalanina
RY893	<i>aroG</i> *20-893	62	34
RY897	<i>aroG</i> *20-397	55	77
RY899	<i>aroG</i> *20-899	92	113
RY901	<i>aroG</i> *20-901	78	76
RY902	<i>AroG</i> tipo salvaje	38	6
RY890	<i>AroG</i> tipo salvaje	54	7

Tabla 6. Producción de ácido mucónico en matraces oscilantes por cepas que contienen alelos <i>aroG</i> * resistentes a la retroalimentación	
Cepa	Título de ácido mucónico g/L
RY913	3,04

Tabla 6. Producción de ácido mucónico en matraces oscilantes por cepas que contienen alelos aroG* resistentes a la retroalimentación	
Cepa	Título de ácido mucónico g/L
RY919	3,11
RY921	2,99
RY922	1,45

REFERENCIAS

- 5 Patente de Estados Unidos Núm. 4.480.034
- Patente de Estados Unidos Núm. 4.535.059
- Patente de Estados Unidos Núm. 4.588.688
- 10 Patente de Estados Unidos Núm. 4.608.338
- Patente de Estados Unidos Núm. 4.681.852
- 15 Patente de Estados Unidos Núm. 4.753.883
- Patente de Estados Unidos Núm. 4.833.078
- Patente de Estados Unidos Núm. 4.968.612
- 20 Patente de Estados Unidos Núm. 5.168.056
- Patente de Estados Unidos Núm. 5.272.073
- 25 Patente de Estados Unidos Núm. 5.487.987
- Patente de Estados Unidos Núm. 5.616.496
- Patente de Estados Unidos Núm. 6.600.077
- 30 Patente de Estados Unidos Núm. 6.180.373
- Patente de Estados Unidos Núm. 6.210.937
- 35 Patente de Estados Unidos Núm. 6.472.169
- Patente de Estados Unidos Núm. 6.613.552
- Patente de Estados Unidos Núm. 6.962.794
- 40 Patente de Estados Unidos Núm. 7.244.593
- Patente de Estados Unidos Núm. 7.638.312
- 45 Patente de Estados Unidos Núm. 7.790.431
- Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. US 2009/0191610
- Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. US 2010/0314243 A1
- 50 Solicitud de Patente Europea Núm. 86300748.0
- Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 2011/017560
- 55 Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 2011/085311
- Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 2011/123154

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, *J Mol Biol* 215, 403-410.
- 5 Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- 10 Barbe, V., Vallenet, D., Fonknechten, N., Kreimeyer, A., Oztas, S., Labarre, L., Cruveiller, S., Robert, C., Duprat, S., Wincker, P., Ornston, L. N., Weissenbach, J., Marliere, P., Cohen, G. N., y Medigue, C. (2004) Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium, *Nucleic Acids Res* 32, 5766-5779.
- Bird, J. A. y Cain, R. B. (1968) cis-cis-muconate, the product inducer of catechol. 1,2-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* 109, 479-481.
- 15 Bongaerts, J., Kramer, M., Muller, U., Raven, L. y Wubbolts, M. (2001) Metabolic engineering for microbial productinof aromatic acids and derived compounds. *Met. Eng.* 3, 289-300.
- Chandran, S. S., Yi, J., Draths, K. M., von Daeniken, R., Weber, W. y Frost, J. W. (2003) Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol. Prog.* 19, 808-814.
- 20 Chen, R., Hatzimanikatis, V., Yap, W. M. G. J., Potma, P. W. y Bailey, J. E. (1997) Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in a phenylalanine-producing recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 13, 768-775.
- 25 Chen, K., Dou, J., Tang, S., Yang, Y., Wang, H., Fang, H. y Zhou, C. (2012) Deletion of the *aroK* gene is essential for high shikimic acid accumulation through the shikimate in *E. coli*. *Bioresource Technol.* 119, 141-147.
- 30 Choi, W. J., Lee, E. Y., Cho, M. H., y Choi, C. Y. (1997) Enhanced production of cis, cis-muconate in a cell-recycle bioreactor. *J. Fermentation and Bioengineering.* 84, 70-76.
- Curran, K. A., Leavitt, J. M., Karim, A. S. y Alper, H. S. (2012) Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabol. Engineer.* 15, 55-66.
- 35 de Berardinis, V., Vallenet, D., Castelli, V., Besnard, M., Pinet, A., Cruaud, C., Samair, S., Lechaplais, C., Gyapay, G., Richez, C., Durot, M., Kreimeyer, A., Le Fevre, F., Schachter, V., Pezo, V., Doring, V., Scarpelli, C., Medigue, C., Cohen, G. N., Marliere, P., Salanoubat, M., y Weissenbach, J. (2008) A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1, *Mol Syst Biol* 4, 174.
- 40 Draths, K. M., Pompliano, D. L., Conley, D. L., Frost, J. W., Berry, A., Disbrow, G. L., Staversky, R. J., y Lievense, J. C. (1992) Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose - the Role of Transketolase, *Journal of the American Chemical Society* 114, 3956-3962.
- 45 Draths, K. M., y Frost, J. W. (1995) Environmentally Compatible Synthesis of Catechol from D-Glucose, *Journal of the American Chemical Society* 117, 2395-2400.
- Elsemore, D. A., y Ornston, L. N. (1995) Unusual ancestry of dehydratases associated with quinate catabolism in *Acinetobacter calcoaceticus*, *J Bacteriol* 177, 5971-5978.
- 50 Escalante, A., Calderon, R., Valdiva, A., de Anda, R., Hernandez, G., Ramirez, O. T., Gosset, G. y Boliver, F. (2010) Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* 9, 21-33.
- 55 Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F. y Valle, F. (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Stature Biotechn.* 14, 620 - 623.
- Fox, D. T., Hotta, K., Kim, C. Y., y Koppisch, A. T. (2008) The missing link in petrobactin biosynthesis: *asbF* encodes a (-)-3-dehydroshikimate dehydratase, *Biochemistry* 47, 12251-12253.
- 60 Ger, Y., Chen, S., Chiang, H., y Shiuan, D. (1994) A Single Ser-180 Mutation Desensitizes Feedback Inhibition of the Phenylalanine-Sensitive 3-Deoxy-D-Arabinose-7-Phosphate (DAHP) Synthetase in *Escherichia coli*, *JBiochem* 116, 986-990.

- Grant, D. J., y Patel, J. C. (1969) The non-oxidative decarboxylation of p-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, protocatechuic acid and gallic acid by *Klebsiella aerogenes* (*Aerobacter aerogenes*), *Antonie Van Leeuwenhoek* 35, 325-343.
- 5 Hansen, E. H., Moller, B. L., Kock, G. R., Bunner, C. M., Kristensen, C., Jensen, O. R., Okkels, F. T., Olsen, C. E., Motawia, M. S., y Hansen, J. (2009) De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), *Appl Environ Microbiol* 75, 2765-2774.
- 10 Hu, C., Jiang, P., Xu, J., Wu, Y., y Huang, W. (2003) Mutation analysis of the feedback inhibition site of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli*, *J Basic Microbiol* 43, 399-406.
- 15 Iwagami, S. G., Yang, K., y Davies, J. (2000) Characterization of the protocatechuic acid catabolic gene cluster from *Streptomyces* sp. strain 2065, *Appl Environ Microbiol* 66, 1499-1508.
- Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., e Ingram, L. O. (2008a) Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate, *Biotechnol Bioeng* 99, 1140-1153.
- 20 Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Svoronos, S. A., e Ingram, L. O. (2008b) Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C, *Biotechnol Bioeng* 101, 881-893.
- 25 Kaneko, A., Ishii, Y., y Kirimura, K. (2011) High-yield production of cis, cis-muconic acid from catechol in aqueous solution by biocatalyst. *Chem. Lett.* 40, 381-383.
- Kikuchi, Y., Tsujimoto, K., y Kurahashi, O. (1997) Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol* 63, 761-762.
- 30 Kojima, Y., Fujisawa, H., Nakazawa, A., Nakazawa, T., Kanetsuna, F., Taniuchi, H., Nozaki, M., y Hayaishi, O. (1967) Studies on pyrocatechase. I. Purification and spectral properties, *J Biol Chem* 242, 3270-3278.
- 35 Kramer, M., Bongaerts, J., Bovenberg, R., Kremer, S., Muller, U., Orf, S., Wubbolts, M. y Raeven, L. (2003) Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metabol. Eng.* 5, 277-283.
- Lerner, C. G., e Inouye, M. (1990) Low copy number plasmids for regulated low-level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability, *Nucleic Acids Res* 18, 4631.
- 40 Li, K. y Frost, J.W. (1999) Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: A comparative analysis of D-xylose, L-arabinose, and D-glucose carbon sources. *Biotechnol. Prog.* 15, 876-883.
- Lu, J. L., y Liao, J. C. (1997) Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: Role of transaldolase, *Biotechnol Bioeng* 53, 132-138.
- 45 Lu, J., Tang, J., Liu, Y., Zhu, X. (2012) Combinatorial modulation of galP and glk gene expression for improves alternative glucose utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2455-2462
- 50 Lutke-Eversloh, T., y Stephanopoulos, G. (2007) L-tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*, *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 103-110.
- Mizuno, S., Yoshikawa, N., Seki, M., Mikawa, T., e Imada, Y. (1988) Microbial production of cis, cis-muconic acid from benzoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol.* 28, 20-25.
- 55 Nakazawa, A., Kojima, Y., y Taniuchi, H. (1967) Purification and properties of pyrocatechase from *Pseudomonas fluorescens*, *Biochim Biophys Acta* 147, 189-199.
- Neidhardt, F. C., y Curtiss, R. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.
- 60 Neidle, E. L., y Ornston, L. N. (1986) Cloning and expression of *Acinetobacter calcoaceticus* catechol 1,2-dioxygenase structural gene catA in *Escherichia coli*, *J Bacteriol* 168, 815-820.
- 65 Niu, W., Draths, K. M., y Frost, J. W. (2002) Benzene-free synthesis of adipic acid, *Biotechnol Prog* 18, 201-211.

- Parker, C., Barnell, W. O., Snoep, J. L., Ingram, L. O., y Conway, T. (1995) Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (glf) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport, *Mol Microbiol* 15, 795-802.
- 5 Parsek, M. R., Shinabarger, D.L., Rithmel, R. K. y Chakrabarty, A. M. (1992) Roles of CatR and *cis*, *cis*-Muconate in activation of the *catBC* operon, which is involved in benzoate degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 174, 7798-7806.
- 10 Patnaik, R. y Liao, J. C. (1994) Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite with near theoretical yield. *App. Env. Microbiol.* 60, 3903-3908.
- Pfleger, B. F., Kim, Y., Nusca, T. D., Maltseva, N., Lee, J. Y., Rath, C. M., Scaglione, J. B., Janes, B. K., Anderson, E. C., Bergman, N. H., Hanna, P. C., Joachimiak, A., y Sherman, D. H. (2008) Structural and functional analysis of AsbF: origin of the stealth 3,4-dihydroxybenzoic acid subunit for petrobactin biosynthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17133-17138.
- 15 Perez-Pantoja, D., De la Iglesia, R., Pieper, D. H., y Gonzalez, B. (2008) Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134, *FEMS Microbiol Rev* 32, 736-794.
- 20 Perez-Pantoja, D., Donoso, R., Agullo, L., Cordova, M., Seeger, M., Pieper, D. H., y Gonzalez, B. (2011) Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales, *Environ Microbiol.*
- 25 Pittard, J. y Wallace, B. J. (1966) Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 91, 1494-1508.
- Polen, T., Spelberg, M. y Bott, M. (2012) toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables, *J. Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotech.2012-07.008>.
- 30 Rutledge, B. J. (1984) Molecular characterization of the *qa-4* gene of *Neurospora crassa*, *Gene* 32, 275-287.
- Schirmer, F., y Hillen, W. (1998) The *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250 *mop* operon mRNA is differentially degraded, resulting in a higher level of the 3' *CatA*-encoding segment than of the 5' phenolhydroxylase-encoding portion, *Mol Gen Genet* 257, 330-337.
- 35 Shumilin, I. A., Kretsinger, R. H., y Bauerle, R. H. (1999) Crystal structure of phenylalanine-regulated 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Escherichia coli*, *Structure* 7, 865-875.
- 40 Shumilin, I. A., Zhao, C., Bauerle, R., y Kretsinger, R. H. (2002) Allosteric inhibition of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase alters the coordination of both substrates, *J Mol Biol* 320, 1147-1156.
- Shumilin, I. A., Bauerle, R., Wu, J., Woodard, R. W., y Kretsinger, R. H. (2004) Crystal structure of the reaction complex of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Thermotoga maritima* refines the catalytic mechanism and indicates a new mechanism of allosteric regulation, *J Mol Biol* 341, 455-466.
- 45 Shumkova, E. S., Solyanikova, I. P., Plotnikova, E. G. y Golovleva, L. A. (2009) Phenol degradation by *Rhodococcus opacus* Strain 1 G. *App. Biochem. Microbiol.* 45, 43-49.
- 50 Sietmann, R., Uebe, R., Boer, E., Bode, R., Kunze, G., y Schauer, F. (2010) Novel metabolic routes during the oxidation of hydroxylated aromatic acids by the yeast *Arxula adeninivorans*, *J Appl Microbiol* 108, 789-799.
- 55 Smith, M. R. y Ratledge, C. (1989) Quantitative biotransformation of catechol to *cis*, *cis* -muconate. *Biotech. Lett.* 11, 105-110.
- Snoep, J. L., Arfman, N., Yomano, L. P., Fliege, R. K., Conway, T., e Ingram, L. O. (1994) Reconstruction of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase, *J Bacteriol* 176, 2133-2135.
- 60 Sprenger, G. A. (1995) Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12, *Arch Microbiol* 164, 324-330.
- 65 Sprenger, G. A., Schorken, U., Sprenger, G., y Sahm, H. (1995a) Transketolase A of *Escherichia coli* K12. Purification and properties of the enzyme from recombinant strains, *Eur J Biochem* 230, 525-532.

Sprenger, G. A., Schorken, U., Sprenger, G., y Sahm, H. (1995b) Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: cloning of its gene, talB, and characterization of the enzyme from recombinant strains, *J Bacteriol* 177, 5930-5936.

Stroman, P., Reinert, W. R., y Giles, N. H. (1978) Purification and characterization of 3-dehydroshikimate dehydratase, an enzyme in the inducible quinic acid catabolic pathway of *Neurospora crassa*, *J Biol Chem* 253, 4593-4598.

Tang, J., Zhu, X., Lu, J. y Liu, P. (2012) Recruiting alternative glucose utilization pathways for improving succinate production. *App Microbiol Biotechnol* DOI 10, 1007/s00253-012-434.1

Tateoka, T., and Yasuda, I. (1995) 3-Dehydroshikimate dehydratase in mung bean cultured cells, *Plant Cell Reports* 15, 212-217.

Weaver, L. M., y Herrmann, K. M. (1990) Cloning of an aroF allele encoding a tyrosine-insensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase, *J Bacteriol* 172, 6581-6584.

Weber, C., Bruckner, C., Weinreb, S., Lehr, C., Essl, C. y Bole, E. (2012) Biosynthesis of cis, cis-muconic acid and its aromatic precursors catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae*, *App Environ Microbiol.* 78, 8421-8430.

Wheeler, K. A., Lamb, H. K., y Hawkins, A. R. (1996) Control of metabolic flux through the quinate pathway in *Aspergillus nidulans*, *Biochem J* 315 (Pt 1), 195-205.

Wu, C-M., Wu, C-C., Su, C-C., Lee, S-N., Lee, Y-A. y Wu, J-Y. (2006) Microbial synthesis of cis,cis-muconic acid from benzoate by *Sphingobacterium* sp. Mutants. *Biochem. Eng. J.* 29, 35-40.

Xie, N., Tang, H., Feng, J., Tao, F., Ma, C. y Xu, P. (2009) Characterization of benzoate degradation by newly isolated bacterium *Pseudomonas* sp. XP-M2. *Biochem. Eng. J.* 46, 79-82.

Yi, J., Draths, K. M., Li, K. y Frost, J. W. (2003) Altered Glucose Transport and Shikimate Pathway Product Yields in *E. coli*. *Biotechnol. Prog.* 2003, 19, 1450-1459

Yoshikawa, N., Mizuno, S., Ohta, K., y Suzuki, M. (1990) Microbial production of cis, cis-muconic acid. *J. Biotechnol.* 14, 203-210

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MYRIANT CORPORATION Yocum, R. Rogers Gong, Wei Dole, Sudhanshu Sillers, Ryan Gandhi, Meghal Pero, Janice G.

<120> PRODUCCIÓN DE ÁCIDO MUCÓNICO A PARTIR DE MICROORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE
<130> MC2013-01PCT

<150> US 61/632.777
<151> 2012-01-30

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 195
<212> DNA

<213> Promotor P15;

<400> 1

ES 2 663 445 T3

	gctattgacg acagctatgg ttcactgtcc accaaccaaa actgtgctca gtaccgccaa	60
	tatttctccc ttgaggggta caaagagggtg tccctagaag agatccacgc tgtgtaaaaa	120
	ttttacaaaa aggtattgac tttccctaca ggggtgtgtaa taatttaatt acaggcgggg	180
	gcaaccccgcc ctggtt	195
5	<210> 2 <211> 164 <212> ADN <213> Promotor P26;	
	<400> 2 gcctacctag cttccaagaa agatattccta acagcacaag agcggaaaga tgttttgttc	60
	tacatccaga acaacctctg ctaaaattcc tgaaaaattt tgcaaaaagt tgttgacttt	120
10	atctacaagg tgtggtataa taatcttaac aacagcagga cgct	164
	<210> 3 <211> 91 <212> ADN <213> Promotor PR;	
15	<400> 3 acgttaaatac tatcaccgca agggataaat atctaaccac gtgcgtgttg actattttac	60
	ctctggcggg gataatgggt gcatgtacaa g	91
20	<210> 4 <211> 359 <212> PRT <213> 3-deshidroshikimato deshidratasa codificada por el gen qa-4;	
25	<400> 4	

ES 2 663 445 T3

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

ES 2 663 445 T3

Val Gln Val Val Asp Ala Glu Arg Leu Ser Lys Pro Leu Leu Pro Gly
245 250 255

His Pro Tyr Tyr Asn Pro Glu Gln Pro Ala Arg Met Ser Trp Ser Arg
260 265 270

Asn Cys Arg Leu Phe Tyr Gly Glu Thr Glu Tyr Gly Ala Tyr Leu Pro
275 280 285

Val Lys Glu Val Ala Arg Ala Leu Phe His Gly Ile Gly Phe Glu Gly
290 295 300

Trp Val Ser Leu Glu Leu Phe Asn Arg Arg Met Ser Glu Glu Gly Pro
305 310 315 320

Glu Val Pro Glu Glu Leu Ala Met Arg Gly Ala Ile Ser Trp Ala Lys
325 330 335

Leu Val Gln Asp Leu Arg Ile Pro Val Glu Gly Pro Leu Val Thr Met
340 345 350

Pro Arg Val Ser Ala Ser Leu
355

- 5 <210> 5
<211> 2160
<212> ADN
<213> gen qa-4 de Neurospora crassa más secuencias circundantes;

10 <400> 5

gaattcggga aatggaatct tacctgggaa ccgaaatcac agtccgggta gggtatagag	60
catatagtga actgtcaaag ttctagacct ggaccagcca cttggagtcg ttgttttagt	120
tataacctaca ttcaactcact gttgactttc aatcatactt acttagacgg agcaacgcgc	180
cagaatccaa attgttgcac agttgcggta tcaccaagtg gcttcccata atagtttgcc	240
attcgatgag acagctaact ggaagaccgg tactcgcagg ttgcacgatt acacggaagg	300
attcgggtatt ccgtgtttca tctgtcaaag tccctttcca tatgaatccg aggtactatg	360
actggatctc gatacaagct ggccagcgag gtgcctgcct tgacaggctg tcaactgcgg	420
gacggccggc taagtgttta acacgcaagg gtggaagatg tctcgtcccg tcatccaaga	480
ccgtcaacat tcgaggccat ctgatcgttg aagagatgct aaatcttgtg aaacgctcat	540
aggtcgctta ccttcggccc acccgtaaat gctttattcc gctgagcaaa cttcggcttc	600
catcccgcgg ttacacgttt acatcactta tcgttgcggt tattggccga ttcttcgcaa	660
accgaaacga tgacatcccg aatatctgca atacaccgcc acggccggcg tctttatcac	720

ES 2 663 445 T3

	acctcctatg ggagacgaaa gtgccttgat acccctagtc atttgaagat tcaggatggg	780
	agacggctgg ccgcttgccg agttacgttc gagtcttggt cgcaggaacg cttgccgtat	840
5	tgaatgagac ccgagaaggg tcaaataaaa tcttggaaga ccccaactgc ttcctcattg	900
	ccttcactcc ccatatcaat ggggcacatc ctgtgactac cttggtgctt tatttcctca	960
10	ccatttgccg atacaagctc aaggacaccg aggtgatata cagttcttca aggacactat	1020
	ctcacctcaa tatcaagaac cagtctcatc atctcttatt tctccaggat cccccacca	1080
	acaacatcgg cttttttttt tcccctattc tcaagacca tcaagacgct cacttcgctg	1140
15	agcctttcgc catgccgtca aagctagcca ttagttccat gtccctaggg cgctgctttg	1200
	ccggccactc tctggacagc aagcttgatg ccgctcaacg atacggctat cttggtatcg	1260
	agctttttta tgaggatctg gtcgacgttg cagagcattt gtcgaacgag cgtccctctc	1320
20	ccgaaggccc ttttgctgaa gctcagatag ccgcccgtcg tcatattctc cagatgtgtc	1380
	aagccagggg gcttgaggtc gtctgcctcc agcctttcat gcactacgac ggccttaacg	1440
25	acagggcaga acatgagcgt cgtctggaga agctagcact atggattgag ctgctcatg	1500
	agcttcacac cgacatcatt cagatcccag ccaacttcct ccctgccaac caagtcaagt	1560
	acaacctcga cctgattgtc tcagatcttt gcaaggtggc cgatattgga gctcaagctt	1620
30	tgccccctat ccgctttgcc tacgagagtc tttgctggag caccctgtgc gacctctggg	1680
	agcgtctgtg ggacatcgta caacgcgttg accgcccac ctttggcatt tgccttgaca	1740
	ccttcaacat cctcggccgc atctatgccg accctacatc tcctagcggg aggacacca	1800
35	acgcaaaaga ggcagtcagg aagtccatcg ccaacttggt ctgcgcgtg gatgtctcca	1860
	aagtcttcta cgtccagggt gttgacgccg agaggctgag caagccacta ctgcccggtc	1920
40	acccgtatta caatccagag cagccggcga ggatgagctg gtcgcgcaat tgtagactgt	1980
	tctacggcga aacagaatat ggtgcgtatc ttcccgtaaa ggagggttgc cgagcccttt	2040
	tccacggcat tggtttcgag ggctgggtca gtttgagct tttcaaccgc agaattgtctg	2100
45	aggagggacc tgaagtgccg gaggaacttg ccatgagagg cgctatctcg tgggccaagt	2160

50 <210> 6
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> QutC de Aspergillus nidulans codificada por el gen qutC;

<400> 6
 Met Pro Ala Asn Leu Lys Ile Gly Ile Pro Thr Val Ser Leu Ser Lys
 1 5 10 15
 Pro Gly Leu His Ser Leu Asp His Lys Leu Arg Ser Ala Ala His Gly
 20 25 30

ES 2 663 445 T3

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

ES 2 663 445 T3

275 280 285

Arg Ala Phe Phe Glu Ile Gly Phe Glu Gly Trp Val Ser Leu Glu Leu
290 295 300

Phe Ser Arg Thr Cys Asn Asp Pro Asp Val Asn Thr Val Gly Glu His
305 310 315 320

Ala Arg Arg Gly Met Asp Arg Arg Arg Val Val Ala Ala Leu Gly
325 330 335

Leu Asp Val Glu Val Pro Ala Arg Asn Cys Glu Cys
340 345

<210> 7

<211> 3298

<212> ADN

<213> gen qutC de Aspergillus nidulans más secuencias circundantes;

<400> 7

aagcttggtt tcaagtgatg atatatagtt atgaggatat aatatgaacc gaaagacgat	60
gtttcttgtg aatatattacg tgatagttgt ctgtctaata tggtagacga gtagaacaac	120
tacatacggg cactacttac agccctagtc attccctccc tcgattgcct accatttata	180
cactttgaac atccacaggc ttgcctccct ccatactctc cctaacagct tgaacaactc	240
tgagcgccct caccatcatc tcaacgccac agccaactcc tcgctcgcca tcctcaccct	300
ttccactaac aacatcaaca aaatatcccc actgcgcatac aaacggcctc acatcagcat	360
ccttcactga aatctgctgc atcgccaact ccgtattcca gcctttctct tccccctgtc	420
cacaagaaac atgggtcatag ctccagcgcg tcatatcagg cactactgaga ctgctctggg	480
ttccaagaat tcgataacag tcgcttgac tcttggaagg agcgggaggga atcgtaggat	540
tctcgcccggt tcctgtttca aagttcaacg gcgaaggcgt cgcgtcgag atgagaaatg	600
tgcctactat ccagacgca aagcgagcg tcacagcaca gccttcctcg gcggtatgtt	660
ccgggttctg gcgcatgcg tcgaggagtg taccctccgc gtagacccta ctgacgggcc	720
caaacagaaa ctgcagcacg tcgatatcgt ggataagatt aatccccagc acgcccct	780
tcttcttata tcgcgccaa gaaccgagcg gcggcgcgaa gtaagaggcc ggcttcagaa	840
gtgtccagag gccgttact gcaacgacgg tgccgagtga gtctgtctct aacaaagact	900
ttgtggtttg gatgtacgga ttgaagcggc ggtggtggcc gatctggatg ttgatcttcg	960
catccttgcc tctcttctca tctttacatt tctgttctt gacggtagcg aggaggtgct	1020
cggccgactc cagatcgta ctgatcggtt tctcaaggag gatattgcgg attccgttct	1080
ccagcagctg gagcgtgacg tccacgtgcg tgtgattggg cgtgctcacg atcgccgcgt	1140

ES 2 663 445 T3

ctggtttccc ggttgtctta ccgacaacgt ctaacataga cgtaatagaa tcatagcaag	1200
gaacgccaaa tgattctgcg accgggattg cagaggggtga aggggtcaaca aaagcgatca	1260
gctgggttcg tgggtgtcgt tgcacggatt gtgcgtgacg gggcccaata agtccggcac	1320
cgacgatgac aatgaggata ttcttgcctt tttccttgct gcagggcacc attgtgcatg	1380
tcggtggctg gaaataaaca gaacagggat atgggtcaagt cggagaatcg gtgcaggata	1440
gaccggctac ttgatgtagg acgacagtcg cgatctaccg agagcgtgag attcactgtg	1500
ggactgattt atgtaatttg agggcgagca gacttaggga cttgaaatgt ggctgtctgt	1560
ggatgcattt gcgggggatg gagtacagag tgcatacagc tgtgtatatg gagttcctta	1620
cggagagggg gacctgggat ggggagaacg ggcaaaatgc tcacccggca acctctcaaa	1680
gcgtttaccc ggtatactcc tctgatataca atatttccaa tcagcaccta tatcatcacg	1740
acgctctcct gaggattccg tagctaaccg ccctggatcc tacattaata aataagccat	1800
ttgctttttc tgctgcgagt gtgattctca atacgattac gtatcacatg cagattgcct	1860
ttacttcagc tgcatttgat cagccacagc tctaagagca aacataccct acctacctac	1920
ctacttcgcc taggttacat aatcaccgcc atctcctcct cgatcagtct tcaactcaat	1980
cagctcattc attctattct taatataata tataccttta gatctccagc agagaccga	2040
agagtcggca attcaaaatg cccgcaaacc tcaaaatcgg tatoccaaacc gtgtccctgt	2100
caaaacccgg cctgcactct cttgaccata agctccgctc ggccgctcat ggcttcgcgg	2160
ggatcgagct gtttattgat gacctctccc atttcgcctc atcgtcattc aatggctccc	2220
tcactcaagc ggcaaagtat atctcctcgc tcgccaaagca acttaacctc acatttatct	2280
gcctgcaacc attcggtttc tacgaggggc tgggtggacac aaatcagtcg acgtacctgc	2340
tcactgagaa actcccgcctc tggtttgcca tcgcccgcat tataggcaca gatctcatcc	2400
aaatccccgc aaatttcctc cagaatgacc ctgtcaccgg ggctgcacga acaagcggcg	2460
acataaggct tatcgtctca gatctgcaga cgatcgagca tatcggtgta aagcagggct	2520
tccgctttgt gtacgaggcg ctctgctggg cgacgcagtgt cgatacatgg gaagcagcgt	2580
ggaatgtcgt caagctgggt gatagagaga atttcgggat ctgcctggat agcttcaaca	2640
cgcgacccc gcttccgtca ctgggaagac gccggatgct gagcaagccg tggccaagtc	2700
catggagacg ctccgttctc tcgtctccag tggagaactg gacatcagga aaatcttcta	2760
catccagctt gtcgatggcg agcggttgtc ggccgctcgt gacgagaagc acccctttca	2820
tgtggagggc caacccccga agaattgagct ggagtcgcaa tgcgcggtta tttccctgtg	2880
aagaggagag ggggtgggtat cttcctgtgt tggagatcgc gagggcgctt tttgaaatcg	2940
ggttcgaggg gtgggtgagt ctagagctgt tttcaaggac gtgtaatgat cccgatgtga	3000
acacgggtgg ggagcatgcg agacgtggga tggatagaag gaggaggggt gttgcggcgc	3060
taggactcga tgttgaggtg ccagcacgta actgtgaatg ttagcatgaa cggcaaggag	3120
aggggtggagg tgcagggtgca ggaggagctg gctgttcagc atcggctgta ggtagtggtg	3180
tcttgaaagg acgatagggt ttgatctaga gatTTTTatt ttgtctaatt actggtaatg	3240
atggcctcat gcacgctgtt gaacacgctg tacaacatca ctgttgaaga tgatacct	3298

<210> 8

<211> 502

<212> PRT

ES 2 663 445 T3

<213> AroY de *Klebsiella pneumoniae* ATCC25597;

<400> 8

```

Met Thr Ala Pro Ile Gln Asp Leu Arg Asp Ala Ile Ala Leu Leu Gln
1          5          10          15

Gln His Asp Asn Gln Tyr Leu Glu Thr Asp His Pro Val Asp Pro Asn
          20          25          30

Ala Glu Leu Ala Gly Val Tyr Arg His Ile Gly Ala Gly Gly Thr Val
          35          40          45

Lys Arg Pro Thr Arg Ile Gly Pro Ala Met Met Phe Asn Asn Ile Lys
          50          55          60

Gly Tyr Pro His Ser Arg Ile Leu Val Gly Met His Ala Ser Arg Gln
65          70          75          80

Arg Ala Ala Leu Leu Leu Gly Cys Glu Ala Ser Gln Leu Ala Leu Glu
          85          90          95

Val Gly Lys Ala Val Lys Lys Pro Val Ala Pro Val Val Val Pro Ala
          100          105          110

Ser Ser Ala Pro Cys Gln Glu Gln Ile Phe Leu Ala Asp Asp Pro Asp
          115          120          125

Phe Asp Leu Arg Thr Leu Leu Pro Ala His Thr Asn Thr Pro Ile Asp
          130          135          140

Ala Gly Pro Phe Phe Cys Leu Gly Leu Ala Leu Ala Ser Asp Pro Val
145          150          155          160

Asp Ala Ser Leu Thr Asp Val Thr Ile His Arg Leu Cys Val Gln Gly
          165          170          175

Arg Asp Glu Leu Ser Met Phe Leu Ala Ala Gly Arg His Ile Glu Val
          180          185          190

```

ES 2 663 445 T3

Phe Arg Gln Lys Ala Glu Ala Ala Gly Lys Pro Leu Pro Ile Thr Ile
 195 200 205
 Asn Met Gly Leu Asp Pro Ala Ile Tyr Ile Gly Ala Cys Phe Glu Ala
 210 215 220
 Pro Thr Thr Pro Phe Gly Tyr Asn Glu Leu Gly Val Ala Gly Ala Leu
 225 230 235 240
 Arg Gln Arg Pro Val Glu Leu Val Gln Gly Val Ser Val Pro Glu Lys
 245 250 255
 Ala Ile Ala Arg Ala Glu Ile Val Ile Glu Gly Glu Leu Leu Pro Gly
 260 265 270
 Val Arg Val Arg Glu Asp Gln His Thr Asn Ser Gly His Ala Met Pro
 275 280 285
 Glu Phe Pro Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Asn Pro Ser Leu Pro Val Ile
 290 295 300
 Lys Val Lys Ala Val Thr Met Arg Asn Asn Ala Ile Leu Gln Thr Leu
 305 310 315 320
 Val Gly Pro Gly Glu Glu His Thr Thr Leu Ala Gly Leu Pro Thr Glu
 325 330 335
 Ala Ser Ile Trp Asn Ala Val Glu Ala Ala Ile Pro Gly Phe Leu Gln
 340 345 350
 Asn Val Tyr Ala His Thr Ala Gly Gly Gly Lys Phe Leu Gly Ile Leu
 355 360 365
 Gln Val Lys Lys Arg Gln Pro Ala Asp Glu Gly Arg Gln Gly Gln Ala
 370 375 380
 Ala Leu Leu Ala Leu Ala Thr Tyr Ser Glu Leu Lys Asn Ile Ile Leu
 385 390 395 400
 Val Asp Glu Asp Val Asp Ile Phe Asp Ser Asp Asp Ile Leu Trp Ala
 405 410 415
 Met Thr Thr Arg Met Gln Gly Asp Val Ser Ile Thr Thr Ile Pro Gly
 420 425 430
 Ile Arg Gly His Gln Leu Asp Pro Ser Gln Thr Pro Glu Tyr Ser Pro

ES 2 663 445 T3

435

440

445

Ser Ile Arg Gly Asn Gly Ile Ser Cys Lys Thr Ile Phe Asp Cys Thr
450 455 460

Val Pro Trp Ala Leu Lys Ser His Phe Glu Arg Ala Pro Phe Ala Asp
465 470 475 480

Val Asp Pro Arg Pro Phe Ala Pro Glu Tyr Phe Ala Arg Leu Glu Lys
485 490 495

Asn Gln Gly Ser Ala Lys
500

<210> 9

<211> 5502

<212> ADN

<213> gen aroY de Klebsiella pneumoniae 342 más 2 kilobases de
secuencias de ADN circundantes;

<400> 9

gcgacgccga	ctgggcgatc	cgtgaactgc	tggcgcgatat	gacccagcgt	ctgcagggct	60
gtgaaaccat	agaggatgtg	attaaggtgg	cggagctggt	cgcgccgaac	atcgccccga	120
cgatccccgg	taaactgtat	attctggata	ccgatccatg	gcagatgcgc	tgcgtggcgc	180
agtggctgtc	gcccgcgggg	gagacgacgt	cctttgctcc	cgacgactgc	tgggcgatac	240
ggcggggact	cagccatccg	ccggtgcagg	gtgagcccga	tatcacctgc	tatcatctgc	300
cggaggcgca	cgccggccag	tcgctctgcg	taccgctcat	cgcccagggc	gaagcgatcg	360
gtctgctgag	ctttcagaac	gtcaccgcca	gtgacgcccc	ttcccgggct	tacctggagc	420
tgatggccga	agcgtggggg	ctggcgctcg	ccaatcagcg	tttacgcagc	gccctgctgg	480
aaaaagcggt	gttcgattcg	ctgaccggcc	tgcgtaaccg	ccatcatctt	gatgaagcgc	540
tgcaactcgca	gatggcgctg	gcggtccata	cccacacccc	gctgagctgc	ctgatgatcg	600
acatcgatca	cttcaaagcc	atcaatgacc	gctacggcca	tgaagccggg	gatctggtga	660
ttaagagcgt	cgcgaccatt	gtgcagcgcg	cgggtgcgca	tatcggcattg	gctttccgct	720
acggcgggca	ggagttttta	gtgctgctcc	ccgggattga	cgaagccggg	gcgcaccagt	780
gcgccagcga	gatctacacc	caggtgcaca	atatgacgct	gcgcgatggc	ctgacggaga	840
taggccaggt	ggatgtgtcg	attggcatcg	ccagctaccc	gcagcacacc	caaagcgaca	900
gcctgctgcg	cgacagcgac	gccgcgctgt	accggggcga	agagctgggc	cgttcaagga	960
ttgtcagctt	tggccgcctg	aagaccgcgt	aagcgggatt	attgctcagc	ggcattaagc	1020
agcgagataa	ctttccgcac	caccgcccga	cggaaatggc	ggtggtaaac	catgctcagc	1080
tcactctccg	ccagccgatc	ctgaagatcg	atatacacca	cgttatcaag	gcgtaaggcc	1140

ES 2 663 445 T3

ctcgccgaga	ccggcaccag	cgccaccccc	accccggcgg	agaccaggct	aatcatcgag	1200
gtgacatcgt	taattcgctg	caccacctgc	ggcgtaaaac	ccgcgacgcg	acaggcgtca	1260
ataaatacct	gctccagtcc	ggtgccctgc	ggatcgtaa	gcgagatcca	gttgtcagtg	1320
cgcaacgagg	ccagattgag	cgccccacg	cctgccagcg	gatgctgttg	ataaagcgcc	1380
aggcaaagtt	tttccgcac	aaatggcctg	accaccagcg	cgccggcgg	tgacgccagc	1440
ggcgcgcgga	tgatggcgat	atccagacgc	agatccagca	gcgcttcgta	gagcatttgc	1500
acatccccct	gcaccagcga	cagctcaatc	ccgggccagt	cagcgcgag	ctcgcgacgg	1560
agccccggca	gtttgctgtc	atacatcgca	ctggagacat	agcccagatg	caatcgcccc	1620
tgctcgccct	gtgcggtgcg	ctgggcgtcc	aggaccgcct	gatcggccat	ctccagcgcc	1680
agccgcgtct	tctgcaagaa	ggcctcgccc	gcggcggtga	gggtcaggcg	ccggttagcg	1740
cgggagaaga	gcaccacgcc	caggcgctgc	tcgagttggt	taatctgctg	gctgagggcg	1800
ggctggggca	tatgtaaccg	ctctgccgcc	cgatgcatat	gtagttcttc	agcaacgacc	1860
acaaaaatggc	gtaacgctcg	caaggacatg	gccggactcc	gcggagtaaa	ttgataataa	1920
aaatgttatc	aataaagcat	gaatgatgca	attgataacc	attagcctgc	gagcatactg	1980
tgcgcatcga	cacgctaagg	agaacatcat	gaccgcaccg	attcaggatc	tgcgcgacgc	2040
tatcgcgctg	ctgcaacagc	atgacaatca	gtacctgaa	accgatcatc	cggttgaccc	2100
taacgctgag	ctggccggcg	tctatcgcca	catcgcgcg	ggcggcaccg	tgaagcggcc	2160
cacgcgcac	ggccggcgga	tgatgtttaa	caatattaag	ggctatccgc	actcgcgcat	2220
tctggtgggc	atgcacgcca	gccgccagcg	ggccgcgctg	ctgctgggct	gcgaagcctc	2280
acagctggcg	ctggaggtag	gcaaagcggt	gaaaaaacgg	gtcgcgccgg	tggtcgttcc	2340
ggccagcagc	gccccctgtc	aggaacaggt	ctttctggcc	gacgatccgg	attttgattt	2400
gcgcaccctg	ctcccggcgc	ccaccaaac	ccgatcgac	gccggtccct	tcttctgcct	2460
gggcctggcg	ctggccagcg	atcccgaacg	cgcctcgctc	accgacgtca	ccatccaccg	2520
cttgtgcgtc	caggccgggg	atgagctgtc	gatgtttctc	gccgctggcc	gccatatcga	2580
agtgtttcgt	cagaaagccg	aggccgctgg	caaaccgctg	ccgataacca	tcaatatggg	2640
actcgatccg	gctatctata	tcggcgccctg	ctttgaagcg	ccgaccacac	gtttggctat	2700
aacgaactgg	gcgtcgccgg	tgcgctgcgt	cagcgtccgg	tagagctggg	acagggcgtc	2760
agcgtcccg	agaaagccat	cgctcgcgcc	gagatcgtaa	tcgaagggga	actgctgccg	2820
ggggtacgg	tcagagaaga	tcagcacaca	acagcgcca	tgcgatgccg	gaatttcctg	2880
gttactgcgg	cggcgccaat	ccgtcgctgc	cggtcattaa	agtcaaagcg	gtgaccatgc	2940
gaaacaatgc	gattctgcag	acgctggtag	ggccggggcg	agagcatacc	accctcgccg	3000

ES 2 663 445 T3

gattgccaac ggaagccagt atctggaatg ctgtcgaggc tgctatcccg ggcttttttac	3060
aaaatgtcta cgcccacacc gcggggcgcg gtaaattcct cgggatcctg caggtgaaaa	3120
aacgccagcc cgccgacgaa gggcgtcagg ggcaggccgc gttgctggcg ctggcgacct	3180
attccgagct gaaaaatata attctggtcg atgaagatgt cgatatcttt gacagcgacg	3240
atatcctgtg ggccatgacc acccgcatgc agggggatgt cagcatcacg acgatcccag	3300
gcattcgtgg tcaccagctg gatccttccc agaccccggc ctacagcccg tcgatccgcg	3360
gagaggggat cagttgcaag acgattttcg attgcacggt gccgtgggcg ctaaaatcac	3420
acttcgagcg cgcaccgttt gccgatgtcg atccgcgtcc gtttgcgcgc gagtattttg	3480
cccggctgga aaaaaaccac ggtcagtaaa atcaggtgat agccgccgga gcacggcggc	3540
atcttccggg ccagcatcac ctgcagcggg tggctgacgc agggttagtt gatcgcggcg	3600
gagaggtcct ttttcacctg ctcacgtctg tcgggggtca acacctggct cactgcgaag	3660
tagtatttca cagcataata ccgcacctgc tggctccagct ggccaaaggc ggccagctgc	3720
tgtttgacct tagcgtcatc ccatttcccg gagtgaataa cgtctgccag ggcaccatcc	3780
tgatagccgc tgatttaatc tggcttacat tgttttcgaa tccttgacgc agcgcctgga	3840
ttttggcgac ctgctcttca ctcacgttca ggtgctggac gaccggatcc tgcgagacag	3900
acggtatata ggccgaggtc gacgcctggc tggctgccgt aaagcaggtg gtcagcgcaa	3960
tggcgagcag ggtgttacgc aagcagatat tcacagtga tgatccttca aaaaagaaaa	4020
tgagaggcga ttatcactgc gctaataaag actatctgta acaaagggtt aatttaaac	4080
tggataaaaa aaggatggtg agaaacagaa atcagatccc gggtcagcag cacagaagaa	4140
tatattcatc cttccagtaa cggccctgtc caatgatata cccggcggcg ctgattaact	4200
gtttttgctt ttggtttcaa tcccctcaac gatcacatgg ctggtcaggg tatgaataga	4260
ttgcaacagc ccgggaaaag cggggtcgtt ttctttatcc cagaagtaat ctttatccac	4320
tttgacgcaa tcgaagcgga agcgtctccg cagcgggaag gacgtcgtcc gcggccaaaa	4380
tcattccagc agaccgggca aagcgcgcc agcgtgctca gcgcgctcag ctcacgtccg	4440
gcgataaaact cgtgaaagtt ctcatcttatt tccagagcaa tgtgtttaca ggagcgcagg	4500
aatcacaga gatagcgatc cgtcagaata aagtggctta ataaatcatc aatattcagc	4560
gatatcgggt tattatcgac ccgggcgaaa tcaaatacag aaagtaactc gatttgccga	4620
ataaatagag caagcttata gcgttcggta agcgtggaga aagaaaacgt cgacgcagag	4680
gtggtatttt gtgcgggtgc tataatatct ttagtaagca actcccacga gtggtagctg	4740
ccgtcatcgc taatagcggg ctccagaacg aagcgataag aggtattttt cactgtttct	4800
tcaaccatct aaaaaatacc aaaaataaga aagggttaag catgtcatat attttccgcc	4860
aacaaaaata gttaaagtg atcgataata atcattcgat agttaaaaac tatcaagata	4920

ES 2 663 445 T3

taattttattg atcggtaaat tgaattaata taaattagcc actgccgtaa ctccctctga	4980
aaagtcaatt aaaatattgt ttcaaaccag ccagttacca gagtattctg cgtaaagcct	5040
ggtcgtctca cgctttgtgc tgccaggtaa aaaaagagag gggtataaaa aatgaaaaat	5100
acaagccgcc agtttttagtc atatcattat gccgaatatg aataacgctg cgctgaggcg	5160
ccgcttcgcc tggcatgcc tgaatcctca acaaaaaagt gtgactcagt cgacaaaacg	5220
tcatattttc ccgctatcct gcagcgaaga agagtgaagt ggatgacagg cagtgaaaaa	5280
aataaacgtg attccgctgg ggctgatgct attcatgctc atcgccagcg catggctggg	5340
ccctgcgccg cggcacaccg gcagcatgca gtgcgtttgg tttgacgggg caatggtgag	5400
ctgcctgccg aagcaacgac tgggcgaagg ctgcgccgat catttactgg tcagacgata	5460
aaccggtact cgccgggtgg tgttgaacag attatcgctg gc	5502

<210> 10

<211> 4629

<212> ADN

<213> gen catA de Acinetobacter baylyi ADP1, incluyendo 410 bases de la secuencia aguas arriba y dos marcos de lectura abiertos aguas abajo;

<400> 10

atctgctcga ccatagtaat gatcacatta tgagctaaat ttacttttta aaattttaat	60
atattatata tatttgaatt ttattgtttt attttaattt ttagcttaga agtttttatt	120
aagatttatt tttaaattag atgtcgaaaa aattagtata ccaaaaaagc atgaaaacat	180
actctcttag gaattggagt cgccatgagt ttcatagata gttgatcagt atggaaggta	240
tagaaacgac tatcgaaata aataagtttg tgggtgtgtga agcaaggtaa agctcaaggc	300
tgaggcaaac caagcaaagg ttaattgaac cgatatgcac aacacattca acgatagcgt	360
cgacagataa gtttatcaaa tgatgttttg gcgatttcaa ggagaaagcc atggaagtta	420
aaatattcaa tactcaggat gtgcaagatt ttttacgtgt tgcaagcgga cttgagcaag	480
aagggtggcaa tccgcgtgta aagcagatca tccatcgtgt gctttcagat ttatataaag	540
ccattgaaga tttgaatatc acttcagatg aatactgggc aggtgtggca tattttaatc	600
agctaggtgc caatcaagaa gctgggttac tctcgccagg cttgggtttt gaccattacc	660
tcgatatgctg tatggatgcc gaagatgcc cactaggtat tgaaaatgctg acaccacgta	720
ccattgaagg cccgctatac gtggcagggtg cgcctgaatc ggtaggttat gcgcgcatgg	780
atgacggaag tgatccaaat ggtcataccc tgattctaca tggcacgatac tttgatgcag	840
atggaaaacc tttacccaat gccaaagttg aaatctggca tgccaatacc aaaggctttt	900
attcacactt cgaccaaca ggcgagcagc aggcgttcaa tatgcgccgt agtattatta	960
ccgatgaaaa cggtcagtat cgcgttcgta ccattttgcc tgcgggttat ggttgcac	1020

ES 2 663 445 T3

cagaaggtcc aacgcaacag ttgctgaatc agttgggccc tcatggtaac cgccctgcgc	1080
acattcacta ttttgtttct gccgatggac accgcaaact aactacgcaa attaatgtgg	1140
ctggcgatcc gtacacctat gacgactttg cttatgcaac ccgtgaaggc ttggtggttg	1200
atgcagtgga acacaccgat cctgaagcca ttaaggccaa tgatgttgaa ggcccattcg	1260
ctgaaatggt tttcgatcta aaattgacgc gtttggttga tggtagat aaccaagttg	1320
ttgatcgtcc acgtctagcg gtgtaataca ccaaaatggt tcaaaattat caggcgagtg	1380
atcatgatca ctggcctgtt tttatttcag ggaagggtgg agacaattac gtggacaatc	1440
aaatcattca ggaaaccgta gataaaattt taagcgtatt gccgaatcag gctgggcaat	1500
tggcacgctt ggttcgtctg atgcagtttg cttgtgaccc caccattacc gtcattggta	1560
aatataatca tggtaaaagc cgactactca atgagctgat cgggacagat attttttctg	1620
ttgccgataa acgagagacg attcaactgg ccgaacataa acaagatcag gtgcgttggt	1680
tggatgcacc cggactcgat gcagatgttg cggcagtgga tgatcgtcat gcttttgaag	1740
cagtctggac acaggcagat attcgccttt ttgtgcattc agtccgagaa ggcgaaactcg	1800
atgcaactga gcatcatctt ttacaacaac ttattgaaga tgcagaccat agccggcgcc	1860
aaaccatact ggtcttgacc cagatagatc agataccgga tcagacaatt ttaaccaga	1920
ttaaaacctc aattgcacag caggtaccca aactcgatat ttgggctgtt tcggccactc	1980
gccaccgtca gggatttgaa aatggaaaaa ccttgctgat cgaaaaaagt ggaatcggcg	2040
cgttacgaca tacacttgag caggcacttg ctacaggttc atctgcacga acgtatgaaa	2100
agaatagatt gctgtctgac ttgcatcatc aacttaagca gttattactc gatcaaaaac	2160
atgtacttca gcaactacaa cagacacagc agcagcaatt gcatgacttt gatacaggac	2220
tcatcaacat actcgataag attcgagtag atcttgagcc cattgtaaat atagatggtc	2280
aagaccaagc actcaatcca gattcatttg ccacgatgtt taaaaataca gcagccaagc	2340
agcaacgtgc caaagtgcag attgcttact cacgtgcctg tatcgagatc aatagccatc	2400
tcatacgtca cgggtgtggtg gggtttaccg cagagcaaca aaccacgata aaaagtattg	2460
atacggtcac tggtgcggtt tttggaattt cagtgaaatt tcgcatcag ctacgtgcat	2520
tgttttatac cgataccgaa cgacaacgct tgcaaagaga gtttcgattt tattttgaaa	2580
agtcagcagg ccgaatgatt ttagctgcca agattgagca gacaatgcgg cagcaagggc	2640
gtattcaaaa tgcaatgatg gcgttgcaac agatggagag tgcagcatga ccagcggcgg	2700
acacattcaa ttgtttatcg aacacacccg gcagattgcg actgcccaag gggatataca	2760
gttggcattg caatcgatgc agcaatggcg cgaagcattt gctacagcat taaaacaaaa	2820
tacctttgat ttaacgggct ggtcaccgca gacaaagatc gccaatcaac tcaagcaatt	2880
taaccataag cttacaacgc atgtatcgaa ttgggatacc gaatggcata ctttttagtgc	2940

ES 2 663 445 T3

tgctcaatcg gttgcagaag tatttcatga tcgggtgatg ttgcttgtat tcggtaagtt	3000
taatgccgga aagagttcat tgtgtaactt actggccgaa tgctttcggt ctcacgaaca	3060
aaccgtgcaa tattttcatg ttcaaaatga acagatattt tataaccgaat ctcacttacg	3120
cgaagggtgca accgagacga cagcgcaact acagggcgta tgtctgggtg aaaaacttat	3180
tttgctagat acaccagggt tgcattctgg tactcagaaa aatgcagcgc tcacacaaaa	3240
atztatcgac agtgcagatg gtgtgctgtg gctcagtagc gcaacttcac cgggtcaggt	3300
gcaagagcta gatgcactgg ggcgcgagtt aaagcgtcat aaacctttat ttcctgttat	3360
tacccgaagc gattttgtcg aagaagatga aattgatggg gagctatgta cagtgccttg	3420
caataaaaat tcagaacaac gtgcgttgca agagtctgat gtattgatgc gtgcgaaaga	3480
aaaactgcac atatgcaagt ggatgtgagt ttattaaagc cgcccggtgc cgtttcaact	3540
caaatggcgc gtgaagcaga tatgaacca caagccatga acgaggctgg ttttgagcga	3600
ttatttgcag cacttttggc tcttattgag cctgctttgc gctataagca gcgtaaacct	3660
gccgaagtat tggtgcattt tttgcaagaa catatcattg aaggtttaag gttttacctg	3720
caacccgatc tagagcaaat acaacaggac ctcaaacagg ctcaagatga tttacgacag	3780
ctacacaccg atttagccga ggagctctgg cgtagcgtat tgcctgagct accacaactt	3840
cttgagcaac atgcaagtac acaaaatatt gatgccgtag tgaacagttt gaacgagtgg	3900
ataaacgtcg cattcgaaca acagcttgca attcagcttg atgcttatgg tttaaatttg	3960
gattcgctta gcaagatcga aaaaaccgaa aaaatgcagt atgaacgcat tgcgggaatg	4020
gtggtgcatg atggcttgta cagcactctc acgcagcaga ttcaacaagc tgtcaaagct	4080
tctacgagtg aattgattga tcagtgtcag gctcaacttg agcagtcaat caaacatgtt	4140
caaacactcg atgaaacctt catcgattac agcgcagcac tcgatcaact cagccaagcg	4200
ctacgcattg aataaagagc agtaaatttt tcagacatat tttattcgat gagtggcctg	4260
atatggtgcg ttgcaaacac ctctgtaca caggcgagaa ttttaggaat gtaattactg	4320
tggtccatat ttgcgaccgc gagtgaattt gggctatagg catcatcatc taaaattgga	4380
atataaagta gattcttcac cccaatatcc atggcagacg ccggtacgat gcagacgcct	4440
tcacctgctg ccaccaagcc gagtgccagt tgaatttctc gaatttcggt gaggttggat	4500
ggtactaggc ctagttcggg aaagagtgac tgaataaagg tcgcaaaatt gggcttttga	4560
gagactgggt acagcagcat cggttcatca ataatttgag agagatgaac ccctgttgct	4620
gcaaaactga	4629

5

<210> 11
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> CatA de Acinetobacter baylyi ADP1;

<400> 11

```

Met Glu Val Lys Ile Phe Asn Thr Gln Asp Val Gln Asp Phe Leu Arg
1          5          10          15

Val Ala Ser Gly Leu Glu Gln Glu Gly Gly Asn Pro Arg Val Lys Gln
          20          25          30

Ile Ile His Arg Val Leu Ser Asp Leu Tyr Lys Ala Ile Glu Asp Leu
          35          40          45

Asn Ile Thr Ser Asp Glu Tyr Trp Ala Gly Val Ala Tyr Leu Asn Gln
          50          55          60

Leu Gly Ala Asn Gln Glu Ala Gly Leu Leu Ser Pro Gly Leu Gly Phe
65          70          75          80

Asp His Tyr Leu Asp Met Arg Met Asp Ala Glu Asp Ala Ala Leu Gly
          85          90          95

Ile Glu Asn Ala Thr Pro Arg Thr Ile Glu Gly Pro Leu Tyr Val Ala
          100          105          110

Gly Ala Pro Glu Ser Val Gly Tyr Ala Arg Met Asp Asp Gly Ser Asp
          115          120          125

Pro Asn Gly His Thr Leu Ile Leu His Gly Thr Ile Phe Asp Ala Asp
          130          135          140

Gly Lys Pro Leu Pro Asn Ala Lys Val Glu Ile Trp His Ala Asn Thr
145          150          155          160

Lys Gly Phe Tyr Ser His Phe Asp Pro Thr Gly Glu Gln Gln Ala Phe
          165          170          175

Asn Met Arg Arg Ser Ile Ile Thr Asp Glu Asn Gly Gln Tyr Arg Val
          180          185          190

Arg Thr Ile Leu Pro Ala Gly Tyr Gly Cys Pro Pro Glu Gly Pro Thr
          195          200          205

Gln Gln Leu Leu Asn Gln Leu Gly Arg His Gly Asn Arg Pro Ala His
210          215          220

Ile His Tyr Phe Val Ser Ala Asp Gly His Arg Lys Leu Thr Thr Gln
225          230          235          240
    
```

10

ES 2 663 445 T3

Ile Asn Val Ala Gly Asp Pro Tyr Thr Tyr Asp Asp Phe Ala Tyr Ala
245 250 255

Thr Arg Glu Gly Leu Val Val Asp Ala Val Glu His Thr Asp Pro Glu
260 265 270

Ala Ile Lys Ala Asn Asp Val Glu Gly Pro Phe Ala Glu Met Val Phe
275 280 285

Asp Leu Lys Leu Thr Arg Leu Val Asp Gly Val Asp Asn Gln Val Val
290 295 300

Asp Arg Pro Arg Leu Ala Val
305 310

<210> 12
<211> 1461
<212> ADN
<213> quiC de Acinetobacter sp. ADP1;

<400> 12

10

atgaaattaa	cttcttttacg	cgtatcttta	ttggcgctgg	gcttggtaac	atcaggtttt	60
gctgcggcag	aaacttatac	tgtagatcgt	tatcaggatg	atagtgaaaa	aggctctttg	120
cgttgggcaa	ttgaacaatc	taatgcaaat	agcgcacaag	agaatcagat	tctgattcag	180
gctgttggtg	aggcacctta	tgtgatcaag	gtggataaac	cgttaccacc	gattaaatca	240
tctgtaaaaa	ttattggtac	agaatgggat	aaaacgggcg	aattttattgc	gattgatggt	300
tcaaactata	tcaagggcga	aggcgaaaaa	gcatgtccag	gtgcaaatac	aggacaatat	360
ggtagcaaat	ttcgtaccat	gactttacca	ggtttggttc	tacaagatgt	caatgggtgtg	420
accctgaaa	gtcttgatgt	tcacgcgttc	tgtattggtg	tactggtaaa	tcgttcaagc	480
aataatttga	ttcagcataa	ccgtatttca	aataattacg	gtggcgctgg	tgtcatgatc	540
acgggtgatg	atggttaaagg	taaccaaacg	tctaccacca	ccaataacaa	caaagtattg	600
gataatgtgt	ttattgacaa	tggcgatggt	cttgaactga	cgcgtggagc	agcattcaac	660
ctgattgcta	acaatctgtt	tacatcgacc	aaagccaatc	cagagccgtc	tcaaggcatt	720
gaaattcttt	gggggaatga	caatgcagtg	gtgggtaaca	aatttgaaaa	ctattcagat	780
ggctacaaa	tcaactgggg	taaacgtaat	tacatcgctt	ataacgaatt	gaccaataac	840
tctttgggtt	tcaatcttac	aggtgatgga	aacatcttcg	atagtaacaa	agtgcattgg	900
aatcgtattg	gtatcgcaat	tcgttctgaa	aaagatgcaa	atgcacgtat	cacacttacc	960
aaaaatcaga	tttgggataa	tggtaaagat	atcaaacgct	gtgaggctgg	tggttcatgt	1020
gttccaaacc	aacgtttagg	tgcaattgta	tttgggtgtc	ctgcgcttga	gcatgaagg	1080

ES 2 663 445 T3

```

tttgtaggct ctctgtggtgg cgggtgtagtc attgaacctg caaaattaca aaaaacatgt 1140
acacagccaa atcaacaaaa ctgtaatgcc attccgaacc aaggtattca ggcacctaaa 1200
ctgactgtca gtaaaaaaca acttacagtt gaagttaaag gaacacaaaa ccagcgttac 1260
aacgtagaat tttttgaaa tcgtaatgca tcttcttcg aagctgagca atatttaggt 1320
tcaattgttg tagtgacaga tcatcaaggt cttgcaaaag caaactgggc accaaaagtc 1380
agcatgccat ctgttactgc gaatgtaact gatcacttgg gcgccacttc agagttaagt 1440
tctgcagtga aaatgagata a 1461

```

<210> 13
 <211> 1461
 <212> ADN
 <213> Gen quiC con optimización de codones de Acinetobacter sp. ADP1;

<400> 13

```

atgaaactga ccagcctgcg tgttagcctg ctggcactgg gtctgggttac cagcgggttt 60
gcagcagcag aaacctatac cgttgatcgt tatcaggatg atagcga aaa aggtagcctg 120
cgttgggcaa ttgaacagag caatgcaaat agcgcacaag aaaaccagat tctgattcag 180
gcagttggta aagcaccgta tgttatcaaa gttgataaac cgctgcctcc gattaaaagc 240
agcgttaaaa tcattggcac cgagtgggat aaaaccggtg aatttattgc aattgatggc 300
agcaactata tcaaggcgga aggtgaaaaa gcatgtccgg gtgcaaatcc gggtcagtat 360
ggcaccaatg ttcgtaccat gaccctgcct ggtctggttc tgcaagatgt taatgggtgt 420
accctgaaag gtctggatgt tcatcgtttt tgtattggtg ttctgggtta tcgcagcagc 480
aataacctga ttcagcataa tcgtatcagc aacaattatg gtgggtgccgg tgttatgatt 540
accggtgatg atggtaaagg taatccgacc agcaccacca ccaataataa caaagttctg 600
gataacgtgt tcatcgataa tggatgatgt ctggaactga cccgtggtgc agcatttaat 660
ctgattgcaa ataacctgtt taccagcaca aaagccaatc cggaaccgag ccagggtatt 720
gaaattctgt ggggtaataa taatgccgtg gtgggtaaca aattcgaaaa ctattcagat 780
ggcctgcaaa tcaattgggg taaacgtaac tatatcgctc ataacgaact gaccaataac 840
agcctgggtt tcaatctgac aggtgatggt aacatcttcg acagcaataa agtgcagtgt 900
aaccgtattg gtattgccat tcgtagtga aaagatgcca atgcacgtat taccctgacc 960
aaaaatcaga tttgggataa cggcaaagat atcaaactgt gtgaagccgg tggtagctgt 1020
gttccgaatc agcgtctggg tgcaattgtt tttggtgttc cggcactgga acatgaaggt 1080
tttggttgga gccgtggcgg tgggtgtgtt attgaaccgg caaaactgca aaaaacctgc 1140
accagccga accagcagaa ttgtaatgca attcctaatac agggatttca ggcaccgaaa 1200
ctgacagtta gcaaaaaaca gctgaccgtt gaagttaaag gcaccctaa tcagcgttat 1260

```

ES 2 663 445 T3

aatgtggaat tttttggcaa tcgtaatgcc agcagcagcg aagcagaaca gtatctgggt 1320
 agcattgttg ttgttaccga tcatcagggt ctggcaaaag caaattgggc tccgaaagtt 1380
 agcatgccga gcgttaccgc aaatgtgaca gatcatctgg gtgcgaccag cgaactgagc 1440
 agcgcagtta aaatgcgtta a 1461

<210> 14
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> QuiC de Acinetobacter sp. ADP1;

<400> 14

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

ES 2 663 445 T3

Thr	Thr	Asn	Asn	Asn	Lys	Val	Leu	Asp	Asn	Val	Phe	Ile	Asp	Asn	Gly
		195					200					205			
Asp	Gly	Leu	Glu	Leu	Thr	Arg	Gly	Ala	Ala	Phe	Asn	Leu	Ile	Ala	Asn
	210					215					220				
Asn	Leu	Phe	Thr	Ser	Thr	Lys	Ala	Asn	Pro	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Ile
	225				230					235					240
Glu	Ile	Leu	Trp	Gly	Asn	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Gly	Asn	Lys	Phe	Glu
				245					250					255	
Asn	Tyr	Ser	Asp	Gly	Leu	Gln	Ile	Asn	Trp	Gly	Lys	Arg	Asn	Tyr	Ile
			260					265					270		
Ala	Tyr	Asn	Glu	Leu	Thr	Asn	Asn	Ser	Leu	Gly	Phe	Asn	Leu	Thr	Gly
		275					280					285			
Asp	Gly	Asn	Ile	Phe	Asp	Ser	Asn	Lys	Val	His	Gly	Asn	Arg	Ile	Gly
	290					295					300				
Ile	Ala	Ile	Arg	Ser	Glu	Lys	Asp	Ala	Asn	Ala	Arg	Ile	Thr	Leu	Thr
	305				310					315					320
Lys	Asn	Gln	Ile	Trp	Asp	Asn	Gly	Lys	Asp	Ile	Lys	Arg	Cys	Glu	Ala
				325					330					335	
Gly	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Asn	Gln	Arg	Leu	Gly	Ala	Ile	Val	Phe	Gly
			340					345					350		
Val	Pro	Ala	Leu	Glu	His	Glu	Gly	Phe	Val	Gly	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly
		355					360					365			
Val	Val	Ile	Glu	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln	Lys	Thr	Cys	Thr	Gln	Pro	Asn
		370				375					380				
Gln	Gln	Asn	Cys	Asn	Ala	Ile	Pro	Asn	Gln	Gly	Ile	Gln	Ala	Pro	Lys
					390					395					400
Leu	Thr	Val	Ser	Lys	Lys	Gln	Leu	Thr	Val	Glu	Val	Lys	Gly	Thr	Pro
				405					410					415	
Asn	Gln	Arg	Tyr	Asn	Val	Glu	Phe	Phe	Gly	Asn	Arg	Asn	Ala	Ser	Ser
			420					425					430		
Ser	Glu	Ala	Glu	Gln	Tyr	Leu	Gly	Ser	Ile	Val	Val	Val	Thr	Asp	His
		435					440					445			

ES 2 663 445 T3

Gln Gly Leu Ala Lys Ala Asn Trp Ala Pro Lys Val Ser Met Pro Ser
450 455 460

Val Thr Ala Asn Val Thr Asp His Leu Gly Ala Thr Ser Glu Leu Ser
465 470 475 480

Ser Ala Val Lys Met Arg
485

<210> 15
<211> 9462
<212> ADN
<213> Plásmido pAC21;
<220>
<221> rasgo_misc
<222> (5924)..(5924)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 15

gttgacagta	agacgggtaa	gcctgttgat	gataccgctg	ccttactggg	tgcatatagcc	60
agtctgaatg	acctgtcacg	ggataatccg	aagtggctcag	actggaaaat	cagagggcag	120
gaactgctga	acagcaaaaa	gtcagatagc	accacatagc	agacccgcc	taaaacgcc	180
tgagaagccc	gtgacgggct	tttcttgat	tatgggtagt	ttccttgcat	gaatccataa	240
aaggcgctg	tagtgccatt	tacccccatt	cactgccaga	gccgtgagcg	cagcgaactg	300
aatgtcacga	aaaagacagc	gactcaggtg	cctgatggtc	ggagacaaaa	ggaatattca	360
gcgatttgcc	cgagcttgcc	aggggtgctac	ttaagccttt	agggttttta	ggtctgtttt	420
gtagaggagc	aaacagcggt	tgcgacatcc	ttttgtaata	ctgcggaact	gactaaagta	480
gtgagttata	cacagggctg	ggatctattc	tttttatctt	tttttattct	ttctttattc	540
tataaattat	aaccacttga	atataaaca	aaaaaacaca	caaaggtcta	gcggaattta	600
cagagggctc	agcagaattt	acaagttttc	cagcaaaggt	ctagcagaat	ttacagatac	660
ccacaactca	aaggaaaagg	actagtaatt	atcattgact	agcccatctc	aattggtata	720
gtgattaaaa	tcacctagac	caattgagat	gtatgtctga	attagttggt	ttcaaagcaa	780
atgaactagc	gattagtcgc	tatgacttaa	cggagcatga	aaccaagcta	attttatgct	840
gtgtggcact	actcaacccc	acgattgaaa	accctacaag	gaaagaacgg	acggtatcgt	900
tcacttataa	ccaatacgct	cagatgatga	acatcagtag	ggaaaatgct	tatggtgtat	960
tagctaaagc	aaccagagag	ctgatgacga	gaactgtgga	aatcaggaat	cctttgggta	1020
aaggctttga	gattttccag	tggacaaact	atgccaaagt	ctcaagcgaa	aaattagaat	1080
tagtttttag	tgaagagata	ttgccttatc	ttttccagtt	aaaaaaattc	ataaaatata	1140

ES 2 663 445 T3

atctggaaca	tgtaagtct	tttgaaaaca	aatactctat	gaggatttat	gagtggttat	1200
taaaagaact	aacacaaaag	aaaactcaca	aggcaaatat	agagattagc	cttgatgaat	1260
ttaagttcat	gttaatgctt	gaaaataact	accatgagtt	taaaaggctt	aaccaatggg	1320
ttttgaaacc	aataagtaaa	gatttaaaca	cttacagcaa	tatgaaattg	gtgggtgata	1380
agcgaggccg	cccgactgat	acgttgattt	tccaagttga	actagataga	caaatggatc	1440
tcgtaaccga	acttgagaac	aaccagataa	aatgaatgg	tgacaaaata	ccaacaacca	1500
ttacatcaga	ttcctaccta	cgtaacggac	taagaaaaac	actacacgat	gctttaactg	1560
caaaaattca	gctcaccagt	tttgaggcaa	aatttttgag	tgacatgcaa	agtaagcatg	1620
atctcaatgg	ttcgtttctca	tggtcacgc	aaaaacaacg	aaccacacta	gagaacatac	1680
tggttaaata	cggaaggatc	tgaggttctt	atggctcttg	tatctatcag	tgaagcatca	1740
agactaacia	acaaaagtag	aacaactgtt	caccgttaga	tatcaaaggg	aaaactgtcc	1800
atatgcacag	atgaaaacgg	tgtaaaaaag	atagatacat	cagagctttt	acgagttttt	1860
ggtgcattta	aagctgttca	ccatgaacag	atcgacaatg	taacagatga	acagcatgta	1920
acacctaata	gaacaggtga	aaccagtaaa	acaaagcaac	tagaacatga	aattgaacac	1980
ctgagacaac	ttgttacagc	tcaacagtca	cacatagaca	gcctgaaaca	ggcgtatgctg	2040
cttatcgaat	caaagctgcc	gacaacacgg	gagccagtga	cgctcccgt	ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat	tctggaagaa	atagcgcttt	cagccggcaa	acctgaagcc	ggatctgcga	2160
ttctgataac	aaactagcaa	caccagaaca	gcccgtttgc	gggcagcaaa	accggttatg	2220
cttgtaaacc	gttttgtaa	aaaattttta	aaataaaaaa	ggggacctct	agggtcccca	2280
attaattagt	aatataatct	attaaaggtc	attcaaaagg	tcatccaccg	gatcaattcc	2340
cctgctcgcg	caggctgggt	gccaaactct	cggttaacat	caaggcccga	tccttgagac	2400
ccttgccctc	ccgcacgatg	atcgtgccgt	gatcgaaatc	cagatccttg	accgcagtt	2460
gcaaaccctc	actgatccgc	atgcccgttc	catacagaag	ctgggcgaac	aaacgatgct	2520
cgcttccag	aaaaccgag	atgcgaacca	cttcatccgg	ggtcagcacc	accggcaagc	2580
gccgcgacgg	ccgaggtctt	ccgatctcct	gaagccagg	cagatccgtg	cacagcacct	2640
tgccgtagaa	gaacagcaag	gccgccaatg	cctgacgatg	cgtggagacc	gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc	cagccaggac	agaaatgcct	cgacttcgct	gctgcccagg	gttgccgggt	2760
gacgcacacc	gtggaaacgg	atgaaggcac	gaacccagt	gacataagcc	tggtcggttc	2820
gtaagctgta	atgcaagtag	cgtatgcgct	cacgcaactg	gtccagaacc	ttgaccgaac	2880
gcagcggtgg	taacggcgca	gtggcggttt	tcatggcttg	ttatgactgt	ttttttgggg	2940
tacagtctat	gcctcgggca	tccaagcagc	aagcgcggtta	cgccgtgggt	cgatgtttga	3000

ES 2 663 445 T3

tgttatggag	cagcaacgat	gttacgcagc	agggcagtcg	ccctaaaaca	aagttaaaca	3060
tcatgagggg	agcggatgatc	gccgaagtat	cgactcaact	atcagaggtg	gttggcgtca	3120
tcgagcgcca	tctcgaaccg	acgttgctgg	ccgtacatct	gtacggctcc	gcagtggatg	3180
gcggcctgaa	gccacacagt	gatattgatt	tgctggttac	ggtgaccgta	aggcttgatg	3240
aaacaacgcg	gcgagctttg	atcaacgacc	ttttggaaac	ttcggcttcc	cctggagaga	3300
gcgagattct	ccgcgctgta	gaagtaccca	ttgttggtga	cgacgacatc	attccgtggc	3360
gttatccagc	taagcgcgaa	ctgcaatttg	gagaatggca	gcgcaatgac	attcttgtag	3420
gtatcttcga	gccagccacg	atcgacattg	atctggctat	cttgctgaca	aaagcaagag	3480
aacatagcgt	tgccctggta	ggtccagcgg	cgagggaact	ctttgatccg	gttcctgaac	3540
aggatctatt	tgaggcgcta	aatgaaacct	taacgctatg	gaactcgccg	cccgaactgg	3600
ctggcgatga	gcgaaatgta	gtgcttacgt	tgctccgcat	ttggtacagc	gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc	gccgaaggat	gtcgctgccg	actgggcaat	ggagcgccct	ccggcccagt	3720
atcagcccgt	catacttgaa	gctagacagg	cttatcttgg	acaagaagaa	gatcgcttgg	3780
cctcgcgcg	agatcagttg	gaagaatttg	tccactacgt	gaaaggcgag	atcaccaagg	3840
tagtcggcaa	ataatgtcta	acaattcgtt	caagccgacg	ccgcttcgcg	gcgaggctta	3900
actcaagcgt	tagatgcact	aagcacataa	ttgctcacag	ccaaactatc	aggtcaagtc	3960
tgcttttatt	atttttaagc	gtgcataata	agccctacac	aaattgggag	atatatcatg	4020
aaaggctggc	tttttcttgt	tatcgcaata	gttggcgaag	taatcgcaac	atccgcatta	4080
aaatctagcg	agggttttac	taagctgatc	cggtggatga	ccttttgaat	gacctttaat	4140
agattatatt	actaattaat	tggggaccct	agaggctccc	ttttttatct	taaaaatttt	4200
ttcacaaaac	ggtttacaag	catacgttgg	ccgattcatt	aatgcagctg	gcacgacagg	4260
tttcccgaact	ggaaaagcgg	cagtgcgcgc	aacgcaatta	atgtgagtta	gctcactcat	4320
taggcacccc	aggctttaca	ctttatgctt	ccggctcgta	tggtgtgtgg	aattgtgagc	4380
ggataaacaat	ttcacacagc	aaacagctat	gaccatgatt	acgccaaagc	tgcatgcctg	4440
caggctgact	ctagaggatc	ccccccgccc	ccgacagagt	aataggtttt	acttaatagc	4500
tcttcctgtc	ccttccaggc	agtgatccgc	attccgttct	catggcgagg	caacatttcg	4560
ggatggaaga	taatgttctt	tgctacagga	aaatcaacaa	tatgcgcacc	agatgccact	4620
ggcagccgcc	cgctgcgcgt	tactaaactc	ataaatgcag	ggatctcatc	aatgacaaca	4680
tcctgcggac	tgtttcctgc	cagtcccatg	atgatggcga	catccgtggc	atggcctttg	4740
cccgtcagtg	acaacgacct	gtacagatcg	accacaatat	ggctcgtcgc	ggttaataag	4800
ccgctacttt	ccagccgac	aataaaaact	tttccggcat	tcattggccc	cacggtatgc	4860
gaactggagg	gaccaatccc	aattttgaaa	atatcgaatg	cactaatcat	gtgacggaag	4920

ES 2 663 445 T3

atcacttcgc	agaataaata	aatcctggtg	tcctgttga	taccgggaag	ccctgggcca	4980
acttttggcg	aaaatgagac	gttgatcggc	acgtaagagg	ttccaacttt	caccataatg	5040
aaataagatc	actaccgggc	gtattttttg	agttatcgag	attttcagga	gctaagggaag	5100
ctaaaatgga	gaaaaaaatc	actggatata	ccaccgttga	tatatcccaa	tggcatcgta	5160
aagaacattt	tgaggcatth	cagtcagttg	ctcaatgtac	ctataaccag	accgttcagc	5220
tggatattac	ggccttttta	aagaccgtaa	agaaaaataa	gcacaagttt	tatccggcct	5280
ttattcacat	tcttgcccg	ctgatgaatg	ctcatccgga	attccgtatg	gcaatgaaag	5340
acggtgagct	ggtgatatgg	gatagtgttc	acccttggtt	caccgttttc	catgagcaaa	5400
ctgaaacggt	ttcatcgctc	tggagtgaat	accacgacga	tttccggcag	tttctacaca	5460
tatatcgcga	agatgtggcg	tgttacggtg	aaaacctggc	ctatttcctt	aaagggttta	5520
ttgagaatat	gtttttcgtc	tcagccaatc	cctgggtgag	tttcaccagt	tttgatttaa	5580
acgtggccaa	tatggacaac	ttcttcgccc	cgtttttcac	catgggcaaa	tattatacgc	5640
aaggcgacaa	ggtgctgatg	ccgctggcga	ttcaggttca	tcatgccgtt	tgtgatggct	5700
tccatgtcgg	cagaatgctt	aatgaattac	aacagtactg	cgatgagtgg	cagggcgggg	5760
cgtaattttt	ttaaggcagt	tattggtgcc	cttaaacgcc	tggtgctacg	cctgaataag	5820
tgataataag	cggatgaatg	gcagaaattc	gaaagcaaat	tcgaccggtt	cgtcgggtca	5880
gggcagggtc	gttaaatagc	cgcttatgtc	tattgctggt	ttantcggta	cccggggatc	5940
gcggcccggg	accggatccc	atcacatata	cctgccgttc	actattatth	agtgaatga	6000
gatattatga	tattttctga	attgtgatta	aaaaggcaac	tttatgccca	tgcaacagaa	6060
actataaaaa	atacagagaa	tgaaaagaaa	cagatagatt	ttttagttht	ttaggcccgt	6120
agtctgcaaa	tccttttatg	atthttctatc	aaacaaaaga	ggaaaataga	ccagttgcaa	6180
tccaaacgag	agtctaatag	aatgagggtc	aaaagtaaat	cgcgcgggtt	tgttactgat	6240
aaagcaggca	agacctaaaa	tgtgtaaagg	gcaaagtgt	tactttggcg	tcaccctta	6300
catatthtag	gtctthtttt	attgtgcgta	actaacttgc	catcttcaaa	caggagggtt	6360
ggaagaagca	gaccgctaac	acagtacata	aaaaaggaga	catgaacgat	gaacatcaaa	6420
aagthtgcaa	aacaagcaac	agtattaacc	thtactaccg	cactgctggc	aggaggcgca	6480
actcaagcgt	ttgcgaaaga	aacgaaccaa	aagccatata	aggaaacata	cggcattthc	6540
catattacac	gccatgatat	gctgcaaatc	cctgaacagc	aaaaaatga	aaaatatcaa	6600
gttcctgaat	tcgattcgtc	cacaattaaa	aatatctctt	ctgcaaaagg	cctggacgth	6660
tgggacagct	ggccattaca	aaacgctgac	ggcactgtcg	caaactatca	cggctaccac	6720
atcgtctthg	cattagccgg	agatcctaaa	aatgcggatg	acacatcgat	ttacatgttc	6780

ES 2 663 445 T3

tatcaaaaag tggcgaaac ttctattgac agctggaaaa acgctggccg cgtctttaaa	6840
gacagcgaca aattcgatgc aaatgattct atcctaaaag accaaacaca agaatggtca	6900
ggttcagcca catttacatc tgacggaaaa atccgtttat tctacactga tttctccggt	6960
aaacattacg gcaaacaaac actgacaact gcacaagtta acgtatcagc atcagacagc	7020
tctttgaaca tcaacggtgt agaggattat aaatcaatct ttgacggtga cggaaaaacg	7080
tatcaaaatg tacagcagtt catcgatgaa ggcaactaca gctcaggcga caaccatacg	7140
ctgagagatc ctcactacgt agaagataaa ggccacaaat acttagtatt tgaagcaaac	7200
actggaactg aagatggcta ccaaggcgaa gaatctttat ttaacaaagc atactatggc	7260
aaaagccatc cattcttccg tcaagaaagt caaaaacttc tgcaaagcga taaaaaacgc	7320
acggctgagt tagcaaacgg cgctctcggg atgattgagc taaacgatga ttacacactg	7380
aaaaaagtga tgaacccgct gattgcatct aacacagtaa cagatgaaat tgaacgcgcg	7440
aacgtcttta aaatgaacgg caaatggtag ctgttccactg actcccgcgg atcaaaaatg	7500
acgattgacg gcattacgtc taacgatatt tacatgcttg gttatgtttc taattcttta	7560
actggcccat acaagccgct gaacaaaact ggcccttgtgt taaaaatgga tcttgatcct	7620
aacgatgtaa cctttactta ctcacacttc gctgtacctc aagcgaaagg aaacaatgtc	7680
gtgattacaa gctatatgac aaacagagga ttctacgcag acaaacatc aacgtttgcg	7740
ccgagcttcc tgctgaacat caaaggcaag aaaacatctg ttgtcaaaga cagcatcctt	7800
gaacaaggac aattaacagt taacaaataa aaacgcaaaa gaaaatgcc aatccctatt	7860
ggcattttct tttatttctt ccatttaaat ggatgcatgc gctagcggag tgtatactgg	7920
cttactatgt tggcactgat gagggtgtca gtgaagtgtc tcagcctcgt gagcgggacg	7980
gtcgtaaagg cgttccgctc cacttccactg aacggcaatc cgagggtgtg gatccaatta	8040
agggccacgt gtcattttaa ttccgttttt ccagttcaaa tgcaattgcc ttcaatgcac	8100
cttcgtagct gtggtagacc agcgggtgctg gctctcccc atttacggat aagaatgcat	8160
tttccgagtt aataccgtcg gcaatacctg acattaatac ttcacagtcg ctggcatcga	8220
gtacggaaaa cttaatcgaa gacgaaccac agttaataac caaaacaacc ggaaattcat	8280
tcatctcttt tctcatcctg agttacggat taaaacagtt tgtatacgat gttcaggatg	8340
gtcagcagac caatcacggt aacaaacacg ttatccagac gaccacggtt tttcgccaga	8400
gacggcgctt tacggatggc atacatcggc aacaggcaca gcagggatgc gataatcggg	8460
gcgcccacgt cttcaatcag gtcgaggatg ttccgggttg cgtaggcaac aaccaggtg	8520
gagcccatga tgaagatcat gctgagagta ttcagtttac ccagcgacac tttggttttg	8580
tcacctttat aaccgaactt cagaatcaga ccattcaagc cttccagcgt cccagatag	8640
tgaccgaaga aagatttgaa gatagccacg agtgcgatga tggaagccgc atattccagt	8700

ES 2 663 445 T3

gtaatcgga acgttggttt ggtaccggtc atggacgcaa agtgggttagc cagataagaa	8760
agcactggaa tattctgcgc tttggcttcc gccatgttgg ccggagacag agtaaacagg	8820
cagctaaagg caaagaacat caccactgca accatcagca tgctggcacg agaaatgatt	8880
tgggaacatt tacgttcggt gaagtcgga ccgaagtctt tctcactctc ttcacgttta	8940
gaaaccacga aggaagagac gattggcgag aagttaaagg agaaaacat gatggaaatc	9000
cccagccaga cagtgatcag gataccgtca tgaccggtta acgacagcga accgaggtca	9060
acctggtcga taactgcaga gttccagtaa gggatcagcg acaaagaaat cagcaccagg	9120
ctggcgataa acggccatac caggtagctc agggtagcga gctogaattc actggccgtc	9180
gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacct aacttaatcg ccttgacgca	9240
catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa	9300
cagttgcga gcctgaatgg cgaatggcgc ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg	9360
tgcggtatth cacaccgcat atggtgcact ctgagtacaa tctgctctga tgccgcatag	9420
ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgaat tc	9462

<210> 16
 <211> 9430
 <212> ADN
 <213> Plásmido pAC19;

<400> 16

gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc	60
agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag	120
gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcca taaaacgccc	180
tgagaagccc gtgacgggct tttcttgat tatgggtagt ttccttgcat gaatccataa	240
aaggcgctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg	300
aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca	360
gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt agggttttta ggtctgtttt	420
gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgtaata ctgcggaact gactaaagta	480
gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc	540
tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggtcta gcggaattta	600
cagagggctc agcagaattt acaagtttct cagcaaaggc ctagcagaat ttacagatac	660
ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata	720
gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa	780
atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct	840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt	900

ES 2 663 445 T3

tcacttataa ccaatacgc	cagatgatga acatcagtag	ggaaaatgct tatggtgtat	960
tagctaaagc aaccagagag	ctgatgacga gaactgtgga	aatcaggaat cctttggtta	1020
aaggctttga gatthttccag	tggacaaact atgccaaagt	ctcaagcgaa aaattagaat	1080
tagtttttag tgaagagata	ttgccttatc ttttccagtt	aaaaaaattc ataaaaatata	1140
atctggaaca tgttaagtct	tttgaaaaca aatactctat	gaggatttat gagtggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag	aaaactcaca aggcaaatat	agagattagc cttgatgaat	1260
ttaagttcat gttaatgctt	gaaaataact accatgagtt	taaaaggctt aaccaatggg	1320
ttttgaaacc aataagtaaa	gatttaacaa cttacagcaa	tatgaaattg gtggttgata	1380
agcgaggccg cccgactgat	acgttgattt tccaagttga	actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac	aaccagataa aatgaatgg	tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttccctaccta	cgtaacggac taagaaaaac	actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt	tttgaggcaa aattttttgag	tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttcggttctca	tggctcacgc aaaaacaacg	aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc	tgaggttctt atggctcttg	tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaacia acaaaagtag	aacaactggt caccgttaga	tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacgg	tgtaaaaaag atagatacat	cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca	ccatgaacag atcgacaatg	taacagatga acagcatgta	1920
acacctaata gaacagggtga	aaccagtaaa acaaagcaac	tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc	tcaacagtca cacatagaca	gcctgaaaca ggcgatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc	gacaacacgg gagccagtga	cgctcccgt ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat tctggaagaa	atagcgcttt cagccggcaa	acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa	caccagaaca gcccgtttgc	gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa	aaaattttta aaataaaaaa	ggggacctct aggggtcccca	2280
attaattagt aatataatct	attaaaggtc attcaaaagg	tcatccaccg gatcaattcc	2340
cctgctcgcg caggctgggt	gccaaagctct cgggtaacat	caaggcccg tccctggagc	2400
ccttgccctc ccgcacgatg	atcgtgccgt gatcgaaatc	cagatccttg acccgagtt	2460
gcaaaccctc actgatccgc	atgcccgctc catacagaag	ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgccttcag aaaaccgagg	atgcgaacca cttcatccgg	ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt	ccgatctcct gaagccaggg	cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccgtagaa gaacagcaag	gccgccaatg cctgacgatg	cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc cagccaggac	agaaatgcct cgacttcgct	gctgcccaag gttgccgggt	2760

ES 2 663 445 T3

gacgcacacc	gtggaaacgg	atgaaggcac	gaacccagt	gacataagcc	tggtcgggtc	2820
gtaagctgta	atgcaagtag	cgtatgcgct	cacgcaactg	gtccagaacc	ttgaccgaac	2880
gcagcgggtg	taacggcgca	gtggcggttt	tcatggcttg	ttatgactgt	ttttttgggg	2940
tacagtctat	gcctcgggca	tccaagcagc	aagcgcgtta	cgccgtgggt	cgatgtttga	3000
tgttatggag	cagcaacgat	gttacgcagc	agggcagtcg	ccctaaaaca	aagttaaaca	3060
tcatgaggga	agcggtgatc	gccgaagtat	cgactcaact	atcagaggta	gttggcgctca	3120
tcgagcgcca	tctcgaaccg	acgttgctgg	ccgtacattt	gtacggctcc	gcagtggatg	3180
gcggcctgaa	gccacacagt	gatattgatt	tgctggttac	ggtgaccgta	aggcttgatg	3240
aaacaacgcg	gcgagctttg	atcaacgacc	ttttggaaac	ttcggcttcc	cctggagaga	3300
gcgagattct	ccgcgctgta	gaagtcacca	ttgttgtgca	cgacgacatc	attccgtggc	3360
gttatccagc	taagcgcgaa	ctgcaatttg	gagaatggca	gcgcaatgac	attcttgtag	3420
gtatcttcga	gccagccacg	atcgacattg	atctggctat	cttgctgaca	aaagcaagag	3480
aacatagcgt	tgcttggtga	ggccagcggg	cggaggaact	ctttgatccg	gttcctgaac	3540
aggatctatt	tgaggcgcta	aatgaaacct	taacgctatg	gaactcgccg	cccgactggg	3600
ctggcgatga	gcgaaatgta	gtgcttacgt	tgtccgcat	ttggtacagc	gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc	gccgaaggat	gtcgtgcgcg	actgggcaat	ggagcgcctg	ccggcccagt	3720
atcagcccgt	catacttgaa	gctagacagg	cttatcttg	acaagaagaa	gatcgcttg	3780
cctcgcgcg	agatcagttg	gaagaatttg	tccactacgt	gaaaggcgag	atcaccaagg	3840
tagtcggcaa	ataatgtcta	acaattcggt	caagccgacg	ccgcttcg	gcgcggtta	3900
actcaagcgt	tagatgcact	aagcacataa	ttgctcacag	ccaaactatc	aggtcaagtc	3960
tgcttttatt	atttttaagc	gtgcataata	agccctacac	aaattgggag	atatatcatg	4020
aaaggctggc	tttttcttgt	tatcgcaata	gttggcggaag	taatcgcaac	atccgcat	4080
aaatctagcg	agggttttac	taagctgatc	cgggtgatga	ccttttgaat	gacctttaat	4140
agattatatt	actaattaat	tggggaccct	agagggtccc	ttttttat	taaaaatt	4200
ttcacaaaac	ggtttacaag	catacggttg	ccgattcatt	aatgcagctg	gcacgacagg	4260
tttcccgact	ggaaagcggg	cagtgcgcgc	aacgcaatta	atgtgagtta	gctcactcat	4320
taggcacccc	aggctttaca	ctttatgctt	ccggctcgta	tggtgtgtgg	aattgtgagc	4380
ggataacaat	ttcacacagg	aaacagctat	gaccatgatt	acgccaagct	tgcagtgcctg	4440
caggctgact	ctagaggatc	ccccccgccc	ccgacagagt	aatagggttt	acttaatagc	4500
tcttcctgtc	ccttcagggc	agtgatccgc	attccgttct	catggcgagg	caacatttcg	4560
ggatggaaga	taatgttctt	tgctacagga	aaatcaacaa	tatgcgcacc	agatgccact	4620
ggcagccgcc	cgctgcgcgt	tactaactct	ataaatgcag	ggatctcatc	aatgacaaca	4680

ES 2 663 445 T3

tcctgcgga	tgcttcctgc	cagtcctcatg	atgatggcga	catccgtggc	atggcctttg	4740
cccgtcagt	acaacgaccc	gtacagatcg	accacaatat	ggctcgtcgc	ggtaataaag	4800
ccgtacttt	ccagccgatc	aataaaactt	tttccggcat	tcattggccc	cacgggatgc	4860
gaactggagg	gaccaatccc	aattttgaaa	atatcgaatg	cactaatcat	atccacaccc	4920
tcggattgcc	gttcagtgaa	gtggagcggg	acgaccttac	gaccgtccc	ctcacgaggc	4980
tttacgcact	acgtactg	atggcttcaa	tttccagcgg	gagggcgga	ccactaatac	5040
aaaatatatc	aaaagttaat	aataatatta	ttcttactta	agactttttt	gtcttcattt	5100
tttagtaaaa	aatataaaaa	aggccacctc	ccgattttat	cggaaggcag	cctcttaaat	5160
tcagttcata	atattaaaaa	atattattca	acttcagaat	atttggtggc	ataggcagct	5220
gccgcaccca	acagtcacag	ctgcggataa	gtaatcaact	taaccggaat	cttgacatg	5280
acgcgttcaa	agcgtccttt	tgaaacaaag	cgctgacgga	aaccagattc	tggcaaatgg	5340
gaagcgatac	gaagaccgac	accaccgcca	ataacaacac	tggttgacc	ctgtgcaaaa	5400
gcaagatcac	cagcgatagc	gccaaaggctc	aagcagaagc	gatccaaagc	ggcttcagca	5460
aggttgctct	taccttccaa	agccatctgc	cataatttaa	tatcatccag	caagctgaac	5520
ggaacgcctt	caatggcagc	cagtgcctcg	tagatattac	caagaccg	gccagaaata	5580
atgcgttcga	tagaaacgcg	gcggaaacgt	tcacgtaaac	gtgccagaat	tttgtcttca	5640
agtctgtcaa	gcggagcaaa	gtcgatatga	ccgccttcag	tttcgatgac	gaaataacgg	5700
ccttcagtcc	gcaacagatg	ggcaacaccc	aagcccgttc	ccggaccaag	aatagtata	5760
acaccatcgc	taggaagcgc	ttcatcagga	ccacaaatat	gatccagata	agaagaatcc	5820
atatgcgcaa	ccgcgtgggc	aaccgcgcgc	aagtattga	tcagaacatg	cgtatcgatg	5880
tccagctttt	cattcagagt	agctggtctt	aatacccaag	ggttattggt	aagttttaa	5940
acttcacat	gaaccggg	agcccatgca	atagctgccc	cacgtggcag	aggacgaccc	6000
agtttttcac	cgaaacgttc	ccaagctaac	tgcaagctag	catgttctgc	cgttttaaaa	6060
gttggttctt	ctccaagaga	aagaacccga	ccattgctta	cttcgcaat	agagaaacgc	6120
gcatgcgttc	caccgatgtc	aatcgcaaca	atttcataa	taattccttt	ctgaaatcag	6180
aaggctaccc	aacaggtaaa	ataagtccgc	ccgctttata	ccatcggtgt	aaacaaaaag	6240
tataattggt	taagacttat	ctaaaaaaga	caaaaggatt	cagccaaagc	aagtttaact	6300
acttctggga	gcgccacatc	tcctcgattt	catccaggct	ccgacctttg	gtttccggca	6360
cgaagcgagc	aacaatcaag	ccacctaaaga	tacttaaatgc	tcgaaaaacg	agataggaga	6420
aaccgtgggt	gaaagtctga	ttcaatgctg	gagaaccatc	ggcaacctta	aacaggaagt	6480
taaccaagat	attagctaac	cattgtccgc	taacagcgat	aggcatagct	gcgccttga	6540

ES 2 663 445 T3

tggaactcgg gaacatttct gacagaacaa cccagcagac agggcccat gacataccaa	6600
agactgcaat ataaagaagc acagaagcca aaggcaaac accaccgact ttgaaccaga	6660
aacagcagcc taaaacagcc atcattgcag ccataccgag agcaccctaa ataagcagag	6720
gtttacggcc gaagcgggtca acaacacggg aagcaatcat ggtgaagatg aagttcacia	6780
caccgataga gatggtctgc aataatgccg tatcagctcc aaaacctaaa ttctggaaca	6840
tctgcggtgc ataatacagc acggcggtta taccgactaa ctgctggaag gcagcaacgg	6900
atacaccggc aaaaacaacg gtgataccaa aagcaaacaa acctgcgctg cttttgtcca	6960
tggctttatc aaagccagct ttaatctttt gaatcgtcag attagatcg gcttgcggtt	7020
ccagacgagc aaggattttg ctagcctcgg aatgacgtcc cttcatcacc aaccaatgcg	7080
gcgtatccgg tgcgggttaac agcagcaata agaaggcaat accgatcagg ccttctgaag	7140
ccggagacca gcaccaacca ctggcattaa cccaatcgat agaaccgaaa tgagccagta	7200
accaggtaaa gatataaccg gttaaagcac ccgtcacaat ggccatctgc tgaccagaaa	7260
ccatctgacc acgtttgtct ggcgagcaa tttcagcaat ataggttggg gtcaaggttg	7320
aaacgacacc gatacctaaa ccggcaagaa accggaaaaa gcaaaaaatt tgtaaagccg	7380
aaccaccggt tccaaataat ttttcggtta acgcagcacc aaaaccggcg gcgacgaaac	7440
aatggaact catcaacaat ccgccgcgac gaccgaagcg aataccaatc cagccagaca	7500
gcaaagaacc ggtaacacaa ccgacaaaaa cagcaacaac gaccatccca gaaagggag	7560
ccgcagccgt agcagacagg tgacgagggg caataaaatg gatatcaacc ggtgtaccga	7620
ttgcagcgat aaccgctgaa tcgtaaccga aaagcaagcc gcctatagca gcgattaggg	7680
ctagtgcgct gactagaccc tgactacttt cagaactcat ggcgattcct ctccctctag	7740
agcgtcctgc tgttggttaag attattatac cacaccttgt agataaagtc aacaactttt	7800
tgcaaaattt ttcaggaatt ttagcagagg ttgttctgga tgtagaacia aacatctttc	7860
cgctcttggt ctgttaggat atctttcttg gaagctaggt aggcctcgag ttatggcagt	7920
tgggtaaaag gaaacaaaaa gaccgttttc acacaaaacg gtcttttttcg atttcttttt	7980
acagtcacag ccacttttgc accaattaag gccacgctgt catttaaaact ccgtttttcc	8040
agttcaaatg caattgcctt caatgcacct tcgtagctgt ggtgagccag cggtgctggc	8100
tctccccat ttacggataa gaatgcattt tccgagttaa taccgtcggc aatacctgac	8160
attaatactt cacagtcgct ggcatcgagt acggaaaact taatcgaaga cgaaccacag	8220
ttaataacca aaacaaccgg aaattcattc atctcttttc tcatcctgag ttacggatta	8280
aaacagtttg tatacgatgt tcaggatggt cagcagacca atcacggtaa caaacacgtt	8340
atccagacga ccacggtatt tcgccagaga cggcgcttta cggatggcat acatcggcaa	8400
caggcacagc agggatgcga taatcgggtc gcccatggct tcaatcaggt cgaggatgtt	8460

ES 2 663 445 T3

	cgggttggcg taggcaacaa cccaggtgga gccatgatg aagatcatgc tgagagtatt	8520
	cagtttaccg agcgacactt tggttttgtc acctttataa ccgaacttca gaatcagacc	8580
5	attcaagcct tccagcgtcc ccagatagtg accgaagaaa gatttgaaga tagccacgag	8640
	tgcgatgatg gaagccgcat attccagtgt aatcgcgaa gttgttttgg taccggtcat	8700
	ggacgcaaag tggtagcca gataagaaag cactggaata ttctgcgctt tggcttccgc	8760
10	catggttgcc ggagacagag taaacaggca gctaaaggca aagaacatca cactgcaac	8820
	catcagcatg ctggcacgag aatgatttg ggaacattta cgttcggtga agtcgagacc	8880
	gaagtctttc tcatactctt cacgtttaga aaccacgaag gaagagacga ttggcgagaa	8940
15	gttaaaggag aaaacccatga tggaaatccc cagccagaca gtgatcagga taccgtcatg	9000
	accggttaac gacagcgaac cgaggtcaac ctggctcgata actgcagagt tccagtaagg	9060
20	gatcagcgac aaagaaatca gcaccaggct ggcgataaac gccatacca ggtagctcag	9120
	ggtaccgagc tcgaattcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg	9180
	cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttcc gccagctggc gtaatagcga	9240
25	agaggcccgcc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgccct	9300
	gatgcgggtat tttctcctta cgcactctgtg cgggtatttca caccgcataat ggtgcactct	9360
	cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc	9420
30	tgacgaattc	9430
	<210> 17	
	<211> 5768	
	<212> ADN	
35	<213> Plásmido pMH17F;	
	<400> 17	
	gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc	60
	agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag	120
	gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agacccgcca taaaacgccc	180
	tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttccttgcat gaatccataa	240
	aaggcgccctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg	300
	aatgtcacga aaaagacagc gactcaggct cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca	360
	gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt agggttttta ggtctgtttt	420
	gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta	480
	gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc	540
	tataaattat aaccacttga atataaacia aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta	600
40	cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaggc ctagcagaat ttacagatac	660

ES 2 663 445 T3

ccacaactca	aaggaaaagg	actagtaatt	atcattgact	agcccatctc	aattggtata	720
gtgattaaaa	tcacctagac	caattgagat	gtatgtctga	attagttggt	ttcaaagcaa	780
atgaactagc	gattagtgcg	tatgacttaa	cggagcatga	aaccaagcta	attttatgct	840
gtgtggcact	actcaacccc	acgattgaaa	accctacaag	gaaagaacgg	acggtatcgt	900
tcacttataa	ccaatacgct	cagatgatga	acatcagtag	ggaaaatgct	tatggtgtat	960
tagctaaagc	aaccagagag	ctgatgacga	gaactgtgga	aatcaggaat	ccttttggtta	1020
aaggctttga	gattttccag	tggacaaaact	atgccaaagt	ctcaagcgaa	aaattagaat	1080
tagtttttag	tgaagagata	ttgccttata	ttttccagtt	aaaaaaattc	ataaaatata	1140
atctggaaca	tgttaagtct	tttgaaaaca	aatactctat	gaggatttat	gagtggttat	1200
taaaagaact	aacacaaaag	aaaactcaca	aggcaaatat	agagattagc	cttgatgaat	1260
ttaagttcat	gttaatgctt	gaaaataact	accatgagtt	taaaaggctt	aaccaatggg	1320
ttttgaaacc	aataagtaaa	gatttaaaca	cttacagcaa	tatgaaattg	gtgggtgata	1380
agcgaggccg	cccgactgat	acgttgattt	tccaagtga	actagataga	caaattggatc	1440
tcgtaaccga	acttgagaac	aaccagataa	aatgaatgg	tgacaaaata	ccaacaacca	1500
ttacatcaga	ttcctaccta	cgtaacggac	taagaaaaac	actacacgat	gctttaactg	1560
caaaaattca	gctcaccagt	tttgaggcaa	aatttttgag	tgacatgcaa	agtaagcatg	1620
atctcaatgg	ttcgttctca	tggctcacgc	aaaaacaacg	aaccacacta	gagaacatac	1680
tggctaaata	cggaaggatc	tgaggttctt	atggctcttg	tatctatcag	tgaagcatca	1740
agactaacia	acaaaagtag	aacaactggt	caccgttaga	tatcaaaggg	aaaactgtcc	1800
atatgcacag	atgaaaacgg	tgtaaaaaag	atagatacat	cagagctttt	acgagttttt	1860
ggtgcattta	aagctgttca	ccatgaacag	atcgacaatg	taacagatga	acagcatgta	1920
acacctaata	gaacaggtga	aaccagtaaa	acaaagcaac	tagaacatga	aattgaacac	1980
ctgagacaac	ttgttacagc	tcaacagtca	cacatagaca	gcctgaaaca	ggcgatgctg	2040
cttatcgaat	caaagctgcc	gacaacacgg	gagccagtga	cgcctcccgt	ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat	tctggaagaa	atagcgcttt	cagccggcaa	acctgaagcc	ggatctgcga	2160
ttctgataac	aaactagcaa	caccagaaca	gcccgtttgc	gggcagcaaa	acccgttatg	2220
cttgtaaaac	gttttgtaaa	aaaattttta	aaataaaaaa	ggggacctct	agggccccca	2280
attaattagt	aatataatct	attaaaggtc	attcaaaagg	tcatccaccg	gatcaattcc	2340
cctgctcgcg	caggctgggt	gccaaagctc	cgggtaacat	caaggcccga	tccttgagac	2400
ccttgccctc	ccgcacgatg	atcgtgccgt	gatcgaaatc	cagatccttg	acccgcagtt	2460
gcaaaccctc	actgatccgc	atgcccgttc	catacagaag	ctgggcgaac	aaacgatgct	2520

ES 2 663 445 T3

cgcttccag aaaaccgagg atgcgaacca cttcatccgg ggtcagcacc accggcaagc 2580
 gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctoct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct 2640
 tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc 2700
 gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgcccaag gttgccgggt 2760
 gacgcacacc gtggaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc 2820
 gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct cagcgaactg gtccagaacc ttgaccgaac 2880
 gcagcggtag taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttgggg 2940
 tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgccgtgggt cgatgtttga 3000
 tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca 3060
 tcatgagga agcgtgatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgta 3120
 tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg 3180
 gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctgggtac ggtgaccgta aggettgatg 3240
 aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttgaaac ttcggcttcc cctggagaga 3300
 gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttgttggtgca cgacgacatc attccgtggc 3360
 gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgag 3420
 gtatcttoga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag 3480
 aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaaact ctttgatccg gttcctgaac 3540
 aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg 3600
 ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacct tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg 3660
 gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgccctg ccggcccagt 3720
 atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg 3780
 cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg 3840
 tagtcggcaa ataatgtcta acaattcggt caagccgacg ccgcttcgcg gcggcgctta 3900
 actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc 3960
 tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatcatg 4020
 aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta 4080
 aaatctagcg agggctttac taagctgacg cgggtgatga ccttttgaat gacctttaat 4140
 agattatatt actaattaat tggggaccct agaggctccc ttttttattt taaaaatttt 4200
 ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 4260
 tttcccgact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat 4320
 taggcacccc aggccttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagt 4380
 tacctagaga gggtgagaat tgccgaacat gcgcataagt tccccgaca gatttcaggt 4440

ES 2 663 445 T3

	ggtcagcagc aacgcgttgc cattgcgcgt tcgctgtgta tgaagccgaa aattatgttg	4500
	tttgatgagc caacgtcggc gctcgatcct gagatggtga aagaggtgct ggatacgatg	4560
5	attgggctgg cgcagtcggg tatgacaatg ttgtgtgtaa cacatgagat ggggtttgca	4620
	cgaaccgtcg ctgaccgggt aatttttatg gatcgtgggg aaatagtgga gcaagctgca	4680
	cctgatgaat tttttgcgca tcctaaatca gagcgtacga gggcattttt atcgcaggta	4740
10	atccattaat tgaatgttag ttcgaaaagc aaaaaggcca tcctttcgga tggcctttcg	4800
	cttgatttga tgtctggcag tttatggcgg gcgtcctgcc cgccaccctc cgggccgttg	4860
	cttcgcaacg ttcaaaccg ctcccggcgg atttgcctta ctcgggagag tgttcaccga	4920
15	caaacaacag ataaaacaaa agggccagtc ttccgactga gccttttggt ttatttgatg	4980
	tctggcagtt ccctactctc gcatggggag accccacact accatcggcg ctacggcggt	5040
	ttcacttctg agttcggcat ggggtcaggt gggaccaccg cgctactgcc gccagacaaa	5100
20	ttcttttcta atctgccgaa ctttaacctt aaaagtgggt ctgataccca gagtgcgaact	5160
	ggggacctca cccttaccaa ggggtgcgctc taccaactga gccatatcag cgcgctaaat	5220
25	ttgatgcctg gcagttccct actctcgcat ggggagaccc cactactacca tcggcgctac	5280
	ggcgtttcac ttctgagttc ggcattgggt cagggtgggac caccgcgcta cggccgccag	5340
	gcaaattctg ttttatcaga ccgcttctgc gttctgattt aatctgtatc aggctgaaaa	5400
30	tccttctctca tccggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgccaa	5460
	gctcgagctc gaattcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg	5520
	ttacccaact taatcgctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag	5580
35	aggcccgcac cgatcgccct tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgctga	5640
	tgcggtattt tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcatatgg tgcaactctca	5700
	gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgcgca acaccgcgtg	5760
40	acgaattc	5768
45		

ES 2 663 445 T3

5	<210> 18	
	<211> 1053	
	<212> ADN	
	<213> Región codificante del gen aroG de tipo salvaje;	
	<400> 18	
10	atgaattatc agaacgacga tttacgcatac aaagaaatca aagagttact tcctcctgtc	60
	gcattgctgg aaaaattccc cgctactgaa aatgccgcga atacggttgc ccatgcccga	120
	aaagcgatcc ataagatcct gaaaggtaat gatgatcgcc tgttggttgt gattggccca	180
	tgctcaattc atgatcctgt cggggcaaaa gagtatgcca ctcgcttgct ggcgctgcgt	240
	gaagagctga aagatgagct ggaaatcgta atgcgcgtct attttgaaaa gccgcgtacc	300
	acggtgggct ggaaagggt gattaacgat ccgcataatg ataataagctt ccagatcaac	360
	gacggtctgc gtatagcccg taaattgctg cttgatatta acgacagcgg tctgccagcg	420
	gcaggtgagt ttctcgatat gatcacccca caatatctcg ctgacctgat gagctggggc	480
	gcaattggcg cacgtaccac cgaatcgag gtgcaccgcg aactggcatc agggctttct	540
	tgtccggtcg gcttcaaaaa tggcaccgac ggtacgatta aagtggctat cgatgccatt	600
	aatgccgccg gtgcgcgcga ctgcttcctg tccgtaacga aatgggggca ttcggcgatt	660
	gtgaatacca gcggtaacgg cgattgccat atcattctgc gcggcggtaa agagcctaac	720
	tacagcgcca agcacgttgc tgaagtgaag gaagggtga acaaagcagg cctgccagca	780
	caggtgatga tcgatttcag ccatgctaac tcgtccaaac aattcaaaaa gcagatggat	840
	gtttgtgctg acgtttgcca gcagattgcc ggtggcgaaa aggccattat tggcgtgatg	900
	gtggaagacc atctggtgga aggcaatcag agcctcgaga gcggggagcc gctggcctac	960
	ggtaagagca tcaccgatgc ctgcatcggc tgggaagata ccgatgctct gttacgtcaa	1020
	ctggcgaatg cagtaaaagc gcgtcgcggg taa	1053
15	<210> 19	
	<211> 8820	
	<212> ADN	
	<213> Plásmido pMH28F;	
	<220>	
20	<221> rasgo_misc	
	<222> (5894)..(5894)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 19	

ES 2 663 445 T3

gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc	60
agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag	120
gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcga taaaacgcc	180
tgagaagccc gtgacgggct tttcttgat tatgggtagt ttccttgcat gaatccataa	240
aaggcgctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg	300
aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggc ggagacaaa ggaatattca	360
gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt agggttttta ggtctgtttt	420
gtagaggagc aaacagcggt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta	480
gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc	540
tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta	600
cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaggc ctacgagaat ttacagatac	660
ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata	720

ES 2 663 445 T3

gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttggt ttcaaagcaa	780
atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct	840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt	900
tcacttataa ccaatacgtc cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat	960
tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cttttggtta	1020
aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaaagt ctcaagcgaa aaattagaat	1080
tagtttttag tgaagagata ttgccttata ttttccagtt aaaaaaattc ataaaaata	1140
atctggaaca tgtaagtct tttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat	1260
ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg	1320
ttttgaaacc aataagtaaa gattttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata	1380
agcgaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagttga actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttctaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt tttgaggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttogttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaacia acaaaagtag acaactggt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acacctaata gaacaggtga aaccagtaaa acaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcgatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgcctcccgt ggggaaaaaa	2100
tcattggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct agggccccca	2280
attaattagt aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc	2340
cctgctcgcg caggctgggt gccaaagctct cgggtaacat caaggcccga tccttgagac	2400
ccttgccctc ccgcacgatg atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg acccgcagtt	2460
gcaaacccctc actgatccgc atgcccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgccttcag aaaaccgagg atgcgaacca cttcatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580

ES 2 663 445 T3

gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctcct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct 2640
 tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc 2700
 gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgcccaag gttgccgggt 2760
 gacgcacacc gtggaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcgggtc 2820
 gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct cacgcaactg gtccagaacc ttgaccgaac 2880
 gcagcggtag taacggcgca gtggcggtt tcatggcttg ttatgactgt ttttttggg 2940
 tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgccgtgggt cgatgtttga 3000
 tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca 3060
 tcatgagga agcgtgatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgta 3120
 tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg 3180
 gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctggttac ggtgaccgta aggettgatg 3240
 aaacaacggc gcgagctttg atcaacgacc ttttgaaac ttcggttcc cctggagaga 3300
 gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttgttggtca cgacgacatc attccgtggc 3360
 gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgtag 3420
 gtatcttoga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag 3480
 aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaaact ctttgatccg gttcctgaac 3540
 aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg 3600
 ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg 3660
 gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgctg ccggcccagt 3720
 atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg 3780
 cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg 3840
 tagtcggcaa ataatgtcta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggtta 3900
 actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc 3960
 tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg 4020
 aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta 4080
 aaatctagcg agggctttac taagctgatc cgggtgatga ccttttgaat gacctttaat 4140
 agattatatt actaattaat tggggaccct agaggtcccc ttttttattt taaaaatttt 4200
 ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 4260
 tttcccgact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat 4320
 taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagt 4380
 tacctagaga gggtgagaat tgccgaacat gcgcataagt tccccgaca gatttcaggt 4440
 ggtcagcagc aacgcgttgc cattgcgcgt tcgctgtgta tgaagccgaa aattatgttg 4500

ES 2 663 445 T3

tttgatgagc caacgtcggc gctcgatcct gagatggtga aagaggtgct ggatacgatg	4560
attgggctgg cgcagtcggg tatgacaatg ttgtgtgtaa cacatgagat ggggtttgca	4620
cgaaccgtcg ctgaccgggt aatttttatg gatcgtgggg aaatagtga gcaagctgca	4680
cctgatgaat tttttgcgca tcctaaatca gagcgtacga gggcatTTTT atcgcaggta	4740
atccattaat tgaatgttag ttcgaaaagc aaaaaggcca tcctttcgga tggcctttcg	4800
cttgatttga tgtctggcag tttatggcgg gcgtcctgcc cgccaccctc cgggccgttg	4860
cttcgcaacg ttcaaaccg gtgacggaag atcacttcgc agaataaata aatcctggtg	4920
tccctgttga tacogggaag ccctgggcca acttttggcg aaaatgagac gttgatcggc	4980
acgtaagagg ttccaacttt caccataatg aaataagatc actaccgggc gtattttttg	5040
agttatcgag attttcagga gctaaggaag ctaaaatgga gaaaaaatc actggatata	5100
ccaccgttga tatatcccaa tggcatcgta aagaacattt tgaggcattt cagtcagttg	5160
ctcaatgtac ctataaccag accgttcagc tggatattac ggccttttta aagaccgtaa	5220
agaaaaataa gcacaagttt tatccggcct ttattcacat tcttgccgc ctgatgaatg	5280
ctcatccgga attccgtatg gcaatgaaag acggtgagct ggtgatatgg gatagtgttc	5340
acccttgtta caccgttttc catgagcaaa ctgaaacgtt ttcatcgctc tggagtgaat	5400
accacgacga tttccggcag tttctacaca tatattcgca agatgtggcg tgttacggtg	5460
aaaacctggc ctatttccct aaagggttta ttgagaatat gtttttcgct tcagccaatc	5520
cctgggtgag tttcaccagt tttgatttaa acgtggccaa tatggacaac ttcttcgccc	5580
ccgttttcac catgggcaaa tattatacgc aaggcgacaa ggtgctgatg ccgctggcga	5640
ttcaggttca tcatgccgtt tgtgatggct tccatgtcgg cagaatgctt aatgaattac	5700
aacagtactg cgatgagtgg cagggcgggg cgtaattttt ttaaggcagt tattggtgcc	5760
cttaaacgcc tggtgctacg cctgaataag tgataataag cggatgaatg gcagaaattc	5820
gaaagcaaat tcgaccgggt cgtcgggttca gggcagggtc gttaaatagc cgcttatgtc	5880
tattgctggt ttantcggtc cccggggatc gcggccgcgg accgcatccc atcacatata	5940
cctgccgttc actattatTT agtgaaatga gatattatga tattttctga attgtgatta	6000
aaaaggcaac tttatgccca tgcaacagaa actataaaaa atacagagaa tgaaaagaaa	6060
cagatagatt ttttagttct ttaggcccgT agtctgcaaa tccttttatg attttctatc	6120
aaacaaaaga ggaaaataga ccagttgcaa tccaaacgag agtctaatag aatgaggtcg	6180
aaaagtaaat cgcgcgggtt tgttactgat aaagcaggca agacctaaaa tgtgtaaagg	6240
gcaaagtgtg tactttggcg tcacccctta catatttttag gtcttttttt attgtgcgta	6300
actaacttgc catcttcaaa caggagggct ggaagaagca gaccgctaac acagtacata	6360

ES 2 663 445 T3

aaaaaggaga catgaacgat gaacatcaaa aagtttgcaa aacaagcaac agtattaacc	6420
tttactaccg cactgctggc aggaggcgca actcaagcgt ttgcgaaaga aacgaaccaa	6480
aagccatata aggaaacata cggcatttcc catattacac gccatgatat gctgcaaadc	6540
cctgaacagc aaaaaaatga aaaatatcaa gttcctgaat tcgattcgtc cacaattaaa	6600
aatatctctt ctgcaaaagg cctggacgtt tgggacagct ggccattaca aaacgctgac	6660
ggcactgtcg caaactatca cggctaccac atcgtctttg cattagccgg agatcctaaa	6720
aatgctggatg acacatcgat ttacatgttc tatcaaaaag tcggcgaaac ttctattgac	6780
agctggaaaa acgctggccg cgtctttaaa gacagcgaca aattcgatgc aaatgattct	6840
atcctaaaag accaaacaca agaatgggtca ggttcagcca catttacatc tgacggaaaa	6900
atccgtttat tctacactga tttctccggt aaacattacg gcaaacaac actgacaact	6960
gcacaagtta acgtatcagc atcagacagc tctttgaaca tcaacggtgt agaggattat	7020
aaatcaatct ttgacggtga cggaaaaacg tatcaaaatg tacagcagtt catcgatgaa	7080
ggcaactaca gctcaggcga caaccatacg ctgagagatc ctactacgt agaagataaa	7140
ggccacaaat acttagtatt tgaagcaaac actggaactg aagatggcta ccaaggcgaa	7200
gaatctttat ttaacaaagc atactatggc aaaagcacat cattcttccg tcaagaaagt	7260
caaaaacttc tgcaaaagca taaaaaacgc acggctgagt tagcaaacgg cgctctcggt	7320
atgattgagc taaacgatga ttacacactg aaaaaagtga tgaaaccgct gattgcatct	7380
aacacagtaa cagatgaaat tgaacgcgcg aacgtcttta aaatgaacgg caaatggtac	7440
ctgttcactg actcccggg atcaaaaatg acgattgacg gcattacgtc taacgatatt	7500
tacatgcttg gttatgtttc taattcttta actggcccat acaagccgct gaacaaaact	7560
ggccttgtgt taaaaatgga tcttgatcct aacgatgtaa cctttactta ctcacacttc	7620
gctgtacctc aagcgaaagg aaacaatgtc gtgattacaa gctatatgac aaacagagga	7680
ttctacgcag acaacaatc aacgtttgcg ccgagcttcc tgctgaacat caaaggcaag	7740
aaaacatctg ttgtcaaaga cagcatcctt gaacaaggac aattaacagt taacaaataa	7800
aaacgcaaaa gaaaatgcc atatcctatt ggcattttct tttatttctt ccatttaa	7860
ggatgcatgc gctagcggag tgtatactgg ctactatgt tggcactgat gaggggtgtca	7920
gtgaagtgtc tcctcccggc ggatttgtcc tactcgggag agtggttcacc gacaacaac	7980
agataaaaca aaaggcccag tcttccgact gagccttttg ttttatttga tgtctggcag	8040
ttccctactc tcgcatggg agacccaca ctaccatcg cgctacggcg gtttcacttc	8100
tgagttcggc atggggtcag gtgggaccac cgcgctactg ccgccagaca aattcttttc	8160
taatctgccg aactttaacc taaaaagtgg tgctgatacc cagagtcgaa ctggggacct	8220
cacccttacc aagggtgcgc tctaccaact gagccatctc agcacgctaa atttgatgcc	8280

ES 2 663 445 T3

tggcagttcc	ctactctcgc	atggggagac	cccacactac	catcggcgct	acggcgtttc	8340
acttctgagt	tcggcatggg	gtcagggtggg	accaccgcgc	tacggccgcc	aggcaaattc	8400
tgttttatca	gaccgcttct	gcgttctgat	ttaatctgta	tcaggctgaa	aatcttctct	8460
catccggata	acaatttcac	acaggaaaca	gctatgacca	tgattacgcc	aagctcgagc	8520
tcgaattcac	tggccgtcgt	tttacaacgt	cgtgactggg	aaaaccctgg	cgttacccaa	8580
cttaatcgcc	ttgcagcaca	tcccccttct	gccagctggc	gtaatagcga	agaggcccgcc	8640
accgatcgcc	cttcccaaca	gttgcgcagc	ctgaatggcg	aatggcgccct	gatgcggtat	8700
tttctcctta	cgcactctgtg	cggtatttca	caccgcatac	ggtgcactct	cagtacaatc	8760
tgctctgatg	ccgcatagtt	aagccagccc	cgacacccgc	caacacccgc	tgacgaattc	8820

5 <210> 20
 <211> 4774
 <212> ADN
 <213> Plásmido pCL1921;

10	<400> 20	
	gttgacagta	agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60
	agtctgaatg	acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag 120
	gaactgctga	acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcgca taaaacgccc 180
	tgagaagccc	gtgacgggct tttcttctgtat tatgggtagt ttccttgcac gaatccataa 240
	aaggcgccctg	tagtgccatt taccctccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
	aatgtcacga	aaaagacagc gactcaggtg cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca 360
	gcgatttgcc	cgagcttgccg aggggtgctac ttaagccttt aggggttttaa ggtctgtttt 420
	gtagaggagc	aaacagcggtt tgcgacatcc ttttctaata ctgcggaact gactaaagta 480
	gtgagttata	cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc 540
	tataaattat	aaccacttga atataaacaa aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta 600
	cagaggggtct	agcagaattt acaagttttc cagcaaaggc ctagcagaat ttacagatac 660
	ccacaactca	aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattgggtata 720
	gtgattaaaa	tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttggt ttcaaagcaa 780
	atgaactagc	gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
	gtgtggcact	actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
	tcacttataa	ccaatacgcg cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatgggtgat 960
	tagctaaagc	aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttgggtta 1020
	aaggctttga	gattttccag tggacaaact atgccaaagt ctcaagcgaa aaattagaat 1080
	tagtttttag	tgaagagata ttgccttatc ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata 1140

ES 2 663 445 T3

atctggaaca	tgttaagtct	tttgaaaaca	aatactctat	gaggatttat	gagtggttat	1200
taaaagaact	aacacaaaag	aaaactcaca	aggcaaatat	agagattagc	cttgatgaat	1260
ttaagttcat	gttaatgctt	gaaaataact	accatgagtt	taaaaggctt	aaccaatggg	1320
ttttgaaacc	aataagtaaa	gatttaaaca	cttacagcaa	tatgaaattg	gtggttgata	1380
agcgaggccg	cccgactgat	acgttgattt	tccaagttga	actagataga	caaatggatc	1440
tcgtaaccga	acttgagaac	aaccagataa	aatgaatgg	tgacaaaata	ccaacaacca	1500
ttacatcaga	ttcctacctt	cgtaacggac	taagaaaaac	actacacgat	gctttaactg	1560
caaaaattca	gctcaccagt	tttgaggcaa	aatttttgag	tgacatgcaa	agtaagcatg	1620
atctcaatgg	ttcgttctca	tggctcacgc	aaaaacaacg	aaccacacta	gagaacatac	1680
tggctaataa	cggaaggatc	tgaggttctt	atggctcttg	tatctatcag	tgaagcatca	1740
agactaacia	acaaaagtag	aacaactggt	caccgttaga	tatcaaaggg	aaaactgtcc	1800
atatgcacag	atgaaaacgg	tgtaaaaaag	atagatacat	cagagctttt	acgagttttt	1860
ggtgcattta	aagctgttca	ccatgaacag	atcgacaatg	taacagatga	acagcatgta	1920
acacctaata	gaacaggtga	aaccagtaaa	acaaagcaac	tagaacatga	aattgaacac	1980
ctgagacaac	ttgttacagc	tcaacagtca	cacatagaca	gcctgaaaca	ggcgatgctg	2040
cttatcgaat	caaagctgcc	gacaacacgg	gagccagtga	cgcctcccg	ggggaaaaaa	2100
tcattggcaat	tctggaagaa	atagcgcttt	cagccggcaa	acctgaagcc	ggatctgcga	2160
ttctgataac	aaactagcaa	caccagaaca	gcccgtttgc	gggcagcaaa	accogttatg	2220
cttgtaaacc	gttttgtgaa	aaaattttta	aaataaaaaa	ggggacctct	aggggtcccca	2280
attaattagt	aataataatct	attaaaggct	attcaaaagg	tcattccaccg	gatcaattcc	2340
cctgctcgcg	caggctgggt	gccaaagctct	cgggtaacat	caaggcccga	tccttgagac	2400
ccttgccctc	ccgcacgatg	atcgtgccgt	gatcgaaatc	cagatccttg	accgcgagtt	2460
gcaaaccctc	actgatccgc	atgcccgttc	catacagaag	ctgggcgaac	aaacgatgct	2520
cgccttccag	aaaaccgagg	atgcgaacca	cttcatccgg	ggtcagcacc	accggcaagc	2580
gccgcgacgg	ccgaggtctt	ccgatctcct	gaagccaggg	cagatccgtg	cacagcacct	2640
tgccgtagaa	gaacagcaag	gccgccaatg	cctgacgatg	cgtggagacc	gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc	cagccaggac	agaaatgcct	cgacttcgct	gctgcccaag	gttgccgggt	2760
gacgcacacc	gtggaaaacg	atgaaggcac	gaaccagtg	gacataagcc	tgttcggttc	2820
gtaagctgta	atgcaagtag	cgtatgcgct	cacgcaactg	gtccagaacc	ttgaccgaac	2880
gcagcgggtg	taacggcgca	gtggcggttt	tcattggcttg	ttatgactgt	ttttttgggg	2940
tacagtctat	gcctcgggca	tccaagcagc	aagcgcgtta	cgcctgggtg	cgatgtttga	3000

ES 2 663 445 T3

tggttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgagggga agcgggtgatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgtca	3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctggttac ggtgaccgta aggcttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttggaac ttcggcttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttgttggtgca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgtag	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgctg ccggcccagt	3720
atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcg agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgcta acaattcggt caagccgacg ccgcttcgag gcgcggctta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgacg cgggtggatga ccttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggtcccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccagct ggaaagcggg cagtgcgcg aacgcgaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttggtgtg aattgtgagc	4380
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct tgcatgcctg	4440
caggtcgact ctagaggatc cccgggtacc gagctcgaat tctactggccg tcgttttaca	4500
acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggttac ccaacttaat cgccttgtag cacatcccc	4560
tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg	4620
cagcctgaat ggcgaatggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcacg tgtgcggtat	4680
ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca	4740
gccccgacac ccgccaacac ccgctgacga attc	4774

ES 2 663 445 T3

5 <210> 21
 <211> 6432
 <212> ADN
 <213> Plásmido pMG27;

 10 <400> 21
 gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60
 agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag 120
 gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcga taaaacgccc 180
 tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttccttgcat gaatccataa 240
 aaggcgcctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
 aatgtcacga aaaagacagc gactcagggtg cctgatgggc ggagacaaaa ggaatattca 360
 gcgatattgcc cgagcttgccg aggggtgctac ttaagccttt agggttttta ggtctgtttt 420
 gtagaggagc aaacagcggt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta 480
 gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc 540
 tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta 600
 cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaggc ctagcagaat ttacagatac 660
 ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattgggtata 720
 gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttggt ttcaaagcaa 780
 atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
 gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
 tcacttataa ccaatacgtc cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatgggtgat 960
 tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttgggta 1020
 aaggctttga gatthttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat 1080
 tagtttttag tgaagagata ttgccttacc ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata 1140
 atctggaaca tgtaagtct tttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtgggtat 1200
 taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat 1260
 ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg 1320
 ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata 1380
 agcgaggccg cccgactgat acgttgatth tccaagttga actagataga caaatggatc 1440
 tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca 1500
 ttacatcaga ttctaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg 1560
 caaaaattca gctcaccagt tttgaggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg 1620
 atctcaatgg ttggttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac 1680
 tggctaaata cggaaggatc tgagggtctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca 1740
 agactaacia acaaaagtag aacaactggt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc 1800
 ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtccgcgat ttggtacagc gcagtaaccg 3660

ES 2 663 445 T3

gcaaaatcgc	gccgaaggat	gtcgcctgccg	actgggcaat	ggagcgcctg	ccggcccagt	3720
atcagcccgt	catacttgaa	gctagacagg	cttatcttgg	acaagaagaa	gatcgccttg	3780
cctcgcgcgc	agatcagttg	gaagaatttg	tccactacgt	gaaaggcgag	atcaccaagg	3840
tagtcggcaa	ataatgtcta	acaattcggt	caagccgacg	ccgcttcgcg	gcgcggctta	3900
actcaagcgt	tagatgcact	aagcacataa	ttgctcacag	ccaaactatc	aggtcaagtc	3960
tgcttttatt	atttttaagc	gtgcataata	agccctacac	aaattgggag	atatatcatg	4020
aaaggctggc	tttttcttgt	tatcgcaata	gttggcgaag	taatcgcaac	atccgcatta	4080
aaatctagcg	agggttttac	taagctgata	cggtggatga	ccttttgaat	gacctttaat	4140
agattatatt	actaattaat	tggggaccct	agaggtcccc	ttttttattt	taaaaatttt	4200
ttcacaaaac	ggtttacaag	catacgttgg	ccgattcatt	aatgcagctg	gcacgacagg	4260
tttcccgact	ggaaagcggg	cagtgcgcgc	aacgcaatta	atgtgagtta	gctcactcat	4320
taggcacccc	aggctttaca	ctttatgctt	ccggctcgta	tgttgtgtgg	aattgtgagc	4380
ggataacaat	ttcacacagg	aaacagctat	gaccatgatt	acgccaagct	tgcatgcctg	4440
caggctgacc	gttaaatcta	tcaccgcaag	ggataaatat	ctaacaccgt	gcgtgttgac	4500
tattttacct	ctggcgggtg	taatggttgc	atgtactaat	ctagataagg	aatatagcca	4560
tgaccgcacc	gattcaggat	ctgcgtgatg	caattgccct	gctgcaacag	catgataatc	4620
agtatctgga	aaccgatcat	ccggttgatc	cgaatgcaga	actggcaggc	gtttatcgtc	4680
atattggtgc	cggtggcacc	gttaaacgtc	cgaccctgat	tgggtccggca	atgatgttta	4740
ataacattaa	aggttatccg	cacagccgta	ttctggttgg	tatgcatgca	agccgtcagc	4800
gtgcagcact	gctgctgggt	tgtgaagcaa	gtcagctggc	actggaagtt	ggtaaagcag	4860
ttaaaaaacc	ggttgcaccg	gtggttggtc	cggaagcag	cgcaccgtgt	caagagcaga	4920
tttttctggc	agatgatccg	gattttgatc	tgcgtaccct	gctgcctgca	cataccaata	4980
ccccgattga	tgacaggtccg	tttttttgtc	tgggtctggc	cctggcaagc	gatccggtgg	5040
atgcaagcct	gaccgatgtt	accattcatc	gtctgtgtgt	tcagggtcgt	gatgaactga	5100
gcatgttcct	ggcagcagg	cgccatattg	aagtttttgc	tcagaaagca	gaagcagcag	5160
gtaaaccgct	gccgattacc	attaatatgg	gtctggaccc	agcaatctat	attggcgcac	5220
gttttgaaag	accgaccacc	ccgtttggtt	ataatgaact	gggtgttgcc	ggtgcactgc	5280
gtcagcgtcc	ggttgaactg	gttcagggtg	ttagcgttcc	ggaaaaagca	attgcacgtg	5340
ccgaaattgt	tattgaaggt	gaactgctgc	ctggtgttcg	tggttcgtgaa	gatcagcata	5400
ccaattcagg	tcatgcaatg	ccggaatttc	cggtttattg	tggtggtgca	aatccgagcc	5460
tgccggttat	taaagttaaa	gccgttacca	tgcgcaataa	cgcaattctg	caaaccctgg	5520
ttggtccggg	tgaagaacat	accaccctgg	caggctctgcc	gaccgaagca	agcatttgga	5580

ES 2 663 445 T3

atgcagttga agcagcaatt ccgggttttc tgcaaatgt ttatgcccac accgcaggcg	5640
gtggtaaat tctgggtatt ctgcaagtga aaaaacgtca gcctgccgat gaaggtcgtc	5700
agggtcaggc agccctgctg gcgctggcaa cctatagcga actgaaaaat atcattctgg	5760
tggatgagga tgtggacatt tttgatagt atgatattct gtgggcaatg accacccgta	5820
tgcagggtga tgtagcatt accaccattc cgggtattcg cggtcacag ctggaccgca	5880
gccagacacc ggaatattca ccgagcattc gtggtaatgg tattagctgc aaaaccatct	5940
ttgattgtac cgttcogtgg gcaactgaaa gccattttga acgtgcaccg tttgcagatg	6000
ttgatccgcg tccgtttgca cctgaatatt ttgcacgtct ggaaaaaat cagggcagcg	6060
caaaataagc taataacagg cctgctggta atcgcaggaa tttttatttg gatggatccc	6120
cgggtaccga gctcgaattc actggccgtc gttttacaac gtctgactg ggaaaacct	6180
ggcgttaccc aacttaatcg ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc	6240
gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcg	6300
ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgat atggtgcaat	6360
ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc ccgacaccc gccaacaccc	6420
gctgacgaat tc	6432

<210> 22
 <211> 7294
 <212> ADN
 <213> Plásmido pMG31;

<400> 22

gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc	60
agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag	120
gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcca taaaacgccc	180
tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttccttgcat gaatccataa	240
aaggcgcttg tagtgccatt taccctcatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg	300
aatgtcacga aaaagacagc gactcagggt cctgatgggc ggagacaaa ggaatattca	360
gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgtac ttaagccttt agggttttta ggtctgtttt	420
gtagaggagc aaacagcggt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta	480
gtgagttata cacagggtcg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc	540
tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta	600
cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaggc ctacagaaat ttacagatag	660
ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata	720
gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa	780

ES 2 663 445 T3

atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct	840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt	900
tcacttataa ccaatacgc cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat	960
tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta	1020
aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaaagt ctcaagcgaa aaattagaat	1080
tagtttttag tgaagagata ttgccttata ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata	1140
atctggaaca tgtaagtct tttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat	1260
ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg	1320
ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata	1380
agcggaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagttga actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttccctaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt tttgaggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttcgttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaacia acaaaagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acacctataa gaacaggatga aaccagtaaa acaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcgatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgcctccgt ggggaaaaaa	2100
tcattgcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct aggggtccca	2280
attaattagt aatataatct attaaagtc attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc	2340
cctgctcgcg caggctgggt gccaaactct cgggtaacat caaggcccg tccctggagc	2400
ccttgccctc ccgcacgatg atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg acccgcatgt	2460
gcaaaccctc actgatccgc atgcccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgccttccag aaaaccgagg atgcgaacca cttcatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctcct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640

ES 2 663 445 T3

tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgcccag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaaacgg atgaaggcac gaacccagtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct cacgcaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtag taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttgggg	2940
tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgccgtgggt cgatgtttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgagga agcggtagc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgta	3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctgggttac ggtgaccgta aggcttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttggaaac ttcggcttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttgttgtgca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcctgcag	3420
gtatcttoga gccagccagc atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgcccttgta ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg ccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgctg ccggcccagt	3720
atcagccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttg acaagaagaa gatcgcttg	3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgtcta acaattcggt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggtta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aatctagcg agggctttac taagctgac cggtggatga ctttttgaat gaccttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggtcccc ttttttattt taaaaattt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgact ggaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc	4380
ggataacaat ttcacacagc aaacagctat gaccatgatt acgccaagct tgctattgac	4440
gacagctatg gttcactgtc caccaaccaa aactgtgtc agtaccgcca atatttctcc	4500
cttgaggggt acaagaggt gtccctagaa gagatccacg ctgtgtaaaa attttacaaa	4560

ES 2 663 445 T3

aaggattga ctttccctac aggggtgtgta ataatttaaat tacaggcggg ggcaaccccg	4620
cctgttctgc agaggaggaa tatagccatg gaagtgaaaa tcttcaacac ccaggatgtt	4680
caggattttc tgcgtgttgc aagcgggtctg gaacaagagg gtggtaatcc gcgtgttaaa	4740
caaattattc atcgtgttct gagcgacctg tataaagcaa ttgaagatct gaatatcacc	4800
agcgacgaat attgggcagg cgttgcatat ctgaatcagc tgggtgcaaa tcaagaagca	4860
ggctctgctga gtccgggtct ggggtttgat cattatctgg atatgcgtat ggatgcagaa	4920
gatgcagcac tgggtattga aaatgcaaca ccgcgtacca ttgaagggtcc gctgtatgtt	4980
gcgggtgcac cggaagcgt tggttatgca cgcgtgatg atggtagcga tccgaatggt	5040
cataccctga ttctgcatgg caccattttt gatgcagatg gtaaacccgt gccgaatgca	5100
aaagtgtgaa tttggcatgc aaacacccaaa ggcttttata gccattttga tccgaccggt	5160
gaacagcagg cctttaatat gcgtcgtagc attattaccg atgagaatgg tcagtatcgt	5220
gttcgtacca ttctgcctgc cggttatggg tgtcctccgg aaggtccgac ccagcaactg	5280
ctgaaccaac tgggtcgtca tggtaatcgt ccggcacata ttcattatth tgttagcgca	5340
gatggtcacc gtaaacctgac caccagatt aatgttgccg gtgatccgta tacctatgat	5400
gattttgcat atgccacccg tgaaggctctg gttgttgatg cagttgaaca taccgatccg	5460
gaagcaatta aagccaatga tgtggaaggc ccttttgccg aaatgggtgtt tgatctgaaa	5520
ctgaccgcgtc tgggtgatgg tgttgataat cagggtgtgg atcgtccgcg tctggcagtt	5580
taatacacca aaatgggtca aaattatcag gcgagtgatc atgatcactg gcctgttttt	5640
atttcagggg aggggtggaga caattacgtg gataatcaga tcatccaaga aaccgtggat	5700
aaaattctga gcgttctgcc gaatcaggca ggtcagctgg cacgtctggt gcgtctgatg	5760
caatttgcat gcgatccgac cattaccgtt attggcaaat ataaccatgg taaaagccgt	5820
ctgctgaatg aactgattgg caccgatatc tttagcgttg cagataaacg tgaaaccatt	5880
cagctggccg aacataaaca ggatcagggt cggtggctgg atgcacctgg tctggatgcc	5940
gatgttcgag cagttgatga tcgtcatgca tttgaagcag tttggacca ggcagatatt	6000
cgtctgtttg ttcatagcgt tcgtgaaggc gaactggatg caaccgaaca ccatctgctg	6060
caacagctga ttgaagatgc cgatcatagc cgtcgtcaga ccattctggt tctgaccag	6120
attgatcaga ttccggatca gaccatcctg acacagatta aaaccagcat tgcacagcag	6180
gttccgaaac tggatatttg ggcagttagc gcaacccgtc atcgtcaggg cattgaaaac	6240
ggtaaaaccc tgctgatcga aaaaagcggc attggtgcac tgcgccatac cctggaacag	6300
gcactggcac aggtgccgag cgcacgtacc tatgaaaaaa atcgtctgct gtcagatctg	6360
caccatcagc tgaaacaact gctgctggat cagaaacatg ttctgcaaca actgcaacag	6420

ES 2 663 445 T3

	acacagcaac agcagctgca tgatTTTgat accggtctga ttaacattct ggacaaaatt	6480
5	cgtgttgatc tggaaaccgat tgtgaatatt gatggtcagg atcaagcact gaatccggat	6540
	agctttgcaa ccatgtttaa aaacaccgca gcaaaacagc agcgtgccaa agttcagatt	6600
	gcatatagcc gtgcatgcat tgaaatcaac agccatctga ttgccatgg tgttggtggt	6660
10	ctgcctgcgg aacagcagac caccattaaa agcattgata ccgtgattgt tgccgtgttt	6720
	ggatcagcg ttaaatttcg tgatcagctg cgtgccctgt tttataccga taccgaacgt	6780
	cagcgtctgc aacgtgaatt tcgtttctat tttgaaaaa gtgccggtcg catgattctg	6840
15	gcagcaaaaa ttgaacagac catgcgtcag cagggtgta ttcagaatgc catgatggca	6900
	ctgcaacaaa tggaaagcgc agcataaaaa caggagcgc gcaaacggcg tccgaatttc	6960
20	ttggtcgact ctagaggatc cccgggtacc gagctogaat tcaactggccg tcgttttaca	7020
	acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggtac ccaacttaat cgccttgag cacaaccccc	7080
	tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgccttccc aacagttgcg	7140
25	cagcctgaat ggcgaatggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac tgtgcggtat	7200
	ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgat agttaagcca	7260
	gccccgacac ccgccaacac ccgctgacga attc	7294
30	<210> 23 <211> 8952 <212> ADN <213> Plásmido pMG33;	
35	<400> 23	
	gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc	60
	agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag	120
	gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcga taaaacgccc	180
	tgagaagccc gtgacgggct tttcttgat tatgggtagt ttccttgcat gaatccataa	240
	aaggcgctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg	300
	aatgtcacga aaaagacagc gactcagtg cctgatggc ggagacaaaa ggaatattca	360
	gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt agggttttta ggtctgtttt	420
	gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta	480
	gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc	540
	tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta	600
	cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaggc ctacgagaat ttacagatac	660
	ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata	720
		780

40

ES 2 663 445 T3

atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct	840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt	900
tcacttataa ccaatacgct cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat	960
tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta	1020
aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaaagt ctcaagcgaa aaattagaat	1080
tagtttttag tgaagagata ttgccttata ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata	1140
atctggaaca tgtaagtct tttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggc aaatat agagattagc cttgatgaat	1260
ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg	1320
ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata	1380
agcgaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagttga actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aaatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttcctaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt tttgaggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttcgttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaacia aaaaagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acacctaata gaacaggtga aaccagtaaa acaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcgatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgcctcccg ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct aggggtcccca	2280
attaattagt aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc	2340
cctgctcgcg caggctgggt gccaaagctct cgggtaacat caaggccga tccttgagac	2400
ccttgccctc ccgcacgatg atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg acccgagtt	2460
gcaaaccctc actgatccgc atgcccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgccttccag aaaaccgagg atgcgaacca cttcatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctcct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700

ES 2 663 445 T3

gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgcccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct cagcgaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtag taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttggg	2940
tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgcctgggt cgatgtttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgagga agcggtagc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgtca	3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg cgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctggttac ggtgaccgta aggcttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttggaac ttcggcttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttgttggtca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgacg	3420
gtatcttoga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtta ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtccgcgat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgcctg ccggcccagt	3720
atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataatgtcta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggctta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aatctagcg agggctttac taagctgacg cgggtgatga ccttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggtcccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttggtgagc aattgtgagc	4380
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct tgctattgac	4440
gacagctatg gttcactgtc caccaaccaa aactgtgctc agtaccgcca atatttctcc	4500
cttgaggggt acaagaggt gtccctagaa gagatccacg ctgtgtaaaa attttacaaa	4560

ES 2 663 445 T3

aaggtattga	ctttccctac	aggggtgtgta	ataattttaat	tacaggcggg	ggcaaccccg	4620
cctgttctgc	agaggaggaa	tatagccatg	gaagtgaaaa	tcttcaacac	ccaggatgtt	4680
caggattttc	tgcgtgttgc	aagcggctctg	gaacaagagg	gtggtaatcc	gcgtgttaaa	4740
caaattattc	atcgtgttct	gagcgacctg	tataaagcaa	ttgaagatct	gaatatcacc	4800
agcgacgaat	attgggcagg	cgttgcatat	ctgaatcagc	tgggtgcaa	tcaagaagca	4860
ggtctgctga	gtccgggtct	gggttttgat	cattatctgg	atatgcgtat	ggatgcagaa	4920
gatgcagcac	tggttattga	aaatgcaaca	ccgcgtacca	ttgaaggtcc	gctgtatgtt	4980
gcgggtgcac	cggaaagcgt	tggttatgca	cgcattgatg	atggtagcga	tccgaatggt	5040
cataccctga	ttctgcatgg	caccattttt	gatgcagatg	gtaaaccgct	gccgaatgca	5100
aaagttgaaa	tttgcatgac	aaacacaaaa	ggcttttata	gccattttga	tccgaccggt	5160
gaacagcagg	cctttaatat	gcgtcgtagc	attattaccg	atgagaatgg	tcagtatcgt	5220
gttcgtacca	ttctgcctgc	cggttatggt	tgtcctccgg	aaggcccgac	ccagcaactg	5280
ctgaaccaac	tggttcgtca	tggtaatcgt	ccggcacata	ttcattatct	tgttagcgca	5340
gatggtcacc	gtaaactgac	caccagatt	aatggtgccg	gtgatccgta	tacctatgat	5400
gattttgcat	atgccacccg	tgaaggtctg	gttggtgatg	cagttgaaca	taccgatccg	5460
gaagcaatta	aagccaatga	tgtggaaggt	ccttttgccg	aaatggtgtt	tgatctgaaa	5520
ctgacccgtc	tggttgatgg	tgttgataat	caggttggtg	atcgtcccg	tctggcagtt	5580
taatacacca	aaatggttca	aaattatcag	gcgagtgatc	atgatcactg	gcctgttttt	5640
atttcaggga	aggggtggaga	caattacgtg	gataatcaga	tcaccaaga	aaccgtggat	5700
aaaattctga	gcgttctgcc	gaatcaggca	ggtcagctgg	cacgtctggt	gcgtctgatg	5760
caatttgcat	gcgatccgac	cattaccgtt	attggcaaat	ataaccatgg	taaaagccgt	5820
ctgctgaatg	aactgattgg	caccgatatc	tttagcgttg	cagataaacg	tgaaccatt	5880
cagctggccg	aacataaaca	ggatcagggt	cgttggtctg	atgcacctgg	tctggatgcc	5940
gatgttgcat	cagttgatga	tcgtcatgca	tttgaagcag	tttggaacca	ggcagatatt	6000
cgtctgtttg	ttcatagcgt	tcgtgaaggt	gaactggatg	caaccgaaca	ccatctgctg	6060
caacagctga	ttgaagatgc	cgatcatagc	cgctcgtcaga	ccattctggt	tctgaccag	6120
attgatcaga	ttccggatca	gaccatcctg	acacagatta	aaaccagcat	tgcacagcag	6180
gttccgaaac	tggtatattg	ggcagttagc	gcaaccgctc	atcgtcaggg	cattgaaaac	6240
ggtaaaaccc	tgctgatcga	aaaaagcggg	attggtgcac	tgcgccatac	cctggaacag	6300
gcactggcac	aggtgccgag	cgcacgtacc	tatgaaaaaa	atcgtctgct	gtcagatctg	6360
caccatcagc	tgaacaact	gctgctggat	cagaaacatg	ttctgcaaca	actgcaacag	6420
acacagcaac	agcagctgca	tgattttgat	accggtctga	ttaacattct	ggacaaaatt	6480

ES 2 663 445 T3

cgtgttgatc tggaaccgat tgtgaatatt gatggtcagg atcaagcact gaatccggat 6540
 agctttgcaa ccatgtttaa aaacaccgca gcaaaacagc agcgtgccaa agttcagatt 6600
 gcatatagcc gtgcatgcat tgaaatcaac agccatctga ttccgcatgg tgttggtggt 6660
 ctgcctgcgg aacagcagac caccattaaa agcattgata ccgtgattgt tgccgtgttt 6720
 ggtatcagcg ttaaatttcg tgatcagctg cgtgccctgt tttataccga taccgaacgt 6780
 cagcgtctgc aacgtgaatt tcgtttctat tttgaaaaa gtgccggtcg catgattctg 6840
 gcagcaaaaa ttgaacagac catgcgtcag cagggctgta ttcagaatgc catgatggca 6900
 ctgcaacaaa tggaaagcgc agcataaaaa cacggacgcc gcaaacggcg tccgaatttc 6960
 ttggtcgacc gttaaacta tcaccgcaag ggataaatat ctaacaccgt gcgtgttgac 7020
 tattttacct ctggcgggtga taatgggtgc atgtactaat ctagataagg aatatagcca 7080
 tgaccgcacc gattcaggat ctgcgtgatg caattgccct gctgcaacag catgataatc 7140
 agtatctgga aaccgatcat ccggttgatc cgaatgcaga actggcaggc gtttatcgtc 7200
 atattggtgc cgggtgcacc gttaaacgtc cgaccctgat tgggtccggca atgatgttta 7260
 ataacattaa aggttatccg cacagccgta ttctggttgg tatgcatgca agccgtcagc 7320
 gtgcagcact gctgctgggt tgtgaagcaa gtcagctggc actggaagtt ggtaaagcag 7380
 ttaaaaaacc ggttgaccg gtggtgttc cggcaagcag cgcaccgtgt caagagcaga 7440
 tttttctggc agatgatccg gattttgatc tgcgtaccct gctgcctgca cataccaata 7500
 ccccgattga tgcaggtccg tttttttgtc tgggtctggc cctggcaagc gatccggtgg 7560
 atgcaagcct gaccgatgtt accattcatc gtctgtgtgt tcagggctcg gatgaactga 7620
 gcatgttcct ggcagcaggc cgccatattg aagtttttcg tcagaaagca gaagcagcag 7680
 gtaaaccgct gccgattacc attaatatgg gtctggaccc agcaatctat attggcgcac 7740
 gttttgaagc accgaccacc ccgtttggtt ataatgaact ggggtgttgc ggtgcactgc 7800
 gtcagcgtcc ggttgaactg gttcaggggtg ttagcgttcc ggaaaaagca attgcacgtg 7860
 ccgaaattgt tattgaaggt gaactgctgc ctggtgttcg tgttcgtgaa gatcagcata 7920
 ccaattcagg tcatgcaatg ccggaatttc cgggttattg tgggtgtgca aatccgagcc 7980
 tgccggttat taaagttaa gccgttacca tgcgcaataa cgcaattctg caaacctgg 8040
 ttggtccggg tgaagaacat accaccctgg caggtctgcc gaccgaagca agcatttgga 8100
 atgcagttga agcagcaatt ccgggttttc tgcaaaatgt ttatgcccac accgcaggcg 8160
 gtggtaaatt tctgggtatt ctgcaagtga aaaaacgtca gcctgccgat gaaggctcgtc 8220
 agggtcaggc agccctgctg gcgctggcaa cctatagcga actgaaaaat atcattctgg 8280
 tggatgagga tgtggacatt tttgatagt atgatattct gtgggcaatg accaccgta 8340

ES 2 663 445 T3

tgcagggtga	tgtagcatt	accaccattc	cgggtattcg	cggtcacag	ctggacccga	8400
gccagacacc	ggaatattca	ccgagcattc	gtggtaatgg	tattagctgc	aaaaccatct	8460
ttgattgtac	cgttcogtgg	gcactgaaaa	gccattttga	acgtgcaccg	tttgacagatg	8520
ttgatccgcg	tccgttttga	cctgaatatt	ttgcacgtct	ggaaaaaat	cagggcagcg	8580
caaaataagc	taataacagg	cctgctggta	atcgacaggaa	tttttatttg	gatggatccc	8640
cgggtaccga	gctcgaattc	actggccgtc	gttttacaac	gtcgtgactg	ggaaaacccct	8700
ggcgttacc	aacttaatcg	ccttgacgca	catccccctt	tcgccagctg	gcgtaatagc	8760
gaagaggccc	gcaccgatcg	cccttcccaa	cagttgcgca	gcctgaatgg	cgaatggcgc	8820
ctgatgcggt	atcttctcct	tacgcacgtg	tgcggtatct	cacaccgcat	atggtgcaact	8880
ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccgacaccc	gccaacaccc	8940
gctgacgaat	tc					8952

<210> 24
 <211> 10630
 <212> ADN
 <213> Plásmido pMG37;

<400> 24

gttgacagta	agacgggtaa	gcctgttgat	gataccgctg	ccttactggg	tgcatatagcc	60
agtctgaatg	acctgtcacg	ggataatccg	aagtggtcag	actggaaaat	cagagggcag	120
gaactgctga	acagcaaaaa	gtcagatagc	accacatagc	agacccgcca	taaaacgccc	180
tgagaagccc	gtgacgggct	tttcttgtat	tatgggtagt	ttccttgcat	gaatccataa	240
aaggcgctg	tagtgccatt	taccccccatt	cactgccaga	gccgtgagcg	cagcgaactg	300
aatgtcacga	aaaagacagc	gactcaggtg	cctgatggtc	ggagacaaaa	ggaatattca	360
gcgatttgcc	cgagcttgcg	agggtgctac	ttaagccttt	agggttttaa	ggtctgtttt	420
gtagaggagc	aaacagcggt	tgcgacatcc	ttttgtaata	ctgcggaact	gactaaagta	480
gtgagttata	cacagggctg	ggatctattc	tttttatctt	tttttattct	ttctttattc	540
tataaattat	aaccacttga	atataaaca	aaaaaacaca	caaaggctca	gcggaattta	600
cagagggctc	agcagaattt	acaagttttc	cagcaaagg	ctagcagaat	ttacagatac	660
ccacaactca	aaggaaaagg	actagtaatt	atcattgact	agcccatctc	aattggtata	720
gtgattaaaa	tcacctagac	caattgagat	gtatgtctga	attagttgtt	ttcaaagcaa	780
atgaactagc	gattagtcgc	tatgacttaa	cggagcatga	aaccaagcta	attttatgct	840
gtgtggcact	actcaacccc	acgattgaaa	accctacaag	gaaagaacgg	acggtatcgt	900
tcacttataa	ccaatacgct	cagatgatga	acatcagtag	ggaaaatgct	tatggtgtat	960
tagctaaagc	aaccagagag	ctgatgacga	gaactgtgga	aatcaggaat	ccttttggtta	1020

ES 2 663 445 T3

aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaaagt ctcaagcgaa aaattagaat	1080
tagtttttag tgaagagata ttgccttatc ttttccagtt aaaaaaattc ataaaatata	1140
atctggaaca tgtaagtct tttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcacaatat agagattagc cttgatgaat	1260
ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg	1320
ttttgaaacc aataagtaaa gattttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata	1380
agcgaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagtga actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttcctaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt tttgaggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttcgttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaaca acaaaagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acacctaata gaacagggtga aaccagtaaa acaaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcgatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgcctcccggt ggggaaaaaa	2100
tcattggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct aggggtcccca	2280
attaattagt aatataatct attaaaggct attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc	2340
cctgctcgcg caggctgggt gccaaagctct cgggtaacat caaggcccg tcccttgagc	2400
ccttgccctc ccgcacgatg atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg acccgcatgt	2460
gcaaaccttc actgatccgc atgcccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgccttcag aaaaccgagg atgcgaacca cttcatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctcct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgcttgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct cacgcaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcgggtg taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttgggg	2940

ES 2 663 445 T3

tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgccgtgggt cgatgtttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatagagga agcgggtgatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgtca	3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgcttg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgcttggttac ggtgaccgta aggcttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttggaac ttcggttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttggtgtgca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgacg	3420
gtatcttoga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtta ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgcctg ccggcccagt	3720
atcagcccgat cataacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgtcta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggctta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgatc cgggtgatga ccttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agagggtccc ttttttattt taaaaattt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgcact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tggtgtgtgg aattgtgagc	4380
ggataacaat ttcacacagc aaacagctat gaccatgatt acgccaaagt tgctattgac	4440
gacagctatg gttcactgtc caccaaccaa aactgtgctc agtaccgcca atatttctcc	4500
cttgagggggt acaaagaggt gtccctagaa gagatccacg ctgtgtaaaa attttcaaaa	4560
aaggatttga ctttccctac aggggtgtgta ataatttaac tacaggcggg ggcaaccccg	4620
cctgttctgc agaggaggaa tatagccatg gaagtgaaaa tcttcaacac ccaggatgtt	4680
caggattttc tgcgtgttgc aagcgtgtctg gaacaagagg gtggtaatcc gcgtgttaaa	4740
caaattattc atcgtgttct gagcgacctg tataaagcaa ttgaagatct gaatatcacc	4800

ES 2 663 445 T3

agcgacgaat attgggcagg cgttgcatat ctgaatcagc tgggtgcaaa tcaagaagca	4860
ggtctgctga gtccgggtct gggttttgat cattatctgg atatgctgat ggatgcagaa	4920
gatgcagcac tgggtattga aaatgcaaca ccgcgtacca ttgaagggtcc gctgtatgtt	4980
gcgggtgcac cggaaagcgt tggttatgca cgcattggatg atggtagcga tccgaatggt	5040
cataccctga ttctgcatgg caccattttt gatgcagatg gtaaaccgct gccgaatgca	5100
aaagttgaaa tttggcatgc aaacaccaaa ggcttttata gccattttga tccgaccggt	5160
gaacagcagg cctttaatat gcgtcgtagc attattaccg atgagaatgg tcagtatcgt	5220
gttcgtacca ttctgcctgc cggttatggt tgtcctccgg aagggtccgac ccagcaactg	5280
ctgaaccaac tgggtcgtca tggtaatcgt ccggcacata ttcattatth tgttagcgca	5340
gatggtcacc gtaaaactgac caccagatt aatggtgccg gtgatccgta tacctatgat	5400
gattttgcat atgccaccgg tgaaggtctg gttggtgatg cagttgaaca taccgatccg	5460
gaagcaatta aagccaatga tgtggaaggc ctttttgccg aaatggtgtt tgatctgaaa	5520
ctgacccgtc tgggtgatgg tgttgataat caggttggtg atcgtccgag tctggcagtt	5580
taatacacca aaatggttca aaattatcag gcgagtgatc atgatcactg gcctgttttt	5640
atttcaggga aggggtggaga caattacgtg gataatcaga tcatccaaga aaccgtggat	5700
aaaattctga gcgttctgcc gaatcaggca ggtcagctgg cacgtctggt gcgtctgatg	5760
caatttgcat gcgatccgac cattaccgtt attggcaaat ataaccatgg taaaagccgt	5820
ctgctgaatg aactgattgg caccgatatc tttagcgttg cagataaacg tgaaccatt	5880
cagctggccc aacataaaca ggatcagggt cgttggtggt atgcacctgg tctggatgcc	5940
gatgttgcat cagttgatga tcgtcatgca tttgaagcag tttggacca gccagatatt	6000
cgtctgtttt ttcatagcgt tcgtgaaggc gaactggatg caaccgaaca ccatctgctg	6060
caacagctga ttgaagatgc cgatcatagc cgtcgtcaga ccattctggt tctgaccag	6120
attgatcaga ttccggatca gaccatcctg acacagatta aaaccagcat tgcacagcag	6180
gttccgaaac tggatatttg ggcagttagc gcaaccgctc atcgtcaggg cattgaaaac	6240
ggtaaaaccc tgctgatcga aaaaagcggc attggtgcac tgcgccatac cctggaacag	6300
gcactggcac aggtgccgag cgcacgtacc tatgaaaaaa atcgtctgct gtcagatctg	6360
caccatcagc tgaacaact gctgctggat cagaaacatg ttctgcaaca actgcaacag	6420
acacagcaac agcagctgca tgattttgat accggtctga ttaacattct ggacaaaatt	6480
cgtgttgatc tggaaacgat tgtgaatatt gatggtcagg atcaagcact gaatccggat	6540
agctttgcaa ccatgtttta aaacaccgca gcaaaacagc agcgtgccaa agttcagatt	6600
gcataatagc gtgcatgcat tgaaatcaac agccatctga ttcgccatgg tgttggtggt	6660
ctgcctgcgg aacagcagac caccattaaa agcattgata ccgtgattgt tgcctgttt	6720

ES 2 663 445 T3

ggatcagcg ttaaatttcg tgatcagctg cgtgccctgt tttataccga taccgaacgt	6780
cagcgtctgc aacgtgaatt tcgtttctat tttgaaaaaa gtgccggctg catgattctg	6840
gcagcaaaaa ttgaacagac catgcgtcag cagggctgta ttcagaatgc catgatggca	6900
ctgcaacaaa tggaaagcgc agcataaaaa cacggacgcc gcaaacggcg tccgaatttc	6960
ttggtcgacc gttaaactta tcaccgcaag ggataaatat ctaacaccgt gcgtgttgac	7020
tattttacct ctggcggtga taatggttgc atgtactaat ctagataagg aatatagcca	7080
tgaccgcacc gattcaggat ctgcgtgatg caattgccct gctgcaacag catgataatc	7140
agtatctgga aacogatcat ccggttgatc cgaatgcaga actggcaggc gtttatcgtc	7200
atattggtgc cggcggcacc gttaaaccgtc cgaccctgat tggccggca atgatgttta	7260
ataacattaa aggttatccg cacagccgta ttctggttgg tatgcatgca agccgtcagc	7320
gtgcagcact gctgctgggt tgtgaagcaa gtcagctggc actggaagtt ggtaaagcag	7380
ttaaaaaacc ggttgccacc gtggttgttc cggcaagcag cgcaccgtgt caagagcaga	7440
tttttctggc agatgatccg gattttgatc tgcgtaccct gctgcctgca cataccaata	7500
ccccgattga tgcaggtccg tttttttgtc tgggtctggc cctggcaagc gatccggtgg	7560
atgcaagcct gaccgatgtt accattcatc gtctgtgtgt tcagggtcgt gatgaactga	7620
gcatgttcct ggcagcaggt cgccatattg aagtttttcg tcagaaagca gaagcagcag	7680
gtaaaccgct gccgattacc attaatatgg gtctggaccc agcaatctat attggcgcac	7740
gttttgaagc accgaccacc ccgtttggtt ataatgaact ggggtgtgcc ggtgcactgc	7800
gtcagcgtcc ggttgaactg gttcaggggt ttagcgttcc ggaaaaagca attgcacgtg	7860
ccgaaattgt tattgaaggt gaactgctgc ctggtgttcg tgttcgtgaa gatcagcata	7920
ccaattcagg tcatgcaatg ccggaatttc cgggttattg tgggtgtgca aatccgagcc	7980
tgccggttat taaagttaaa gccgttacca tgcgcaataa cgcaattctg caaacctgg	8040
ttggtccggg tgaagaacat accaccctgg caggtctgcc gaccgaagca agcatttgga	8100
atgcagttga agcagcaatt ccgggttttc tgcaaaatgt ttatgcccat accgcaggcg	8160
gtggtaaatt tctgggtatt ctgcaagtga aaaaacgtca gcctgccgat gaaggtcgtc	8220
agggtcaggc agccctgctg gcgctggcaa cctatagcga actgaaaaat atcattctgg	8280
tggatgagga tgtggacatt tttgatagt atgatattct gtgggcaatg accaccgta	8340
tgcaggtgta tgtagcatt accaccattc cgggtattcg cggtcatcag ctggaccgga	8400
gccagacacc ggaatattca ccgagcattc gtggtaatgg tattagctgc aaaaccatct	8460
ttgattgtac cgttccgtgg gactgaaaa gccattttga acgtgcaccg tttgcagatg	8520
ttgatccgcg tccgtttgca cctgaatatt ttgcacgtct ggaaaaaat cagggcagcg	8580

ES 2 663 445 T3

caaaaataagc taataacagg cctgctggta atcgcaggaa tttttatctg gatggatccg	8640
cctacctagc ttccaagaaa gatatcctaa cagcacaaga gcggaaagat gttttgttct	8700
acatccagaa caacctctgc taaaattcct gaaaaatttt gcaaaaagtt gttgacttta	8760
tctacaaggt gtggtataat aatcttaaca acagcaggac gctcccgggt tgaggaaaac	8820
ctaatgaaac tgaccagcct gcgtgttagc ctgctggcac tgggtctggt taccagcgggt	8880
tttgcagcag cagaaaccta taccgttgat cgttatcagg atgatagcga aaaaggtagc	8940
ctgcgttggg caattgaaca gagcaatgca aatagcgac aagaaaacca gattctgatt	9000
caggcagttg gttaaagcacc gtatgttatc aaagttgata aaccgctgcc tccgattaaa	9060
agcagcggtt aaatcattgg caccgagtggt gataaaaccg gtgaatttat tgcaattgat	9120
ggcagcaact atatcaaagg cgaaggtgaa aaagcatgtc cgggtgcaaa tccgggtcag	9180
tatggcacca atgttcgtac catgaccctg cctggtctgg ttctgcaaga tgtaattggt	9240
gttaccctga aaggctctga tgttcacgtt ttttgtattg gtgttctggt taatcgagc	9300
agcaataacc tgattcagca taatcgtatc agcaacaatt atgggtggtg cggtgttatg	9360
attaccggtg atgatggtaa aggtaatccg accagcacca ccaccaataa taacaaagtt	9420
ctggataacg tgttcacgca taatggtgat ggtctggaac tgaccctggg tgcagcattt	9480
aatctgattg caaataacct gtttaccagc aaaaagcca atccggaacc gagccagggt	9540
attgaaattc tgtggggtaa tgataatgcc gtggtgggta acaaattcga aaactattca	9600
gatggcctgc aaatcaattg gggtaaacgt aactatatcg cctataacga actgaccaat	9660
aacagcctgg gtttcaatct gacaggtgat ggtaacattt tcgacagcaa taaagtgc	9720
ggtaaccgta ttggtattgc cattcgtagt gaaaagatg ccaatgcagc tattaccctg	9780
acaaaaatc agatttgga taacggcaaa gatatcaaac gttgtgaagc cgggtgtagc	9840
tgtgttccga atcagcgtct ggggtcaatt gtttttgggt ttccggcact ggaacatgaa	9900
ggttttgttg gtagccgtgg cgggtggtgtt gttattgaac cggcaaaact gcaaaaaacc	9960
tgcaccagc cgaaccagca gaattgtaat gcaattccta atcagggtat tcaggcaccg	10020
aaactgacag ttagcaaaaa acagctgacc gttgaagtta aaggcaccct taatcagcgt	10080
tataatgttg aatTTTTTg caatcgtaat gccagcagca gcgaagcaga acagtatctg	10140
ggtagcattg ttgttggtac cgatcatcag ggtctggcaa aagcaaattg ggctccgaaa	10200
gtagcatgc cgagcggtac cgcaaatgtg acagatcatc tgggtgcgac cagcgaactg	10260
agcagcgagc ttaaaatgcg ttaaatgcgt gcgcgcgcgc ttgcgcgcgc gctttttttt	10320
ggtagcagc tcgaattcac tggccgtcgt ttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg	10380
cgtagcccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga	10440
agaggccgc accgatcgcc cttccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgct	10500

ES 2 663 445 T3

	gatgcggtat tttctcctta cgcactctgtg cggatatttca caccgcatat ggtgcactct	10560
	cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc	10620
	tgacgaattc	10630
5	<210> 25 <211> 6452 <212> ADN <213> Plásmido pMG39;	
10	<400> 25	
	gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc	60
	agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag	120
	gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agacccgccca taaaacgccc	180
	tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttccttgcat gaatccataa	240
	aaggcgcctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg	300
	aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca	360
	gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt aggggtttta ggtctgtttt	420
	gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta	480
	gtgagttata cacagggtcg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc	540
	tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggtcta gcggaattta	600
	cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaggt ctagcagaat ttacagatac	660
	ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata	720
	gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa	780
	atgaactagc gatttagtgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct	840
	gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt	900
	tcacttataa ccaatacgtc cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat	960
	tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta	1020
	aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat	1080
	tagtttttag tgaagagata ttgccttatt ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata	1140
	atctggaaca tgttaagtct tttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat	1200
	taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat	1260
	ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg	1320
	ttttgaaacc aataagtaaa gattttaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata	1380
	agcgaggccg cccgactgat acgttgatct tccaagttga actagataga caaatggatc	1440
	tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500

ES 2 663 445 T3

ttacatcaga	ttcctaccta	cgtaacggac	taagaaaaac	actacacgat	gctttaactg	1560
caaaaattca	gctcaccagt	tttgaggcaa	aatTTTTTgag	tgacatgcaa	agtaagcatg	1620
atctcaatgg	ttcgtttctca	tggtctcacgc	aaaaacaacg	aaccacacta	gagaacatac	1680
tggctaaata	cggaaggatc	tgaggttctt	atggctcttg	tatctatcag	tgaagcatca	1740
agactaacia	acaaaagtag	aacaactgtt	caccgttaga	tatcaaaggg	aaaactgtcc	1800
atatgcacag	atgaaaacgg	tgtaaaaaag	atagatacat	cagagctttt	acgagttttt	1860
gggtgattta	aagctgttca	ccatgaacag	atcgacaatg	taacagatga	acagcatgta	1920
acacctaata	gaacaggtga	aaccagtaaa	acaagcaac	tagaacatga	aattgaacac	1980
ctgagacaa	ttgttacagc	tcaacagtca	cacatagaca	gcctgaaaca	ggcgatgctg	2040
cttatcgaat	caaagctgcc	gacaacacgg	gagccagtga	cgcctcccg	ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat	tctggaagaa	atagcgcttt	cagccggcaa	acctgaagcc	ggatctgcga	2160
ttctgataac	aaactagcaa	caccagaaca	gcccgtttgc	gggcagcaaa	acccgttatg	2220
cttgtaaaac	gttttgtgaa	aaaattttta	aaataaaaaa	ggggacctct	aggggtcccca	2280
attaattagt	aatataatct	attaaaggct	attcaaaagg	tcatccaccg	gatcaattcc	2340
cctgctcgcg	caggctgggt	gccaaagctct	cgggtaacat	caaggcccg	tccttgaggc	2400
ccttgccctc	ccgcacgatg	atcgtgccgt	gatcgaaatc	cagatccttg	acccgcagtt	2460
gcaaaccctc	actgatccgc	atgcccgttc	catacagaag	ctgggcgaac	aaacgatgct	2520
cgccttccag	aaaaccgagg	atgcgaacca	cttcatccgg	ggtcagcacc	accggcaagc	2580
gccgcgacgg	ccgaggtctt	ccgatctcct	gaagccaggg	cagatccgtg	cacagcacct	2640
tgccgtagaa	gaacagcaag	gccgccaatg	cctgacgatg	cgtggagacc	gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc	cagccaggac	agaaatgcct	cgacttcgct	gctgccaag	gttgccgggt	2760
gacgcacacc	gtggaaacgg	atgaaggcac	gaaccagtg	gacataagcc	tgttcggttc	2820
gtaagctgta	atgcaagtag	cgtatgcgct	cacgcaactg	gtccagaacc	ttgaccgaac	2880
gcagcggtgg	taacggcgca	gtggcggttt	tcatggcttg	ttatgactgt	ttttttgggg	2940
tacagtctat	gcctcgggca	tccaagcagc	aagcgcgtta	cgccgtgggt	cgatgtttga	3000
tgttatggag	cagcaacgat	gttacgcagc	agggcagtcg	ccctaaaaca	aagttaaaca	3060
tcatgaggg	agcggtgatc	gccgaagtat	cgactcaact	atcagaggta	gttggcgctca	3120
tcgagcgcca	tctcgaaccg	acgttgctgg	ccgtacattt	gtacggctcc	gcagtggatg	3180
gcggcctgaa	gccacacagt	gatattgatt	tgctgggttac	ggtagccgta	aggcttgatg	3240
aaacaacggc	gcgagctttg	atcaacgacc	ttttgaaac	ttcggcttcc	cctggagaga	3300
gcgagattct	ccgcgctgta	gaagtcacca	ttgttggtgca	cgacgacatc	attccgtggc	3360

ES 2 663 445 T3

gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgcag	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcac ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgccctg ccggcccagt	3720
atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcg c agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataatgtcta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgag gcgcggctta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgatc cggtgatga ccttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agagggtccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc	4380
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct tgcatgcctg	4440
caggctgact ctagaggatc cgcctaccta gcttccaaga aagatatcct aacagcacia	4500
gagcggaaag atgttttgtt ctacatccag aacaacctct gctaaaattc ctgaaaaatt	4560
ttgcaaaaag ttgttgactt tatctacaag gtgtggtata ataactctaa caacagcagg	4620
acgctcccgg gttgagggaa acctaataaa actgaccagc ctgcgtgtta gcctgctggc	4680
actgggtctg gttaccagcg gttttgcagc agcagaaacc tataccgttg atcggtatca	4740
ggatgatagc gaaaaaggta gcctgcgttg ggcaattgaa cagagcaatg caaatagcgc	4800
acaagaaaac cagattctga ttcaggcagt tggtaaagca ccgtatgtta tcaaagttga	4860
taaaccgctg cctccgatta aaagcagcgt taaaatcatt ggcaccgagt gggataaaac	4920
cgggtgaattt attgcaattg atggcagcaa ctatatcaaa ggcgagggtg aaaaagcatg	4980
tccgggtgca aatccgggtc agtatggcac caatgttcgt accatgacct tgcctggtct	5040
ggttctgcaa gatgttaatg gtgttaccct gaaaggctct gatgttcacg gtttttgtat	5100
tgggtgtctg gttaatcgca gcagcaataa cctgattcag cataatcgta tcagcaacaa	5160
ttatgggtgt gccggtgtta tgattaccgg tgatgatggg aaaggtaatc cgaccagcac	5220
caccaccaat aataacaaag ttctggataa cgtgttcacg gataatgggt atggtctgga	5280

ES 2 663 445 T3

	actgaccgct ggtgcagcat ttaatctgat tgcaaataac ctgtttacca gcacaaaagc	5340
	caatccggaa ccgagccagg gtattgaaat tctgtggggt aatgataatg ccgtggtggg	5400
5	taacaaattc gaaaactatt cagatggcct gcaaatcaat tggggtaaac gtaactatat	5460
	cgcctataac gaactgacca ataacagcct gggtttcaat ctgacagggtg atggtaacat	5520
10	tttcgacagc aataaagtgc atggttaaccg tatttgtatt gccattcgta gtgaaaaaga	5580
	tgccaatgca cgtattaccc tgacaaaaaa tcagatttgg gataacggca aagatatcaa	5640
	acgttgtgaa gccgggtggt gctgtgttcc gaatcagcgt ctgggtgcaa ttgtttttgg	5700
15	tggtccggca ctggaacatg aaggttttgt tggtagccgt gccgggtggtg ttgttattga	5760
	accggcaaaa ctgcaaaaaa cctgcaccca gccgaaccag cagaattgta atgcaattcc	5820
	taatcagggt attcaggcac cgaaactgac agttagcaaa aaacagctga ccgttgaagt	5880
20	taaaggcacc cctaatacagc gttataatgt ggaatttttt ggcaatcgta atgccagcag	5940
	cagcgaagca gaacagtatc tgggtagcat tgttgttgtt accgatcatc agggctctggc	6000
	aaaagcaaat tgggctccga aagttagcat gccgagcgtt accgcaaattg tgacagatca	6060
25	tctgggtgcg accagcgaac tgagcagcgc agttaaaatg cgttaaattgc atgcgcgccg	6120
	cgttcgcgcg gcgctttttt ttggtaccga gctcgaattc actggccgtc gttttacaac	6180
30	gtcgtgactg ggaaaaccct gccgttacct aacttaatcg ccttgacgca catccccctt	6240
	tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca	6300
	gcctgaatgg cgaatggcgc ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt	6360
35	cacaccgcat atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc	6420
	cccgcacccc gccaacacccc gctgacgaat tc	6452
40	<210> 26 <211> 10012 <212> ADN <213> Plásmido pMG47F;	
	<400> 26	
	gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc	60
	agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag	120
	gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcga taaaacgccc	180
	tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttcccttgcgtaaatccataa	240
	aaggcgcttg tagtgccatt taccctcatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg	300
	aatgtcacga aaaagacagc gactcagggt cctgatgggc ggagacaaaa ggaatattca	360
	gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt agggttttta ggtctgtttt	420
45	gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta	480

ES 2 663 445 T3

gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc	540
tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggtcta gcggaattta	600
cagagggctc agcagaattht acaagttttc cagcaaaggt ctagcagaat ttacagatac	660
ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata	720
gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagtgttt ttcaaagcaa	780
atgaactagc gattagtctc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct	840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt	900
tcacttataa ccaatacgtc cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat	960
tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta	1020
aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaaagt ctcaagcgaa aaattagaat	1080
tagtttttag tgaagagata ttgccttata ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata	1140
atctggaaca tgttaagtct ttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat	1260
ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg	1320
ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaaa cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata	1380
agcgaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagttga actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttctaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt tttgaggcaa aattttttgag tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttctgttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaaca acaaaagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acacctata gaacaggtga aaccagtaaa acaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcgatgctg	2040
cttatogaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgcctcccggt ggggaaaaaa	2100
tcattggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct aggggtcccca	2280
attaattagt aatataatct attaaaggct attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc	2340

ES 2 663 445 T3

cctgctcgcg caggctgggt gccaaagctct cgggtaacat caaggcccgga tccttgagac	2400
ccttgccctc ccgcacgatg atcgtgcgt gatcgaaatc cagatccttg acccgagtt	2460
gcaaaccctc actgatccgc atgcccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgccttcag aaaaccgagg atgcgaacca ctcatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggctct ccgatctcct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgcccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgt cacgcaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtag taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttggg	2940
tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgccgtgggt cgatgtttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgagga agcggtagc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgta	3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctggttac ggtgaccgta aggetttagt	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttgaaac ttcggttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgctgta gaagtacca ttgttggtgca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgag	3420
gtatcttoga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgctg ccggcccagt	3720
atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataatgtcta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcggcgctta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggctggc ttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgac cggtggatga ctttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggtcccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260

ES 2 663 445 T3

tttcccgact	ggaaagcggg	cagtgagcgc	aacgcaatta	atgtgagtta	gctcactcat	4320
taggcacccc	aggctttaca	ctttatgctt	ccggctcgta	tgttggtggg	aattgtgagc	4380
ggataacaat	ttcacacagg	aaacagctat	gaccatgatt	acgccaagct	tgctattgac	4440
gacagctatg	gttcaactgc	caccaaccaa	aactgtgctc	agtaccgcca	atatttctcc	4500
cttgaggggt	acaaagaggt	gtccctagaa	gagatccacg	ctgtgtaaaa	attttacaaa	4560
aaggtattga	ctttccctac	agggtgtgta	ataatttaat	tacaggcggg	ggcaaccccg	4620
cctgttctgc	agaggaggaa	tatagccatg	gaagtgaaaa	tcttcaacac	ccaggatggt	4680
caggattttc	tgctgtgtgc	aagcgggtctg	gaacaagagg	gtggtaatcc	gcgtgttaaa	4740
caaattattc	atcgtgttct	gagcgacctg	tataaagcaa	ttgaagatct	gaatatcacc	4800
agcgacgaat	attgggcagg	cggtgcatac	ctgaatcagc	tgggtgcaaa	tcaagaagca	4860
ggtctgctga	gtccgggtct	gggttttgat	cattatctgg	atatgcgtat	ggatgcagaa	4920
gatgcagcac	tgggtattga	aaatgcaaca	ccgcgtacca	ttgaagggtcc	gctgtatggt	4980
gcgggtgcac	cggaaagcgt	tggttatgca	cgcatggatg	atggtagcga	tccgaatggt	5040
cataccctga	ttctgcatgg	caccattttt	gatgcagatg	gtaaaccgct	gccgaatgca	5100
aaagttgaaa	tttggcatgc	aaacacccaa	ggcttttata	gccattttga	tccgaccggt	5160
gaacagcagg	cctttaatat	gcgtcgtagc	attattaccg	atgagaatgg	tcagtatcgt	5220
gttcgtacca	ttctgcctgc	cggttatggt	tgtcctccgg	aagggtccgac	ccagcaactg	5280
ctgaaccaac	tgggtcgtca	tggtaatcgt	ccggcacata	ttcattatct	tgttagcgca	5340
gatggtcacc	gtaaactgac	caccagatt	aatgttgccg	gtgatccgta	tacctatgat	5400
gattttgcat	atgccacccg	tgaaggctctg	gttggtgatg	cagttgaaca	taccgatccg	5460
gaagcaatta	aagccaatga	tgtggaaggt	ccttttgccg	aaatggtggt	tgatctgaaa	5520
ctgaccgctc	tggttgatgg	tgttgataat	cagggtgtgg	atcgtccgcg	tctggcagtt	5580
taatacacca	aaatggttca	aaattatcag	gcgagtgatc	atgatcactg	gcctgttttt	5640
atttcaggga	agggtggaga	caattacgtg	gataatcaga	tcatccaaga	aaccgtggat	5700
aaaattctga	gcgttctgcc	gaatcaggca	ggtcagctgg	cacgtctggt	gcgtctgatg	5760
caatttgcat	gcgatccgac	cattaccggt	attggcaaat	ataaccatgg	taaaagccgt	5820
ctgctgaatg	aactgattgg	caccgatatc	tttagcgttg	cagataaacg	tgaaccatt	5880
cagctggccg	aacataaaca	ggatcaggtt	cgttggtggt	atgcacctgg	tctggatgcc	5940
gatgttgacg	cagttgatga	tcgtcatgca	tttgaagcag	tttggacca	ggcagatatt	6000
cgtctgtttg	ttcatagcgt	tcgtgaaggt	gaactggatg	caaccgaaca	ccatctgctg	6060
caacagctga	ttgaagatgc	cgatcatagc	cgctcgtcaga	ccattctggt	tctgaccag	6120

ES 2 663 445 T3

attgatcaga ttccggatca gaccatcctg acacagatta aaaccagcat tgcacagcag	6180
gttccgaaac tggatatttg ggcagttagc gcaacccgtc atcgtcaggg cattgaaaac	6240
ggtaaaaccc tgctgatcga aaaaagcggg attggtgcac tgcgccatac cctggaacag	6300
gcactggcac aggtgccgag cgcacgtacc tatgaaaaaa atcgtctgct gtcagatctg	6360
caccatcagc tgaaacaact gctgctggat cagaaacatg ttctgcaaca actgcaacag	6420
acacagcaac agcagctgca tgattttgat accggtctga ttaacattct ggacaaaatt	6480
cgtgttgatc tggaaccgat tgtgaatatt gatggtcagg atcaagcact gaatccggat	6540
agctttgcaa ccatgtttaa aaacaccgca gcaaacagc agcgtgccaa agttcagatt	6600
gcatatagcc gtgcatgcat tgaaatcaac agccatctga ttccgccatgg tgttgttggt	6660
ctgcctgcgg aacagcagac caccattaaa agcattgata ccgtgattgt tgccgtgttt	6720
ggatcagcg ttaaatttcg tgatcagctg cgtgccctgt ttataaccga taccgaacgt	6780
cagcgtctgc aacgtgaatt tcgtttctat tttgaaaaaa gtgccggtcg catgattctg	6840
gcagcaaaaa ttgaacagac catgcgtcag cagggtctga ttcagaatgc catgatggca	6900
ctgcaaaaaa tggaaagcgc agcataaaaa cacggacgcc gcaaacggcg tccgaatttc	6960
ttggtcgacc gttaaactta tcaccgcaag ggataaatat ctaacaccgt gcgtgttgac	7020
tattttacct ctggcgggtga taatggttgc atgtactaat ctagataagg aatatagcca	7080
tgaccgcacc gattcaggat ctgcgtgatg caattgccct gctgcaacag catgataatc	7140
agtatctgga aaccgatcat ccggttgatc cgaatgcaga actggcaggc gtttatcgtc	7200
atattgggtgc cgggtggcacc gttaaacgtc cgacccgtat tgggtccggca atgatgttta	7260
ataacattaa aggttatccg cacagccgta ttctggttgg tatgcatgca agccgtcagc	7320
gtgcagcact gctgctgggt tgtgaagcaa gtcagctggc actggaagt ggtaaagcag	7380
ttaaaaaacc gggtgcaccg gtggttggtc cggcaagcag cgcaccgtgt caagagcaga	7440
ttttcttggc agatgatccg gattttgatc tgcgtaccct gctgcctgca cataccaata	7500
ccccgattga tgcaggtccg tttttttgtc tgggtctggc cctggcaagc gatccggtgg	7560
atgcaagcct gaccgatgtt accattcatc gtctgtgtgt tcagggtcgt gatgaactga	7620
gcatgttcct ggcagcaggc cgccatattg aagtttttcg tcagaaagca gaagcagcag	7680
gtaaaccgct gccgattacc attaatatgg gtctggaccc agcaatctat attggcgcat	7740
gttttgaagc accgaccacc ccgtttggtt ataatgaact ggggtgttgcc ggtgcaactgc	7800
gtcagcgtcc gggtgaactg gttcagggtg ttagcgttcc ggaaaaagca attgcacgtg	7860
ccgaaattgt tattgaaggt gaactgctgc ctgggtgtcg tgttcgtgaa gatcagcata	7920
ccaattcagg tcatgcaatg ccggaatttc cgggttattg tgggtgtgca aatccgagcc	7980
tgcccggttat taaagttaa gccgttacca tgcgcaataa cgcaattctg caaacctgg	8040

ES 2 663 445 T3

ttggtccggg tgaagaacat accaccctgg caggtctgcc gaccgaagca agcatttgga	8100
atgcagttga agcagcaatt ccgggttttc tgcaaaatgt ttatgcccat accgcaggcg	8160
gtggtaaatt tctgggtatt ctgcaagtga aaaaacgtca gcctgccgat gaaggctcgtc	8220
agggtcaggc agccctgctg gcgctggcaa cctatagcga actgaaaaat atcattctgg	8280
tggatgagga tgtggacatt tttgatagtg atgatattct gtgggcaatg accaccgta	8340
tgcagggtga tgtagcatt accaccattc cgggtattcg cggtcacag ctggaccga	8400
gccagacacc ggaatattca ccgagcattc gtggtaatgg tattagctgc aaaaccatct	8460
ttgattgtac cgttccgtgg gcaactgaaa gccattttga acgtgcaccg tttgcagatg	8520
ttgatccgcg tccgtttgca cctgaatatt ttgcacgtct ggaaaaaat cagggcagcg	8580
caaaaataagc taataacagg cctgctggta atgcaggaa tttttatttg gatggatccg	8640
cctacctagc ttccaagaaa gatatcctaa cagcacaaga gcggaagat gttttgttct	8700
acatccagaa caacctctgc taaaattcct gaaaaatttt gcaaaaagtt gttgacttta	8760
tctacaaggt gtggtataat aatcttaaca acagcaggac gctcccgggt tgaggaaaac	8820
ctaataaat atagcctgtg caccattagc tttcgtcacc agctgattag ctttaccgat	8880
attgttcagt ttgcctatga aaacggcttt gaaggattg aactgtgggg caccatgca	8940
cagaatctgt atatgcaaga atatgaaacc accgaacgtg aactgaattg cctgaaagat	9000
aaaaccctgg aaattaccat gatcagcgat tatctggata ttagcctgag cgcagatttt	9060
gaaaaacca tcgaaaaatg tgaacagctg gcaattctgg ccaattggtt taaaacgaac	9120
aaaattcgta cctttgccgg tcagaaaggt agtcagatt ttagccagca agaacgtcaa	9180
gagtatgtga atcgtattcg catgatttgt gaactgtttg cccagcataa tatgtatgtt	9240
ctgctggaaa cccatccgaa taccctgacc gataccctgc cgagcaccct ggaactgctg	9300
ggtgaagtgt atcatccgaa tctgaaaatc aacctggatt ttctgcatat ctgggaaagc	9360
ggtgcagatc cggttgatag ctttcagcag ctgcgtccgt ggattcagca ttatcacttt	9420
aaaaacatta gcagcgcaga ctatctgcat gtgtttgaac cgaataatgt ttatgcagca	9480
gcaggtaatc gtaccggtat ggttccgctg tttgaaggca ttgttaacta tgatgaaatc	9540
atccaagaag tgcgcgatac cgatcatttt gcaagcctgg aatggtttgg tcataacgca	9600
aaagatatct tgaaagccga aatgaaagtg ctgaccaatc gtaatctgga agttgttacc	9660
agctaaatgc atgcgcgcgc cgttcgcgcg gcgctttttt ttggtaccga gctcgaattc	9720
actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacct aacttaatcg	9780
ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg	9840
cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc ctgatgcggt attttctcct	9900

ES 2 663 445 T3

	tacgcatctg tgcggtatctt cacaccgcat atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga	9960
	tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgaat tc	10012
5	<210> 27 <211> 10249 <212> ADN <213> Plásmido pMG70;	
10	<400> 27	
	gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc	60
	agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag	120
	gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agacccgcca taaaacgccc	180
	tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttccttgcat gaatccataa	240
	aaggcgctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg	300
	aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca	360
	gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt agggttttta ggtctgtttt	420
	gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta	480
	gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc	540
	tataaattat aaccacttga atataaacia aaaaaacaca caaaggctta gcggaattta	600
	cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaggc ctacagaaat ttacagatac	660
	ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattgggtata	720
	gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa	780
	atgaactagc gattagtgcg tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct	840
	gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt	900
	tcacttataa ccaatacgcg cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat	960
	tagctaaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta	1020
	aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat	1080
	tagtttttag tgaagagata ttgccttatt ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata	1140
	atctggaaca tgtaagtct tttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagggttat	1200
	taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat	1260
	ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg	1320
	ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata	1380
	agcgaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagttga actagataga caaatggatc	1440
	tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aaatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca	1500
	ttacatcaga ttcctaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560

ES 2 663 445 T3

caaaaattca	gctcaccagt	tttgaggcaa	aatTTTTgag	tgacatgcaa	agtaagcatg	1620
atctcaatgg	ttcgttctca	tggctcacgc	aaaaacaacg	aaccacacta	gagaacatac	1680
tggctaaata	cggaaggatc	tgaggttctt	atggctcttg	tatctatcag	tgaagcatca	1740
agactaacia	acaaaagtag	aacaactgtt	caccgttaga	tatcaaaggg	aaaactgtcc	1800
atatgcacag	atgaaaacgg	tgtaaaaaag	atagatacat	cagagctttt	acgagttttt	1860
ggtgcattta	aagctgttca	ccatgaacag	atcgacaatg	taacagatga	acagcatgta	1920
acacctaata	gaacaggtga	aaccagtaaa	acaaagcaac	tagaacatga	aattgaacac	1980
ctgagacaac	ttgttacagc	tcaacagtca	cacatagaca	gcctgaaaca	ggcgatgctg	2040
cttatcgaat	caaagctgcc	gacaacacgg	gagccagtga	cgcctcccg	ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat	tctggaagaa	atagcgcctt	cagccggcaa	acctgaagcc	ggatctgcga	2160
ttctgataac	aaactagcaa	caccagaaca	gcccgtttgc	gggcagcaaa	acccgttatg	2220
cttgtaaacc	gttttgtgaa	aaaattttta	aaataaaaaa	ggggacctct	agggtcccca	2280
attaattagt	aatataatct	attaaaggtc	attcaaaaag	tcatccaccg	gatcaattcc	2340
cctgctcgcg	caggctgggt	gccaaagctct	cgggtaacat	caaggcccca	tccttgagac	2400
ccttgccctc	ccgcacgatg	atcgtgccgt	gatcgaaatc	cagatccttg	acccgcagtt	2460
gcaaaccttc	actgatccgc	atgcccgttc	catacagaag	ctgggcgaac	aaacgatgct	2520
cgccttcag	aaaaccgagg	atgcgaacca	cttcatccgg	ggtcagcacc	accggcaagc	2580
gccgcgacgg	ccgaggtctt	ccgatctcct	gaagccaggg	cagatccgtg	cacagcacct	2640
tgccgtagaa	gaacagcaag	gccgccaatg	cctgacgatg	cgtggagacc	gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc	cagccaggac	agaaatgcct	cgacttcgct	gctgccaag	gttgccgggt	2760
gacgcacacc	gtggaacgg	atgaaggcac	gaaccagtg	gacataagcc	tgttcggttc	2820
gtaagctgta	atgcaagtag	cgtatgcgct	cacgcaactg	gtccagaacc	ttgaccgaac	2880
gcagcgggtg	taacggcgca	gtggcggttt	tcatggcttg	ttatgactgt	ttttttgggg	2940
tacagtctat	gcctcgggca	tccaagcagc	aagcgcgtta	cgcctgggtg	cgatgtttga	3000
tgttatggag	cagcaacgat	gttacgcagc	agggcagtcg	ccctaaaaca	aagttaaaca	3060
tcatgagggg	agcggtgatc	gccgaagtat	cgactcaact	atcagaggta	gttggcgtca	3120
tcgagcgcca	tctcgaaccg	acgttgctgg	ccgtacattt	gtacggctcc	gcagtggatg	3180
gcggcctgaa	gccacacagt	gatattgatt	tgctggttac	ggtgaccgta	aggcttgatg	3240
aaacaacgcg	gcgagctttg	atcaacgacc	ttttggaac	ttcggttcc	cctggagaga	3300
gcgagattct	ccgcgctgta	gaagtaccca	ttgttggtga	cgacgacatc	attccgtggc	3360
gttatccagc	taagcgcgaa	ctgcaatttg	gagaatggca	gcgcaatgac	attcttgcat	3420
gtatcttcga	gccagccacg	atcgacattg	atctggctat	cttgctgaca	aaagcaagag	3480

ES 2 663 445 T3

aacatagcgt tgccttggtgta ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgctg cgggccaggt	3720
atcagcccggt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcg c agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataatgtcta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggtta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgac ccgtggatga ccttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agagggtccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgact ggaaagcggg cagtgcgagc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc	4380
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct tgctattgac	4440
gacagctatg gttcactgtc caccaaccaa aactgtgctc agtaccgcca atatttctcc	4500
cttgaggggt acaaagaggt gtccctagaa gagatccacg ctgtgtaaaa attttacaaa	4560
aaggtattga ctttccctac aggggtgtgta ataatttaac tacaggcggg ggcaaccccg	4620
cctgttctgc agaggaggaa tatagccatg gaagtgaaaa tcttcaacac ccaggatgtt	4680
caggattttc tgcgtgttgc aagcgggtctg gaacaagagg gtggtaatcc gcgtgttaaa	4740
caaattattc atcgtgttct gagcgacctg tataaagcaa ttgaagatct gaatatcacc	4800
agcgacgaat attgggcagg cgttgcatat ctgaatcagc tgggtgcaaa tcaagaagca	4860
ggtctgctga gtccgggtct gggttttgat cattatctgg atatgcgtat ggatgcagaa	4920
gatgcagcac tgggtattga aaatgcaaca ccgcgtacca ttgaagggtcc gctgtatgtt	4980
gcgggtgcac cggaaagcgt tggttatgca cgcatggatg atggtagcga tccgaatggt	5040
cataccctga ttctgcatgg caccattttt gatgcagatg gtaaaccgct gccgaatgca	5100
aaagttgaaa tttggcatgc aaacaccaaa ggcttttata gccattttga tccgaccggt	5160
gaacagcagg cctttaatat gcgtcgtagc attattaccg atgagaatgg tcagtatcgt	5220
gttcgtacca ttctgcctgc cggttatggt tgtcctccgg aagggtccgac ccagcaactg	5280
ctgaaccaac tgggtcgtca tggtaatcgt ccggcacata ttcattattt tgttagcgca	5340

ES 2 663 445 T3

gatggtcacc gtaaactgac caccagatt aatggtgccg gtgatccgta tacctatgat	5400
gattttgcat atgccacccg tgaaggctctg gttggtgatg cagttgaaca taccgatccg	5460
gaagcaatta aagccaatga tgtggaaggt ccttttgccg aaatggtgtt tgatctgaaa	5520
ctgacccgctc tgggtgatgg tgttgataat caggttggtg atcgtccgcg tctggcagtt	5580
taatacacca aaatggttca aaattatcag gcgagtgatc atgatcactg gcctgttttt	5640
atttcagggg aggggtggaga caattacgtg gataatcaga tcatccaaga aaccgtggat	5700
aaaattctga gcgttctgcc gaatcaggca ggtcagctgg cacgtctggt gcgtctgatg	5760
caatttgcat gcgatccgac cattaccgtt attggcaaataa accatggg taaaagccgt	5820
ctgctgaatg aactgattgg caccgatatc tttagcgttg cagataaacg tgaaccatt	5880
cagctggccg aacataaaca ggatcagggt cgttggtggt atgcacctgg tctggatgcc	5940
gatgtgcag cagttgatga tcgtcatgca tttgaagcag tttggacca ggcagatatt	6000
cgtctgtttg ttcatacgtc tcgtgaaggt gaactggatg caaccgaaca ccatctgctg	6060
caacagctga ttgaagatgc cgatcatagc cgtcgtcaga ccattctggt tctgacccag	6120
attgatcaga ttccggatca gaccatcctg acacagatta aaaccagcat tgcacagcag	6180
gttccgaaac tggatatattg ggcagttagc gcaaccgctc atcgtcaggg cattgaaaac	6240
ggtaaaaccc tgctgatcga aaaaagcggg attggtgcac tgcgccatac cctggaacag	6300
gcactggcac aggtgccgag cgcacgtacc tatgaaaaaa atcgtctgct gtcagatctg	6360
caccatcagc tgaaacaact gctgctggat cagaaacatg ttctgcaaca actgcaacag	6420
acacagcaac agcagctgca tgattttgat accggtctga ttaacattct ggacaaaatt	6480
cgtgttgatc tggaaccgat tgtgaatatt gatggtcagg atcaagcact gaatccgcat	6540
agccttgcaa ccatgtttaa aaacaccgca gcaaaacagc agcgtgccaa agttcagatt	6600
gcatatagcc gtgcatgcat tgaaatcaac agccatctga ttccgcatgg tgtgttggt	6660
ctgcctgcgg aacagcagac caccattaaa agcattgata ccgtgattgt tgcctgttt	6720
ggatcagcg ttaaatttcg tgatcagctg cgtgccctgt tttataccga taccgaacgt	6780
cagcgtctgc aacgtgaatt tcgtttctat tttgaaaaaa gtgccggtcg catgattctg	6840
gcagcaaaaa ttgaacagac catgcgtcag cagggtctgta ttcagaatgc catgatggca	6900
ctgcaacaaa tggaaagcgc agcataaaaa caggacgcc gcaaacggcg tccgaatttc	6960
ttggtcgacc gttaaatcta tcaccgcaag ggataaatat ctaacaccgt gcgtgttgac	7020
tattttacct ctggcgggtga taatggttgc atgtactaat ctagataagg aatatagcca	7080
tgaccgcacc gattcaggat ctgcgtgatg caattgccct gctgcaacag catgataatc	7140
agtatctgga aaccgatcat ccggttgatc cgaatgcaga actggcaggc gtttatcgtc	7200
atattggtgc cgggtggcacc gttaaacgtc cgaccctgat tgggtccggca atgatgttta	7260

ES 2 663 445 T3

ataacattaa	aggttatccg	cacagccgta	ttctggttgg	tatgcatgca	agccgtcagc	7320
gtgcagcact	gctgctgggt	tgtgaagcaa	gtcagctggc	actggaagtt	ggtaaagcag	7380
ttaaaaaacc	ggttgcaccg	gtggttgttc	cggcaagcag	cgcaccgtgt	caagagcaga	7440
tttttctggc	agatgatccg	gattttgatc	tgcgtaccct	gctgcctgca	cataccaata	7500
ccccgattga	tgcaggtccg	tttttttgtc	tgggtctggc	cctggcaagc	gatccggtgg	7560
atgcaagcct	gaccgatgtt	accattcatc	gtctgtgtgt	tcagggctgt	gatgaactga	7620
gcatgttcct	ggcagcaggt	cgccatattg	aagtttttcg	tcagaaagca	gaagcagcag	7680
gtaaaccgct	gccgattacc	attaatatgg	gtctggaccc	agcaatctat	attggcgcac	7740
gttttgaagc	accgaccacc	ccgtttggtt	ataatgaact	gggtgttgcc	ggtgcaactgc	7800
gtcagcgtcc	ggttgaactg	gttcaggggtg	ttagcgttcc	ggaaaaagca	attgcacgtg	7860
ccgaaattgt	tattgaaggt	gaactgctgc	ctggtgttcg	tgttcgtgaa	gatcagcata	7920
ccaattcagg	tcatgcaatg	ccggaatttc	cgggttattg	tgggtgtgca	aatccgagcc	7980
tgcccggttat	taaagttaa	gccgttacca	tgcgcaataa	cgcaattctg	caaaccctgg	8040
ttggtccggg	tgaagaacat	accaccctgg	caggtctgcc	gaccgaagca	agcatttgga	8100
atgcagttga	agcagcaatt	ccgggttttc	tgcaaaatgt	ttatgcccat	accgcaggcg	8160
gtggtaaatt	tctgggtatt	ctgcaagtga	aaaaacgtca	gcctgccgat	gaaggtcgtc	8220
agggtcaggc	agccctgctg	gcgctggcaa	cctatagcga	actgaaaaat	atcattctgg	8280
tggatgagga	tgtggacatt	tttgatagtg	atgatattct	gtgggcaatg	accaccctga	8340
tgcaggggtga	tgttagcatt	accaccattc	cgggtattcg	cggtcacacg	ctggaccctga	8400
gccagacacc	ggaatattca	ccgagcattc	gtggtaatgg	tattagctgc	aaaaccatct	8460
ttgattgtac	cgttccgtgg	gcaactgaaa	gccattttga	acgtgcaccg	tttgcagatg	8520
ttgatccgcg	tccgtttgca	cctgaatatt	ttgcacgtct	ggaaaaaaat	cagggcagcg	8580
caaaataagc	taataacagg	cctgctggta	atcgcaggaa	tttttatttg	gatggatccg	8640
cctacctagc	ttccaagaaa	gatatcctaa	cagcacaaga	gcggaagat	gttttgttct	8700
acatccagaa	caacctctgc	taaaattcct	gaaaaatttt	gcaaaaagtt	gttgacttta	8760
tctacaaggt	gtggtataat	aatcttaaca	acagcaggac	gctcccgggt	tgaggaaaac	8820
ctaagccga	gcaaactggc	aattagcagc	atgagcctgg	gtcgttggtt	tgcaggtcat	8880
agcctggata	gtaaactgga	tgcagcacag	cgttatgggt	atctgggtat	tgaactgttt	8940
tatgaggatc	tggttgatgt	tgcagaacat	ctgagcaatg	aacgtccgag	tccggaaggt	9000
ccgtttgttg	aagcacagat	tgcagcagca	cgtcatattc	tgcaaatgtg	tcaggcacgt	9060
ggtctggaag	ttgtttgtct	gcaaccgttt	atgcattatg	atggtctgaa	tgatcgtgcc	9120

ES 2 663 445 T3

	gaacatgaac gtcgtctgga aaaactggca ctgtggattg aactggcaca tgaactgcat	9180
	accgatatta ttcagattcc ggcaaatttt ctgcctgcaa atcaggtag cgataatctg	9240
5	gatctgattg ttagcgatct gtgtaaagtt gcagatattg gtgcacaggc actgcctccg	9300
	attcgttttg catatgaaag cctgtgttgg agcaccctgt ttgatctgtg ggaacgttgt	9360
10	tgggatattg ttcagcgtgt ggatcgtccg aatttttgta tttgtctgga tacctttaac	9420
	atcctgggtc gcatttatgc agatccgacc agcccgagcg gtcgtacccc gaatgcaaaa	9480
	gaagcagttc gtaaaagcat tgccaatctg gttagccgtg tggatgttag caaagttttt	9540
15	tatgttcagg ttgtggatgc cgaacgtctg agtaaaccgc tgctgcctgg tcatccgtat	9600
	tataaccggg aacagcctgc acgtatgagc tggtcacgta attgtcgtct gttctatggt	9660
	gaaaccgaat atggtgcata tctgccggtt aaagaagttg cacgcgcact gtttcatggt	9720
20	attggttttg aaggttgggt tagcctggaa ctgtttaatc gtcgtatgag cgaagaaggt	9780
	ccggaagttc ctgaagaact ggccatgcgt ggtgcaatta gctgggcaaa actggttcag	9840
25	gatctgcgta ttccggttga aggtccgctg gttaccatgc ctctgttag cgcaagcctg	9900
	taaatgcatg cgcgccgctg tcgcgcggcg cttttttttg gtaccgagct cgaattcact	9960
	ggcgcgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttacccaac ttaatcgcct	10020
30	tgcagcacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa gagggccgca ccgatcgccc	10080
	ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt ttctccttac	10140
	gcattctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc	10200
35	cgcatagtta agccagcccc gacaccgcgc aacaccgcct gacgaattc	10249
	<210> 28	
	<211> 7623	
	<212> ADN	
40	<213> Plásmido pCP32AMP;	
	<400> 28	
	acatgaatgg tcttcggttt ccgtgtttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgccc	60
	tgcaccatta tgttcggat ctgcatcgca ggatgctgct ggctaccctg tggaacacct	120
	acatctgtat taacgaagcg ctggcattga ccctgagtga tttttctctg gtcccgcgc	180
	atccataccg ccagttgttt accctcaca cgttccagta accgggcatg ttcattcatca	240
	gtaaccgta tcgtgagcat cctctctcgt ttcattcggtg tcattacccc catgaacaga	300
	aattccccct tacacggagg catcaagtga ccaaacagga aaaaaccgcc cttaacatgg	360
	cccgctttat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa actcaacgag ctggacgcgg	420
	atgaacaggc agacatctgt gaatcgcttc acgaccacgc tgatgagctt taccgcagct	480
45	gcctcgcgcg tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg	540

ES 2 663 445 T3

tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg	600
gtgttgggcg gtgtcggggc gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata	660
ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcgggtgtga	720
aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgtctctccg cttcctcgt	780
cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaagcg	840
ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg	900
ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg	960
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg	1020
actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac	1080
cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgttttctca	1140
tagctcacgc tgtaggatc tcagttcgggt gtaggctcgtt cgtcccaagc tgggctgtgt	1200
gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc	1260
caaccgggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag	1320
agcgagggat gtaggcgggt ctacagagtt ctggaagtgg tggcctaact acggctacac	1380
tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct cgtgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt	1440
tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgtcggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa	1500
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg	1560
gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggtatt ttggtcatga gattatcaaa	1620
aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat	1680
atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc	1740
gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat	1800
acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc	1860
ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggcc	1920
tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag	1980
ttcgcaggtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct gcaggcatcg tgggtgcacg	2040
ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg	2100
atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggtagt ctccctcgggt cctccgatcg ttgtcagaag	2160
taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt	2220
catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga	2280
atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctc acacgggata ataccgcgcc	2340
acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc	2400
aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc	2460

ES 2 663 445 T3

ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc	2520
cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca	2580
atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat	2640
ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt	2700
ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaaat aggcgtatca cgaggccctt	2760
tcgtcttcaa gaattctgaa ccagtcctaa aacgagtaaa taggaccggc aattcttcaa	2820
gcaataaaca ggaataccaa ttattaaaag ataacttagt cagatcgtac aataaagctt	2880
tgaagaaaaa tgcgccttat tcaatctttg ctataaaaaa tggcccaaaa tctcacattg	2940
gaagacattt gatgacctca tttctttcaa tgaagggcct aacggagttg actaatgttg	3000
tgggaaattg gagcgataag cgtgcttctg ccgtggccag gacaacgtat actcatcaga	3060
taacagcaat acctgatcac tacttcgcac tagtttctcg gtactatgca tatgatccaa	3120
tatcaaagga aatgatagca ttgaaggatg agactaatcc aattgaggag tggcagcata	3180
tagaacagct aaagggtagt gctgaaggaa gcatacgata ccccgcatgg aatgggataa	3240
tatcacagga ggtactagac tacctttcat cctacataaa tagacgcata taagtacgca	3300
tttaagcata aacacgcact atgccgttct tctcatgtat atatatatac aggcaacacg	3360
cagatatagg tgcgacgtga acagtgagct gtatgtgctg agctcgcgtt gcattttcgg	3420
aagcgtctgt tttcggaaac gctttgaagt tcctattccg aagttcctat tctctagaaa	3480
gtataggaac ttcagagcgc ttttgaaaac caaaagcgt ctgaagacgc actttcaaaa	3540
aaccaaaaaa gcaccggact gtaacgagct actaaaatat tgcgaatacc gcttcacaa	3600
acattgctca aaagtatctc tttgctatat atctctgtgc tataatcccta tataacctac	3660
ccatccacct ttcgctcctt gaacttgcac ctaaactcga cctctacatt ttttatgttt	3720
atctctagta ttactcttta gacaaaaaaa ttgtagtaag aactattcat agagtgaatc	3780
gaaaacaata cgaaaatgta aacatttcct atacgtagta tatagagaca aaatagaaga	3840
aaccgttcat aattttctga ccaatgaaga atcatcaacg ctatcacttt ctgttcacaa	3900
agtatgcgca atccacatcg gtatagaata taatcgggga tgcctttatc ttgaaaaaat	3960
gcaccgcgag cttcgctagt aatcagtaaa cgcgggaagt ggagtcaggc tttttttatg	4020
gaagagaaaa tagacaccaa agtagccttc ttctaacctt aacggacctc cagtgcacaa	4080
agttatcaag agactgcatt atagagcgca caaaggagaa aaaaagtaat ctaagatgct	4140
ttgttagaaa aatagcgtc tcgggatgca tttttgtaga acaaaaaaga agtatagatt	4200
ctttgttggg aaaatagcgc tctcgcgttg catthctgtt ctgtaaaaat gcagctcaga	4260
ttctttgttt gaaaaattag cgctctcgcg ttgcattttt gttttacaaa aatgaagcac	4320

ES 2 663 445 T3

agattcttcg ttggtaaaat agcgctttcg cgttgcatth ctgttctgta aaaatgcagc	4380
tcagattctt tgtttgaaaa attagcgctc tcgcgttgca tttttgttct acaaaatgaa	4440
gcacagatgc ttcgttaaca aagatatgct attgaagtgc aagatggaaa cgcagaaaat	4500
gaaccgggga tgcgacgtgc aagattacct atgcaataga tgcaatagtt tctccaggaa	4560
ccgaaatata tacattgtct tccgtaaagc gctagactat atattattat acaggttcaa	4620
atatactatc tgtttcaggg aaaactccca ggttcggatg ttcaaaattc aatgatgggt	4680
aacaagtacg atcgtaaatac tgtaaaacag tttgtcggat attaggctgt atctcctcaa	4740
agcgtattcg aatatcattg agaagctgca gcgtcacatc ggataataat gatggcagcc	4800
attgtagaag tgccttttgc atttctagtc tctttctcgg tctagctagt ttactacat	4860
cgcgaagata gaactcttaga tcacactgcc tttgctgagc tggatcaata gagtaacaaa	4920
agagtggtaa ggctcgtta aaggacaagg acctgagcgg aagtgtatcg tacagtagac	4980
ggagtatact agtatagtct atagtcctgt gaattctcat gtttgacagc ttatcatcga	5040
taagcttttc aattcaattc atcatttttt ttttattctt ttttttgatt tcggtttctt	5100
tgaaattttt ttgattcggg aatctccgaa cagaaggaag aacgaaggaa ggagcacaga	5160
cttagattgg tatatatacg catatgtagt gttgaagaaa catgaaattg cccagtattc	5220
ttaacccaac tgcacagAAC aaaaacctgc aggaacgaa gataaatcat gtcgaaagct	5280
acataataag aacgtgctgc tactcatcct agtcctgttg ctgccaagct atttaatatc	5340
atgcacgaaa agcaaacaaa cttgtgtgct tcattggatg ttcgtaccac caaggaatta	5400
ctggagttag ttgaagcatt aggtcccaaa atttgtttac taaaaacaca tgtggatatc	5460
ttgactgatt tttccatgga gggcacagtt aagccgctaa aggcattatc cgccaagtac	5520
aattttttac tcttcgaaga cagaaaattt gctgacattg gtaatacagt caaattgcag	5580
tactctgcgg gtgtatacag aatagcagaa tgggcagaca ttacgaatgc acacggtgtg	5640
gtgggccccag gtattgttag cggtttgaag caggccggcag aagaagtaac aaaggaacct	5700
agaggccttt tgatgttagc agaattgtca tgcaagggct ccctatctac tggagaatat	5760
actaagggtta ctgttgacat tgcgaagagc gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct	5820
caaagagaca tgggtggaag agatgaaggc tacgattggg tgattatgac acccggtgtg	5880
ggtttagatg acaagggaga cgcattgggt caacagtata gaaccgtgga tgatgtggtc	5940
tctacaggat ctgacattat tattgttgga agaggactat ttgcaaaggg aagggatgct	6000
aaggtagagg gtgaacgtta cagaaaagca ggctgggaag catatttgag aagatgcggc	6060
cagcaaaact aaaaaactgt attataagta aatgcatgta tactaaactc acaaattaga	6120
gcttcaattt aattatatca gttattaccg gggaatctcg gtcgtaatga cttgaaataa	6180
ttaacaaaca aaggagttac agttagaaat tgtaggagag atctcgtttt tcgcgacaat	6240

ES 2 663 445 T3

	ctggcgTTTT tcttgctaatt tccaggatta atccgttcat agtgtaaaac cccgtttaca	6300
	cattctgacg gaagatatag attggaagta ttgcattcac taagataagt atggcaacac	6360
5	tggaacagac atgaattatc agaacgacga tttacgcac aaagaaatca aagagtact	6420
	tcctcctgtc gcattgctgg aaaaattccc cgctactgaa aatgccgcga atacggttgc	6480
10	ccatgcccgga aaagcgatcc ataagatcct gaaaggtaat gatgatcgcc tgttggttgt	6540
	gattggccca tgctcaattc atgatcctgt cgcggcaaaa gagtatgcca ctgcgttgc	6600
	ggcgctgctg gaagagctga aagatgagct ggaaatcgt atgcgcgtct attttgaaaa	6660
15	gccgcgtacc acggtgggct ggaagggtc gattaacgat ccgcatatgg ataatagctt	6720
	ccagatcaac gacggtctgc gtatagccc taaattgctg cttgatatta acgacagcg	6780
	tctgccagcg gcaggtgagt ttctcgatat gatcacccca caatatctcg ctgacctgat	6840
20	gagctggggc gcaattggcg cacgtaccac cgaatcgag gtgcaccgcg aactggcatc	6900
	agggctttct tgtccggtcg gcttcaaaaa tggcaccgac ggtacgatta aagtggctat	6960
	cgatgccatt aatgccgcg gtgcgcgcga ctgcttcctg tccgtaacga aatgggggca	7020
25	ttcggcgatt gtgaatacca gcggtaacgg cgattgccat atcattctgc gcggcggtaa	7080
	agagcctaac tacagcgga agcacgttgc tgaagtgaag gaagggtga acaaagcagg	7140
30	cctgccagca caggtgatga tcgatttcag ccatgctaac tcgtccaaac aattcaaaaa	7200
	gcagatggat gtttgtgctg acgtttgcc gcagattgcc ggtggcgaaa aggccattat	7260
	tggcgatgat gtggaagcc atctggtgga aggcaatcag agcctcgaga gcggggagcc	7320
35	gctggcctac ggtaagagca tcaccgatgc ctgcatcggc tgggaagata ccgatgctct	7380
	gttacgtcaa ctggcgaatg cagtaaaagc gcgtcgcggt taaggtttta ttgtcggtg	7440
	cgccgtcaga gtggcgatc cgatgaatca ccacaggcct gataagtcgc gcagcgtcgc	7500
40	atcaggcaat gtgctccatt gttagcaaca aaaaagccga ctcaactgca gtcggctttc	7560
	tcattttaaa cgaatgacgt ttacttcgct ttaccctggt ttgcaaccgc cgctgctttc	7620
45	gct	7623
	<210> 29	
	<211> 7630	
	<212> ADN	
	<213> Plásmido pCP14;	
50	<400> 29	
	ctcgaggcta ttgacgacg ctatggttca ctgtccacca accaaaactg tgctcagtac	60
	cgccaatatt tctcccttga ggggtacaaa gaggtgtccc tagaagagat ccacgctgtg	120
	taaaaatttt acaaaaagg attgactttc cctacagggt gtgtaataat ttaattacag	180
	gcgggggcaa cccgcctgt tctagaggag gaggaatcgc catggagagg attgtcggtta	240

ES 2 663 445 T3

ctctcgggga acgtagttac ccaattacca tcgcatctgg tttgtttaat gaaccagctt	300
cattcttacc gctgaaatcg ggcgagcagg tcatgttggg caccaacgaa accctggctc	360
ctctgtatct cgataaggtc cgcggcgtag ttgaacaggc ggggtgtaac gtcgatagcg	420
ttatcctccc tgacggcgag cagtataaaa gcctggctgt actcgatacc gtctttacgg	480
cgttggtaca aaagccgcat ggtcgcgata ctacgctggg ggcgcttggc ggcggcgtag	540
tgggcgatct gaccggcttc gcggcggcga gttatcagcg cgggtgtcgt ttcattcaag	600
tcccgcagac gttactgtcg caggtcgatt cctccgttgg cggcaaaact gcggtcaacc	660
atcccctcgg taaaaacatg attggcgcgt tctaccagcc tgcttcagtg gtgggtggatc	720
tcgactgtct gaaaacgctt ccccgcggtg agttagcgtc ggggctggca gaagtcatca	780
aatacggcat tattcttgac ggtgcgtttt tcaactggct ggaagagaat ctggatgcgt	840
tgttgcgctct ggacggtccg gcaatggcgt actgtattcg ccgttgttgt gaactgaagg	900
cagaagttgt cgccgccgac gagcgcgaaa ccgggttacg tgctttactg aatctgggac	960
acacctttgg tcatgccatt gaagctgaaa tggggtatgg caattgggta catggtgaag	1020
cggtcgctgc gggatatggtg atggcggcgc ggacgtcggg acgtctcggg cagtttagtt	1080
ctgccgaaac gcagcgtatt ataaccctgc tcacgcgggc tgggttaccg gtcaatgggc	1140
cgcgcgaaat gtccgcgcag gcgtatttac cgcataatgct gcgtgacaag aaagtccttg	1200
cgggagagat gcgcttaatt cttccgttgg caattggtaa gagtgaagtt cgcagcggcg	1260
tttcgcacga gcttgttctt aacgccattg ccgattgtca atcagcgtaa tcatcgttca	1320
tgcctgatgc cgctatgtag gccggataag gcgttcacgc cgcataccggc aaccgatgcc	1380
tgatgcgacg cggtcgcgctc ttatcaggcc tacaggctga tgccgatatg tacatcgat	1440
tcggcaatta atacatagca acatgaatgg tcttcggttt ccgtgtttcg taaagtctgg	1500
aaacgcggaa gtcagcgccc tgcaccatta tgttcgggat ctgcatcgca ggatgctgct	1560
ggctaccctg tggaacacct acatctgtat taacgaagcg ctggcattga ccctgagtga	1620
tttttctctg gtcccgccgc atccataccg ccagttgttt accctcaca cgttccagta	1680
accgggcatg ttcacatca gtaaccgta tcgtgagcat cctctctcgt ttcacggta	1740
tcattacccc catgaacaga aattccccct tacacggagg catcaagtga ccaaacagga	1800
aaaaaccgcc cttaacatgg cccgctttat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa	1860
actcaacgag ctggacgcgg atgaacaggc agacatctgt gaatcgcttc acgaccacgc	1920
tgatgagctt taccgcagct gcctcgcgcg ttctcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca	1980
catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc	2040
ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc gcagccatga cccagtcacg	2100

ES 2 663 445 T3

tagcgatagc ggagtgtata ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga	2160
gtgcaccata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg	2220
cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg	2280
gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga	2340
aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg	2400
gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag	2460
aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc	2520
gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg	2580
ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt	2640
cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc	2700
ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc	2760
actggttaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg	2820
tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca	2880
gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc	2940
ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat	3000
cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt	3060
ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt	3120
tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctctg acagttacca atgcttaatc	3180
agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcac ccatagttgc ctgactcccc	3240
gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gcccagtgcc tgcaatgata	3300
ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg	3360
gccgagcgca gaagtgggcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtcctat taattgttgc	3420
cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct	3480
gcaggcatcg tgggtgtcacg ctcgctgctt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa	3540
cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccttcggt	3600
cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca	3660
ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac	3720
tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctca	3780
acacgggata ataccgccc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt	3840
tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc	3900
actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca	3960
aaaacaggaa ggcaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata	4020

ES 2 663 445 T3

ctcatactct	tcctttttca	atattattga	agcattttatc	agggttattg	tctcatgagc	4080
ggatacatat	ttgaatgtat	ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttcgcgcg	cacattttccc	4140
cgaaaagtgc	cacctgacgt	ctaagaaacc	attattatca	tgacattaac	ctataaaaaat	4200
aggcgtatca	cgaggccctt	tcgtcttcaa	gaattctgaa	ccagtcctaa	aacgagtaaa	4260
taggaccggc	aattcttcaa	gcaataaaca	ggaataccaa	ttattaaaag	ataacttagt	4320
cagatcgtac	aataaagctt	tgaagaaaaa	tgcgccttat	tcaatctttg	ctataaaaaa	4380
tggcccaaaa	tctcacattg	gaagacattt	gatgacctca	tttctttcaa	tgaagggcct	4440
aacggagttg	actaatgttg	tgggaaattg	gagcgataag	cgtgcttctg	ccgtggccag	4500
gacaacgtat	actcatcaga	taacagcaat	acctgatcac	tacttcgcac	tagtttctcg	4560
gtactatgca	tatgatccaa	tatcaaagga	aatgatagca	ttgaaggatg	agactaatcc	4620
aattgaggag	tggcagcata	tagaacagct	aaagggtagt	gctgaaggaa	gcatacgata	4680
ccccgcatgg	aatgggataa	tatcacagga	ggtactagac	tacctttcat	cctacataaa	4740
tagacgcata	taagtacgca	tttaagcata	aacacgcact	atgccgttct	tctcatgtat	4800
atatatatac	aggcaacacg	cagatatagg	tgcgacgtga	acagtgagct	gtatgtgcgc	4860
agctcgcggt	gcattttcgg	aagcgctcgt	tttcggaaac	gctttgaagt	tcctattccg	4920
aagttcctat	tctctagaaa	gtataggaac	ttcagagcgc	ttttgaaaac	caaaagcgct	4980
ctgaagacgc	actttcaaaa	aaccaaaaac	gcaccggact	gtaacgagct	actaaaatat	5040
tgcgaaatacc	gcttccacaa	acattgctca	aaagtatctc	tttgctatat	atctctgtgc	5100
tatatcccta	tataacctac	ccatccacct	ttcgctcctt	gaacttgcat	ctaaactcga	5160
cctctacatt	ttttatgttt	atctctagta	ttactcttta	gacaaaaaaa	ttgtagtaag	5220
aactattcat	agagtgaatc	gaaaacaata	cgaaaatgta	aacatttcct	atacgtagta	5280
tatagagaca	aaatagaaga	aaccgttcat	aattttctga	ccaatgaaga	atcatcaacg	5340
ctatcacttt	ctgttcacaa	agtatgcgca	atccacatcg	gtatagaata	taatcgggga	5400
tgcctttatc	ttgaaaaaat	gcaccgcgag	cttcgctagt	aatcagtaaa	cgcggggaagt	5460
ggagtcaggc	tttttttatg	gaagagaaaa	tagacaccaa	agtagccttc	ttctaacctt	5520
aacggaccta	cagtgcacaa	agttatcaag	agactgcatt	atagagcgca	caaaggagaa	5580
aaaaagtaat	ctaagatgct	ttgttagaaa	aatagcgctc	tcgggatgca	tttttgtaga	5640
acaaaaaaga	agtatagatt	ctttgttggt	aaaatagcgc	tctcgcgttg	catttctggt	5700
ctgtaaaaaat	gcagctcaga	ttctttgttt	gaaaaattag	cgctctcgcg	ttgcattttt	5760
gttttacaaa	aatgaagcac	agattcttcg	ttggtaaaaat	agcgctttcg	cgttgcattt	5820
ctgttctgta	aaaatgcagc	tcagattctt	tgtttgaaaa	attagcgctc	tcgcggttgca	5880

ES 2 663 445 T3

tttttgttct	acaaaatgaa	gcacagatgc	ttcgттааса	aagatatgct	attgaagtgc	5940
aagatggaaa	cgcagaaaat	gaaccgggga	tgcgacgtgc	aagattacct	atgcaataga	6000
tgcaatagtt	tctccaggaa	ccgaaataca	tacattgtct	tccgtaaagc	gctagactat	6060
atattattat	acaggttcaa	atatactatc	tgtttcaggg	aaaactccca	ggttcggatg	6120
ttcaaaattc	aatgatgggt	aacaagtacg	atcgtaaata	tgtaaaacag	tttgtcggat	6180
attaggctgt	atctcctcaa	agcgtattcg	aatatcattg	agaagctgca	gcgtcacatc	6240
ggataataat	gatggcagcc	attgtagaag	tgctttttgc	atttctagtc	tctttctcgg	6300
tctagctagt	tttactacat	cgcgaagata	gaatcttaga	tcacactgcc	tttgtctgagc	6360
tggtcaata	gagtaacaaa	agagtggtaa	ggcctcgtta	aaggacaagg	acctgagcgg	6420
aagtgtatcg	tacagtagac	ggagtatact	agtatagtct	atagtccgtg	gaattctcat	6480
gtttgacagc	ttatcatcga	taagcttttc	aattcaattc	atcatTTTTT	ttttattctt	6540
ttttttgatt	tcggtttctt	tgaaatTTTT	ttgattcggg	aatctccgaa	cagaaggaag	6600
aacgaaggaa	ggagcacaga	cttagattgg	tatatatacg	catatgtagt	gttgaagaaa	6660
catgaaattg	cccagtattc	ttaacccaac	tgcacagaac	aaaaacctgc	aggaaacgaa	6720
gataaatcat	gtcgaaagct	acatataagg	aacgtgctgc	tactcatcct	agtctgtgtg	6780
ctgccaagct	atttaatatc	atgcacgaaa	agcaaacaaa	cttgtgtgct	tcattggatg	6840
ttcgtaccac	caaggaatta	ctggagttag	ttgaagcatt	aggtcccaa	atttgtttac	6900
taaaaacaca	tgtggatatc	ttgactgatt	tttccatgga	gggcacagtt	aagccgctaa	6960
aggcattatc	cgccaaagtac	aattttttac	tcttcgaaga	cagaaaattt	gctgacattg	7020
gtaatacagt	caaattgcag	tactctgcgg	gtgtatacag	aatagcagaa	tgggcagaca	7080
ttacgaatgc	acacggtgtg	gtgggcccag	gtattgttag	cggtttgaag	caggcggcag	7140
aagaagtaac	aaaggaacct	agaggccttt	tgatgttagc	agaattgtca	tgcaagggct	7200
ccctatctac	tggagaatat	actaagggtg	ctgttgacat	tgccaagagc	gacaaagatt	7260
ttgttatcgg	ctttattgct	caaagagaca	tgggtggaag	agatgaaggt	tacgattggt	7320
tgattatgac	acctcggtgtg	ggttttagatg	acaagggaga	cgcattgggt	caacagtata	7380
gaaccgtgga	tgatgtggtc	tctacaggat	ctgacattat	tattgttgga	agaggactat	7440
ttgcaaaggg	aagggtatgct	aaggtagagg	gtgaacgtta	cagaaaagca	ggctgggaag	7500
catatttgag	aagatgcggc	cagcaaaact	aaaaaactgt	attataagta	aatgcatgta	7560
tactaaactc	acaaattaga	gcttcaattt	aattatatca	gttattaccc	gggaatctcg	7620
gtcgtaatga						7630

ES 2 663 445 T3

5 <210> 30
 <211> 10015
 <212> ADN
 <213> Plásmido pCP50;

 10 <400> 30
 cttgaaataa ttaacaaaca aaggagttac agttagaaat tgtaggagag atctcgtttt 60
 tcgcgacaat ctggcggtttt tcttgctaata tccaggatta atccggttcac agtgtaaaac 120
 cccggtttaca cattctgacg gaagatatag attggaagta ttgcattcac taagataagt 180
 atggcaaacac tggacagac atgaattatc agaacgacga tttacgcatc aaagaaatca 240
 aagagttact tcctcctgtc gcattgctgg aaaaattccc cgctactgaa aatgccgcga 300
 atacggttgc ccatgcccga aaagcgatcc ataagatcct gaaaggtaat gatgatcgcc 360
 tgttggttgt gattggccca tgctcaattc atgatcctgt cgcggaacaa gagtatgcca 420
 ctgcttgctt ggcgctgctg gaagagctga aagatgagct ggaaatcgta atgcgcgtct 480
 attttgaaaa gccgcgtacc acggtgggct ggaaagggtt gattaacgat ccgcatatgg 540
 ataatagctt ccagatcaac gacggtctgc gtatagcccg taaattgctg cttgatatta 600
 acgacagcgg tctgccagcg gcaggtgagt ttctcgatat gatcacccca caatatctcg 660
 ctgacctgat gagctggggc gcaattggcg cacgtaccac cgaatcgag gtgcaccgcg 720
 aactggcatc agggctttct tgtccggtcg gcttcaaaaa tggcaccgac ggtacgatta 780
 aagtggctat cgatgccatt aatgccgcg gtgcgcgca ctgcttcctg tccgtaacga 840
 aatgggggca ttcggcgatt gtgaatacca gcgtaacgg cgattgccat atcattctgc 900
 gcggcggtta agagcctaac tacagcgcga agcacgttgc tgaagtgaag gaagggtgga 960
 acaaagcagg cctgccagca caggtgatga tcgatttcag ccatgctaac tcgtccaaac 1020
 aattcaaaaa gcagatggat gtttgtgctg acgtttgcca gcagattgcc ggtggcgaaa 1080
 aggccattat tggcgtgatg gtggaaagcc atctggtgga aggcaatcag agcctcgaga 1140
 gcggggagcc gctggcctac ggtaagagca tcaccgatgc ctgcatcggc tgggaagata 1200
 ccgatgctct gttacgtcaa ctggcgaatg cagtaaaagc gcgtcgcggg taaggtttaa 1260
 ttgtcggatg cgcgctcaga gtggcgatc cgatgaatca ccacaggcct gataagtgcg 1320
 gcagcgtcgc atcaggcaat gtgctccatt gttagcaaca aaaaagccga ctactttgca 1380
 gtcggctttc tcatttttaa cgaatgacgt ttacttcgct ttaccctggt ttgcaaccgc 1440
 cgctgctttc gctacatgaa tggctctcgg tttccgtgtt tcgtaaagtc tggaaacgcg 1500
 gaagtcagcg ccctgcacca ttatgttccg gatctgcac gcaggatgct gctggctacc 1560
 ctgtggaaca cctacatctg tattaacgaa gcgctggcat tgaccctgag tgatttttct 1620
 ctggtcccg cgcacccata ccgccagttg ttaccctca caacgttcca gtaaccgggc 1680
 atgttcatca tcagtaaccc gtatcgtgag catcctctct cgtttcatcg gtatcattac 1740
 ccccatgaac agaaattccc ccttacacgg aggcatacag tgaccaaaca ggaaaaaac 1800

ES 2 663 445 T3

gcccttaaca tggcccgctt tatcagaagc cagacattaa cgcttctgga gaaactcaac	1860
gagctggacg cggatgaaca ggcagacatc tgtgaatcgc ttcacgacca cgctgatgag	1920
ctttaccgca gctgcctcgc gcgtttcggg gatgacggtg aaaacctctg acacatgcag	1980
ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca agcccgtcag	2040
ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca tgaccagtc acgtagcgat	2100
agcggagtgt atactggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc	2160
atatgcggtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcacg aggcgctctt	2220
ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg gctgcggcga gcggtatcag	2280
ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca	2340
tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt	2400
tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc	2460
gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcgctgcgt	2520
ctcctgttcc gacctgccc cttaccggat acctgtccgc ttttctccct tcgggaagcg	2580
tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca	2640
agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccagccg ctgcgctta tccggttaact	2700
atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta	2760
acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta	2820
actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct	2880
tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcgggtggtt	2940
tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga	3000
tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaatc acgttaaggg attttggtca	3060
tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga agttttaaat	3120
caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg	3180
cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt	3240
agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag	3300
accacgctc accggtcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc	3360
gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag	3420
ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctgcaggca	3480
tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa	3540
ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga	3600
tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat gggtatggca gcactgcata	3660

ES 2 663 445 T3

attctcttac	tgcatgcc	tccgtaagat	gcttttctgt	gactggtgag	tactcaacca	3720
agtcattctg	agaatagtgt	atgcggcgac	cgagttgctc	ttgcccgcg	tcaacacggg	3780
ataataccgc	gccacatagc	agaacttta	aagtgtcat	cattggaaaa	cgttcttcgg	3840
ggcgaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	ttcgatgtaa	cccactcgtg	3900
cacccaactg	atcttcagca	tcttttactt	tcaccagcgt	ttctgggtga	gcaaaaacag	3960
gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	aagggaataa	ggcgacacg	gaaatgttga	atactcatac	4020
tcttcctttt	tcaatattat	tgaagcattt	atcaggggta	ttgtctcatg	agcggataca	4080
tatttgaatg	tatttagaaa	aataacaaa	taggggttcc	gcgcacattt	ccccgaaaag	4140
tgccacctga	cgtctaagaa	accattatta	tcatgacatt	aacctataaa	aataggcgta	4200
tcacgaggcc	ctttcgtctt	caagaattct	gaaccagtcc	taaaacgagt	aaataggacc	4260
ggcaattctt	caagcaataa	acaggaatac	caattattaa	aagataactt	agtcagatcg	4320
tacaataaag	ctttgaagaa	aatgcgctt	tattcaatct	ttgctataaa	aatggccca	4380
aaatctcaca	ttggaagaca	tttgatgacc	tcatttcttt	caatgaaggg	cctaacggag	4440
ttgactaatg	ttgtgggaaa	ttggagcgat	aagcgtgctt	ctgccgtggc	caggacaacg	4500
tatactcatc	agataacagc	aatacctgat	cactacttcg	cactagtttc	tcggtactat	4560
gcatatgatc	caatatcaaa	ggaaatgata	gcattgaagg	atgagactaa	tccaattgag	4620
gagtggcagc	atatagaaca	gctaaagggt	agtgctgaag	gaagcatacg	ataccccgca	4680
tggaatggga	taatatcaca	ggagggtacta	gactaccttt	catcctacat	aaatagacgc	4740
atataagtac	gcatttaagc	ataaacacgc	actatgccgt	tcttctcatg	tatatatata	4800
tacaggcaac	acgcagatat	aggtgcgacg	tgaacagtga	gctgtatgtg	cgcagctcgc	4860
gttgcatttt	cggaaagcgt	cgttttcgga	aacgctttga	agttcctatt	ccgaagttcc	4920
tattctctag	aaagtatagg	aacttcagag	cgcttttgaa	aaccaaagc	gctctgaaga	4980
cgcactttca	aaaaaccaa	aacgcaccgg	actgtaacga	gctactaaaa	tattgcgaat	5040
accgcttcca	caaacattgc	tcaaaagtat	ctctttgcta	tatatctctg	tgctatatcc	5100
ctatataaacc	tacccatcca	cctttcgtc	cttgaacttg	catctaaact	cgacctctac	5160
atTTTTtatg	tttatctcta	gtattactct	ttagacaaaa	aaattgtagt	aagaactatt	5220
catagagtga	atcgaaaaca	atacgaaaat	gtaaacattt	cctatacgta	gtatatagag	5280
acaaaataga	agaaaccggt	cataattttc	tgaccaatga	agaatcatca	acgctatcac	5340
tttctgttca	caaagtatgc	gcaatccaca	tcggtataga	atataatcgg	ggatgccttt	5400
atcttgaaaa	aatgcacccg	cagcttcgct	agtaatcagt	aaacgcggga	agtggagtca	5460
ggcttttttt	atggaagaga	aaatagacac	caaagtagcc	ttcttctaac	cttaacggac	5520
ctacagtgca	aaaagtatat	aagagactgc	attatagagc	gcacaaagga	gaaaaaaagt	5580

ES 2 663 445 T3

aatctaagat gctttgttag aaaaatagcg ctctcgggat gcatttttgt agaacaaaaa	5640
agaagtatag attctttgtt ggtaaaatag cgctctcgcg ttgcatttct gttctgtaaa	5700
aatgcagctc agattctttg tttgaaaaat tagcgctctc gcgttgcaatt tttgttttac	5760
aaaaatgaag cacagattct tcgttggtaa aatagcgctt tcgcgttgca tttctgttct	5820
gtaaaaatgc agctcagatt ctttgtttga aaaattagcg ctctcgcgtt gcatttttgt	5880
tctacaaaat gaagcacaga tgcttcgtta acaaagatat gctattgaag tgcaagatgg	5940
aaacgcagaa aatgaaccgg ggatgcgacg tgcaagatta cctatgcaat agatgcaata	6000
gtttctccag gaaccgaaat acatacattg tcttccgtaa agcgctagac tatatattat	6060
tatacagggt caaatatact atctgtttca gggaaaactc ccaggttcgg atgttcaaaa	6120
ttcaatgatg ggtaacaagt acgatcgtaa atctgtaaaa cagtttgcg gatattaggc	6180
tgtatctcct caaagcgtat tcgaatatca ttgagaagct gcagcgtcac atcggataat	6240
aatgatggca gccattgtag aagtgccttt tgcatctcta gtctcttctt cggctctagct	6300
agttttacta catcgogaag atagaatctt agatcacact gcctttgctg agctggatca	6360
atagagtaac aaaagagtgg taaggcctcg ttaaaggaca aggacctgag cgggaagtga	6420
tcgtacagta gacggagtat actagtatag tctatagtcc gtggaattct catgtttgac	6480
agcttatcat cgataagctt ttcaattcaa ttcatcattt tttttttatt cttttttttg	6540
atttcggttt ctttgaaatt tttttgattc ggtaatctcc gaacagaagg aagaacgaag	6600
gaaggagcac agacttagat tggatatatat acgcatatgt agtgttgaag aaacatgaaa	6660
ttgccagta ttcttaaccc aactgcacag aacaaaaacc tgcaggaaac gaagataaat	6720
catgtcgaaa gctacatata aggaacgtgc tgctactcat cctagtcttg ttgctgccaa	6780
gctatttaat atcatgcacg aaaagcaaac aaacttgtgt gcttcattgg atgttcgtac	6840
caccaaggaa ttactggagt tagttgaagc attaggtccc aaaatttggt tactaaaaac	6900
acatgtggat atcttgactg atttttccat ggagggcaca gtttaagccgc taaaggcatt	6960
atccgccaag tacaattttt tactcttcga agacagaaaa tttgctgaca ttggtataac	7020
agtcaaattg cagtactctg cgggtgtata cagaatagca gaatgggcag acattacgaa	7080
tgcacacggt gtggtgggcc caggtattgt tagcggtttg aagcaggcgg cagaagaagt	7140
aacaaaggaa cctagaggcc ttttgatggt agcagaattg tcatgcaagg gctccctatc	7200
tactggagaa tatactaagg gtactgttga cattgcgaag agcgacaaag attttgttat	7260
cggctttatt gctcaaagag acatgggtgg aagagatgaa ggttacgatt ggttgattat	7320
gacacccggt gtgggttttag atgacaaggg agacgcattg ggtcaacagt atagaaccgt	7380
ggatgatgtg gtctctacag gatctgacat tattattggt ggaagaggac tatttgcaaa	7440

ES 2 663 445 T3

gggaagggat gctaaggtag aggggtgaacg ttacagaaaa gcaggctggg aagcatatatt	7500
gagaagatgc ggccagcaaa actaaaaaac tgtattataa gtaaatgcat gtatactaaa	7560
ctcacaaatt agagcttcaa tttaattata tcagttatta cccgggaatc tcggtcgtaa	7620
tgaaaggaaa agcgcaacgg acgggcgagt agattgcgca acatgcgagc atgatccaga	7680
gatttctgaa gcagcaaaaag gatgttccat gtacatgacg cgcggttgc ggtaaatgt	7740
tggcaaattt tccggcgtag cccaaaacgc gctgtcgtca agtcgttaag ggctgcct	7800
tcatcatccg atctggagtc aaaatgtcct cacgtaaaga gcttgccaat gctattcgtg	7860
cgctgagcat ggacgcagta cagaaagcca aatccggtca cccgggtgcc cctatgggta	7920
tggctgacat tgccgaagtc ctgtggcgtg atttcctgaa acacaaccgc cagaatccgt	7980
cctgggctga ccgtgaccgc ttcgtgctgt ccaacggcca cggctccatg ctgatctaca	8040
gcctgctgca cctcacgggt tacgatctgc cgatggaaga actgaaaaac ttccgtcagc	8100
tgcactctaa aactccgggc caccgggaag taggttatac cgctgggtg gaaaccacca	8160
ccggtccgct gggtcagggg attgccaacg cagtcggtat ggcgattgca gaaaaaacgc	8220
tggcggcgca gtttaaccgt ccaggtcacg acattgtcga ccactacacc tacgccttca	8280
tgggcgacgg ctgcatgatg gaaggcatct cccacgaagt ttgctctctg gcgggtacgc	8340
tgaagctggg taaactgatt gcgttctacg atgacaacgg tatctcaatc gatggtcacg	8400
ttgaaggctg gttcactgac gacaccgcaa tgcgtttcga agcttacggc tggcacgtta	8460
ttcgcgacat cgacgggtcat gacggggcat ccatcaaacg cgcagtagaa gaagcgcgcg	8520
cagtgactga caaacgtcc ctgctgatgt gcaaaacat catcggtttc ggttccccga	8580
acaaagccgg taccacgacg tcccacgggt cgccgctggg cgacgctgaa attgcctga	8640
cccgcaaca gctgggctgg aaatacgcgc cgttcgaaat cccgtctgaa atctatgctc	8700
agtgggatgc gaaagaagca ggccaggcga aagaatctgc atggaatgag aagtttgcg	8760
cttacgcgaa agcttatccg caggaagcgg ctgaatttac ccgccgtatg aaaggcgaaa	8820
tgccgtctga cttcgacgcc aaagcgaaag agtttatcgc taaactgcag gctaataccg	8880
cgaaaatcgc cagccgtaaa gcgtcgcaga atgctatcga agcgttcggc ccgctgttgc	8940
ctgaattcct cggcggctct gctgacctg caccgtctaa cctgacctg tggctctggt	9000
ctaaagcaat caacgaagat gctgcaggta actacatcca ctacggtgtt cgcgagttcg	9060
gtatgaccgc gattgctaac ggtatctccc tgcacggtgg tttcctgccg tacacctcca	9120
ccttcctgat gttcgtggaa tacgcacgta acgccgtacg tatggctgcg ctgatgaaac	9180
agcgtcaggt gatggtttac acccacgact ccatcggtct gggcggaagat ggcccgactc	9240
accagccggt tgagcaggtc gcttctctgc gcgtgacccc gaacatgtct acatggcgctc	9300
cgtgtgacca ggttgaatcc gcggtcgct ggaaatacgg cgttgagcgt caggacggcc	9360

ES 2 663 445 T3

cgactgcgct	tatcctctcc	cgtcagaacc	tggcgcagca	ggaacgaact	gaagagcaac	9420
tggcaaacat	cgcgcgcggt	ggttatgtgc	tgaaagactg	cgccggtcag	ccggaactga	9480
ttttcatcgc	taccggttca	gaagttgaac	tggctgttgc	tgccctacgaa	aaactgactg	9540
ccgaaggcgt	gaaagcgcg	gtggtgtcca	tgccgtctac	cgacgcattt	gacaagcagg	9600
atgctgctta	ccgtgaatcc	gtactgccga	aagcggttac	tgacgcggtt	gctgtagaag	9660
cgggtattgc	tgactactgg	tacaagtatg	ttggcctgaa	cgggtgctatc	gtcggtatga	9720
ccaccttcgg	tgaatctgct	ccggcagagc	tgctgtttga	agagtccggc	ttcactgttg	9780
ataacgttgt	tgcgaaagca	aaagaactgc	tgtaattagc	atctcgggta	aaaaggtcgc	9840
ttcggcgacc	ttttttatta	ccttgatatg	tccgtttgcg	gacaagcaat	agataaagcg	9900
tggtgtagat	cacaaatatt	tatatgcaat	aaatatcaat	tatgtaatat	gcatcacgat	9960
atgctgtattg	acatttggtg	ttataactat	aactcaatgt	tatataagaa	attaa	10015

5
 <210> 31
 <211> 9065
 <212> ADN
 <213> Plásmido pCP54;

10	<400> 31	
	acatgaatgg	tcttcggttt ccggtgtttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgccc 60
	tgcaccatta	tggtccggat ctgcatcgca ggatgctgct ggctaccctg tggaacacct 120
	acatctgtat	taacgaagcg ctggcattga ccctgagtga tttttctctg gtcccgcgcg 180
	atccataccg	ccagttgttt accctcacia cgttccagta accgggcatg ttcacatcatca 240
	gtaaccgcta	tcgtgagcat cctctctcgt ttcacggta tcattacccc catgaacaga 300
	aattccccct	tacacggagg catcaagtga ccaaacagga aaaaaccgcc cttaacatgg 360
	cccgccttat	cagaagccag acattaacgc ttctggagaa actcaacgag ctggacgcgg 420
	atgaacaggc	agacatctgt gaatcgcttc acgaccacgc tgatgagctt taccgcagct 480
	gcctcgcgcg	tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg 540
	tcacagcttg	tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg 600
	gtgttgggcg	gtgtcggggc gcagccatga ccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata 660
	ctggcttaac	tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcgggtgtga 720
	aataccgcac	agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg cttcctcgct 780
	cactgactcg	ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc 840
	ggtaatacgg	ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 900
	ccagcaaaag	gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 960
	ccccctgac	gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 1020

ES 2 663 445 T3

actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac	1080
cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca	1140
tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg taggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt	1200
gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc	1260
caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag	1320
agcgaggatg gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac	1380
tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt	1440
tggtagctct ttagccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa	1500
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg	1560
gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa	1620
aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat	1680
atatgagtaa acttggctctg agtggcggtt ttcattggctt gttatgactg tttttttggg	1740
gtacagtcta tgcctcgggc atccaagcag caagcgcgtt acgccgtggg tccgatgtttg	1800
atgttatgga gcagcaacga tgttacgcag cagggcagtc gccctaaaac aaagttaaac	1860
atcatgaggg aagcgggtgat cgccgaagta tcgactcaac tatcagaggt agttggcgtc	1920
atcgagcgcc atctcgaacc gacgttgctg gccgtacatt tgtacggctc cgcagtggat	1980
ggcggcctga agccacacag tgatattgat ttgctggta cggtgaccgt aaggcttgat	2040
gaaacaacgc ggcgagcttt gatcaacgac cttttggaaa cttcggcttc ccctggagag	2100
agcgagattc tccgcgctgt agaagtcacc attgttgtgc acgacgacat cattccgtgg	2160
cgttatccag ctaagcgcga actgcaattt ggagaatggc agcgcaatga cattcttgca	2220
ggtatcttcg agccagccac gatcgacatt gatctggcta tcttgctgac aaaagcaaga	2280
gaacatagcg ttgccttggg aggtccagcg gcggaggaac tctttgatcc ggttcctgaa	2340
caggatctat ttgaggcgct aaatgaaacc ttaacgctat ggaactcgcc gcccgactgg	2400
gctggcgatg agcgaaatgt agtgcttacg ttgtcccga tttggtacag cgcagtaacc	2460
ggcaaaatcg cgccgaagga tgtcgctgcc gactgggcaa tggagcgctt gccggcccag	2520
tatcagcccg tcatacttga agctagacag gcttatcttg gacaagaaga agatcgcttg	2580
gcctcgcgcg cagatcagtt ggaagaattt gtccactacg tgaaaggcga gatcaccaag	2640
gtagtcggca aataatgtct aacaattcgt tcaagccgac gccgcttcgc ggcgcggctt	2700
aactcaagcg ttagatgcac taagcacata attgctcaca gccaaactat cagaattctg	2760
aaccagtcct aaaacgagta aataggaccg gcaattcttc aagcaataaa caggaatacc	2820
aattattaaa agataactta gtcagatcgt acaataaagc tttgaagaaa aatgcgcctt	2880

ES 2 663 445 T3

attcaatctt tgctataaaa aatggcccaa aatctcacat tggaagacat ttgatgacct	2940
catttctttc aatgaagggc ctaacggagt tgactaatgt tgtgggaaat tggagcgata	3000
agcgtgcttc tgccgtggcc aggacaacgt atactcatca gataacagca atacctgatc	3060
actacttcgc actagtttct cggtactatg catatgatcc aatatcaaag gaaatgatag	3120
cattgaagga tgagactaat ccaattgagg agtggcagca tatagaacag ctaaagggt	3180
gtgctgaagg aagcatacga taccocgcac ggaatgggat aatatcacag gaggtactag	3240
actacctttc atcctacata aatagacgca tataagtacg catttaagca taaacacgca	3300
ctatgccgtt cttctcatgt atatatatat acaggcaaca cgcagatata ggtgcgacgt	3360
gaacagttag ctgtatgtgc gcagctcgcg ttgcattttc ggaagcgctc gttttcgaa	3420
acgctttgaa gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga acttcagagc	3480
gcttttgaaa accaaaagcg ctctgaagac gcactttcaa aaaacaaaa acgcaccgga	3540
ctgtaacgag ctactaaaat attgcgaata ccgcttcac aaacattgct caaaagtatc	3600
tctttgctat atatctctgt gctatatccc tatataacct acccatccac ctttcgctcc	3660
ttgaacttgc atctaaactc gacctctaca ttttttatgt ttatctctag tattactctt	3720
tagacaaaaa aattgtagta agaactattc atagagttaa tcgaaaacaa tacgaaaatg	3780
taaacatttc ctatacgtag tatatagaga caaatagaa gaaaccgttc ataattttct	3840
gaccaatgaa gaatcatcaa cgctatcact ttctgttcac aaagtatgcg caatccacat	3900
cggtatagaa tataatcggg gatgccttta tcttgaaaa atgcacccgc agcttcgcta	3960
gtaatcagta aacgcgggaa gtggagtcag gcttttttta tggaagagaa aatagacacc	4020
aaagttagcct tcttctaacc ttaacggacc tacagtgcac aaagttatca agagactgca	4080
ttatagagcg cacaaaggag aaaaaagta atctaagatg ctttggtaga aaaatagcgc	4140
tctcgggatg catttttgta gaacaaaaa gaagtataga ttctttgttg gtaaaatagc	4200
gctctcgctg tgcatttctg ttctgtaaaa atgcagctca gattctttgt ttgaaaaatt	4260
agcgtctcgc cggtgcatth ttgttttaca aaaatgaagc acagattctt cggttggtaaa	4320
atagcgctth cgcggtgcat ttctgttctg taaaaatgca gctcagattc tttgtttgaa	4380
aaattagcgc tctcggttg catttttggt ctacaaaatg aagcacagat gcttcgttaa	4440
caaagatatg ctattgaagt gcaagatgga aacgcagaaa atgaaccggg gatgcgacgt	4500
gcaagattac ctatgcaata gatgcaatag tttctccagg aaccgaaata catacattgt	4560
cttccgtaaa gcgctagact atatattatt atacaggttc aaatatacta tctgtttcag	4620
ggaaaactcc caggttcgga tgttcaaaat tcaatgatgg gtaacaagta cgatcgtaaa	4680
tctgtaaaac agtttgcggt atattaggct gtatctcttc aaagcgtatt cgaatatcat	4740
tgagaagctg cagcgtcaca tcggataata atgatggcag ccattgtaga agtgcctttt	4800

ES 2 663 445 T3

gcattttctag tctctttctc ggtctagcta gttttactac atcgcgaaga tagaatctta 4860
gatcacactg cctttgctga gctggatcaa tagagtaaca aaagagtggg aaggcctcgt 4920
taaaggacaa ggacctgagc ggaagtgtat cgtacagtag acggagtata ctagtatagt 4980
ctatagtccg tggaaattctc atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt tcaattcaat 5040
tcatcatttt ttttttattc ttttttttga tttcggtttc tttgaaattt ttttgattcg 5100
gtaatctccg aacagaagga agaacgaagg aaggagcaca gacttagatt ggtatatata 5160
cgcatatgta gtgttgaaaga aacatgaaat tgcccagtat tcttaaccca actgcacaga 5220
acaaaaacct gcaggaaacg aagataaatc atgtcgaaag ctacatatata ggaacgtgct 5280
gctactcatc ctagtcctgt tgctgccaaag ctatttaata tcatgcacga aaagcaaaca 5340
aacttggtgtg cttcattgga tgttcgtacc accaaggaaat tactggagtt agttgaagca 5400
ttaggtccca aaatttgttt actaaaaaca catgtggata tcttgactga tttttccatg 5460
gagggcagag ttaagccgct aaaggcatta tccgccaaagt acaatttttt actcttcgaa 5520
gacagaaaat ttgctgacat tggtaataca gtcaaattgc agtactctgc ggggtgatac 5580
agaatagcag aatgggcaga cattacgaat gcacacggtg tgggtgggcc aggtattggt 5640
agcggtttga agcaggcggc agaagaagta acaaaggaac ctagaggcct tttgatgtta 5700
gcagaattgt catgcaaggg ctccctatct actggagaat atactaaggg tactgttgac 5760
attgcaaga gcgacaaaga ttttgttatc ggctttattg ctcaaagaga catgggtgga 5820
agagatgaag gttacgattg gttgattatg acaccggtg tgggtttaga tgacaaggga 5880
gacgcattgg gtcaacagta tagaaccgtg gatgatgtgg tctctacagg atctgacatt 5940
attattgttg gaagaggact atttgcaaag ggaagggatg ctaaggtaga ggggtgaacgt 6000
tacagaaaag caggctgga agcatatttg agaagatgcg gccagcaaaa ctaaaaaact 6060
gtattataag taaatgcatg tatactaaac tcacaaatta gagcttcaat ttaattatat 6120
cagttattac ccgggaatct cggtcgtaat gacttgaaat aattaacaaa caaaggagtt 6180
acagttagaa attgtaggag agatctcgtt tttcgcgaca atctggcgtt tttcttgcta 6240
attccaggat taatccgttc atagtgtaaa accccgttta cacattctga cggaagatat 6300
agattggaag tattgcattc actaagataa gtatggcaac actggaacag acatgaatta 6360
tcagaacgac gatttacgca tcaaagaaat caaagagtta cttcctcctg tcgcattgct 6420
ggaaaaattc cccgctactg aaaatgccgc gaatacgggt gcccatgcc gaaaagcgat 6480
ccataagatc ctgaaaggta atgatgatcg cctgttggtt gtgattggcc catgctcaat 6540
tcatgatcct gtgcggcga aagagtatgc cactcgcttg ctggcgctgc gtgaagagct 6600
gaaagatgag ctggaaatcg taatgcgcgt ctattttgaa aagccgcgta ccacggtggg 6660

ES 2 663 445 T3

ctggaaaggg	ctgattaacg	atccgcataat	ggataatagc	ttccagatca	acgacggtct	6720
gcgtatagcc	cgtaaattgc	tgcttgatat	taacgacagc	ggtctgccag	cggcaggtga	6780
gtttctcgat	atgatcacc	cacaatatct	cgctgacctg	atgagctggg	gcgcaattgg	6840
cgcacgtacc	accgaatcgc	aggtgcaccg	cgaactggca	tcagggcttt	cttgtccggt	6900
cggcttcaaa	aatggcaccg	acggtacgat	taaagtggct	atcgatgcca	ttaatgccgc	6960
cggcgcgcg	caactgcttc	tgctcgtaac	gaaatggggg	cattcggcga	ttgtgaatac	7020
cagcggtaac	ggcgattgcc	atatcattct	gcgcggcggg	aaagagccta	actacagcgc	7080
gaagcacgtt	gctgaagtga	aagaagggct	gaacaaagca	ggcctgccag	cacaggtgat	7140
gatcgatttc	agccatgcta	actcgtccaa	acaattcaaa	aagcagatgg	atgtttgtgc	7200
tgacgtttgc	cagcagattg	ccggtggcga	aaaggccatt	attggcgtga	tggtggaaag	7260
ccatctggtg	gaaggcaatc	agagcctcga	gagcggggag	ccgctggcct	acggtaaagag	7320
catcacccgat	gcctgcatcg	gctgggaaga	taccgatgct	ctgttacgtc	aactggcgaa	7380
tgacgttaaa	gcgcgtcgcg	ggtaagggtt	aattgtcgga	tgccgcgtca	gagtggcgta	7440
tccgatgaat	caccacaggc	ctgataagtc	gcgcagcgtc	gcatcaggca	atgtgctcca	7500
ttgttagcaa	caaaaaagcc	gactcacttg	cagtcggcct	tctcatttta	aacgaatgac	7560
gtttacttcg	ctttaccctg	gtttgcaacc	gccgctgctt	tcgctctcga	ggctattgac	7620
gacagctatg	gttactgtc	caccaaccaa	aactgtgtc	agtaccgcca	atatttctcc	7680
cttgaggggt	acaaagaggt	gtccctagaa	gagatccacg	ctgtgtaaaa	attttataaa	7740
aaggtattga	ctttccctac	aggggtgtga	ataatttaat	tacaggcggg	ggcaaccccg	7800
cctgttctag	aggaggagga	atcgccatgg	agaggattgt	cgttactctc	ggggaacgta	7860
gttaccat	taccatcgca	tctggtttgt	ttaatgaacc	agcttcattc	ttaccgctga	7920
aatcgggcga	gcaggtcatg	ttggtcacca	acgaaaccct	ggctcctctg	tatctcgata	7980
aggtccgcgg	cgtacttgaa	caggcgggtg	ttaacgtcga	tagcgttatc	ctccctgacg	8040
gcgagcagta	taaaagcctg	gctgtactcg	ataccgtctt	tacggcggtg	ttacaaaagc	8100
cgcacgtctg	cgatactacg	ctggtggcgc	ttggcggcgg	cgtagtgggc	gatctgaccg	8160
gcttcgcggc	ggcgagttat	cagcgcgggt	ttcgtttcat	tcaagtcccg	acgacgttac	8220
tgctgcaggt	cgattcctcc	gttgggcgga	aaactgcggg	caaccatccc	ctcggtaaaa	8280
acatgattgg	cgcgttctac	cagcctgctt	cagtgggtgg	ggatctcgac	tgtctgaaaa	8340
cgttccccc	gcgtgagtta	gcgtcggggc	tggcagaagt	catcaaatac	ggcattattc	8400
ttgacgggtg	gtttttcaac	tggtcggaag	agaatctgga	tgcggtgttg	cgtctggacg	8460
gtccggcaat	ggcgactgtg	attcgccgtt	gttgtgaact	gaaggcagaa	gttgtcgccg	8520
ccgacgagcg	cgaacccggg	ttacgtgctt	tactgaatct	gggacacacc	tttggtcatg	8580

ES 2 663 445 T3

ccattgaagc tgaatgggg tatggcaatt ggttacatgg tgaagcggtc gctgcgggta 8640
 tggatgatggc ggccgggacg tcggaacgtc tcgggcagtt tagttctgcc gaaacgcagc 8700
 gtattataac cctgctcacg cgggctgggt taccgggtcaa tgggccgcgc gaaatgtccg 8760
 cgcagggcgt tttaccgcat atgctgcgtg acaagaaagt ccttgccggga gagatgcgct 8820
 taattcttcc gttggcaatt ggtaagagtg aagttcgcag cggcgtttcg cacgagcttg 8880
 ttcttaacgc cattgccgat tgtcaatcag cgtaatcatc gttcatgcct gatgccgcta 8940
 tgtaggccgg ataaggcgtt cacgccgcat ccggcaaccg atgcctgatg cgacgcggtc 9000
 gcgtcttatac aggcctacag gtcgatgccg atatgtacat cgtattcggc aattaatata 9060
 tagca 9065

5 <210> 32
 <211> 11475
 <212> ADN
 <213> Plásmido pCP55;

10 <400> 32
 acatgaatgg tcttcggttt ccgtgtttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgccc 60
 tgcaccatta tgttccggat ctgcatcgca ggatgctgct ggctaccctg tggaacacct 120
 acatctgtat taacgaagcg ctggcattga ccctgagtga tttttctctg gtcccgccgc 180
 atccataccg ccagttgttt accctcaciaa cgttccagta accgggcatg ttcacatca 240
 gtaacccgta tcgtgagcat cctctctcgt ttcacggtga tcattacccc catgaacaga 300
 aattccccct tacacggagg catcaagtga ccaaacagga aaaaaccgcc cttaacatgg 360
 cccgctttat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa actcaacgag ctggacgcgg 420
 atgaacaggc agacatctgt gaatcgcttc acgaccacgc tgatgagctt taccgcagct 480
 gcctcgcgcg tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg 540
 tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg 600
 gtgttgccgg gtgtcggggc gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata 660
 ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga 720
 aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg cttcctcgct 780
 cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcgggt gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc 840
 ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 900
 ccagcaaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 960
 cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 1020
 actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 1080
 cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca 1140

ES 2 663 445 T3

tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt	1200
gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc	1260
caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggttaaca ggattagcag	1320
agcgaggtat gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac	1380
tagaaggaca gtattttgga tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt	1440
tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa	1500
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg	1560
gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa	1620
aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat	1680
atatgagtaa acttgggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc	1740
gatctgtcta tttcgttcat ccatagtgtc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat	1800
acgggagggc ttaccatctg gcccagtgct tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc	1860
ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggtcc	1920
tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag	1980
ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct gcaggcatcg tgggtgtcacg	2040
ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gaggttacatg	2100
atcccccatg ttgtgcaaaa aagcgggttag ctcttcggt cctccgatcg ttgtcagaag	2160
taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt	2220
catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga	2280
atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctc acacgggata ataccgcgcc	2340
acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc	2400
aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc	2460
ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc	2520
cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca	2580
atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat	2640
ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt	2700
ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaaat aggcgtatca cgaggccctt	2760
tcgtcttcaa gaattctgaa ccagtcctaa aacgagtaaa taggaccggc aattcttcaa	2820
gcaataaaca ggaataccaa ttattaaaag ataacttagt cagatcgtag aataaagctt	2880
tgaagaaaaa tgcgccttat tcaatctttg ctataaaaaa tggcccaaaa tctcacattg	2940
gaagacattt gatgacctca tttctttcaa tgaagggcct aacggagttg actaatgttg	3000

ES 2 663 445 T3

tgggaaattg gagcgataag cgtgcttctg ccgtggccag gacaacgtat actcatcaga	3060
taacagcaat acctgatcac tacttgcac tagtttctcg gtactatgca tatgatccaa	3120
tatcaaagga aatgatagca ttgaaggatg agactaatcc aattgaggag tggcagcata	3180
tagaacagct aaagggtagt gctgaaggaa gcatacgata ccccgcatgg aatgggataa	3240
tatcacagga ggtactagac tacctttcat cctacataaa tagacgcata taagtacgca	3300
tttaagcata aacacgcact atgccgttct tctcatgtat atatatatac aggcaacacg	3360
cagatatagg tgcgacgtga acagtgagct gtatgtgcgc agctcgcgtt gcattttcgg	3420
aagcgctcgt tttcggaac gctttgaagt tcctattccg aagttcctat tctctagaaa	3480
gtataggaac ttcagagcgc ttttgaaaac caaaagcgt ctgaagacgc actttcaaaa	3540
aaccaaaaaac gcaccggact gtaacgagct actaaaatat tgcgaaatacc gcttccacaa	3600
acattgctca aaagtatctc ttgctatat atctctgtgc tataatcccta tataacctac	3660
ccatccacct ttcgctcctt gaacttgcct cttaaactcga cctctacatt ttttatgttt	3720
atctctagta ttactcttta gacaaaaaaa ttgtagtaag aactattcat agagtgaatc	3780
gaaaacaata cgaaaatgta aacatttcct atacgtagta tatagagaca aaatagaaga	3840
aaccgttcat aattttctga ccaatgaaga atcatcaacg ctatcacttt ctgttcacaa	3900
agtatgcgca atccacatcg gtatagaata taatcgggga tgcctttatc ttgaaaaaat	3960
gcacccgcag cttcgctagt aatcagtaaa cgcgggaagt ggagtcaggc tttttttatg	4020
gaagagaaaa tagacaccaa agtagccttc ttctaacctt aacggaccta cagtgcacaa	4080
agttatcaag agactgcatt atagagcgca caaaggagaa aaaaagtaat ctaagatgct	4140
ttgttagaaa aatagcgctc tcgggatgca tttttgtaga acaaaaaaga agtatagatt	4200
ctttgttggg aaaaatagcg tctcgcgttg catctctgtt ctgtaaaaat gcagctcaga	4260
ttctttgttt gaaaaattag cgctctcgcg ttgcattttt gttttacaaa aatgaagcac	4320
agattctctg ttggtaaaat agcgctttcg cgttgcattt ctgttctgta aaaatgcagc	4380
tcagattctt tgtttgaaaa attagcgctc tcgcgttgca tttttgttct acaaaatgaa	4440
gcacagatgc ttcgttaaca aagatatgct attgaagtgc aagatggaaa cgcagaaaaat	4500
gaaccgggga tgcgacgtgc aagattacct atgcaataga tgcaatagtt tctccaggaa	4560
ccgaaataca tacattgtct tccgtaaagc gctagactat atattattat acaggttcaa	4620
atatactatc tgtttcaggg aaaactccca gggtcggatg ttcaaaattc aatgatgggt	4680
aacaagtagc atcgtaaatc tgtaaaacag tttgtcggat attaggctgt atctcctcaa	4740
agcgtattcg aatatcattg agaagctgca gcgtcacatc ggataataat gatggcagcc	4800
attgtagaag tgccttttgc atttctagtc tctttctcgg tctagctagt ttactacat	4860
cgcgaagata gaatcttaga tcacactgcc tttgctgagc tggatcaata gagtaacaaa	4920

ES 2 663 445 T3

agagtggtaa ggcctcgtta aaggacaagg acctgagcgg aagtgtatcg tacagtagac	4980
ggagtatact agtatagtct atagtccgtg gaattctcat gtttgacagc ttatcatcga	5040
taagcttttc aattcaattc atcatttttt ttttattctt ttttttgatt tcggtttctt	5100
tgaaattttt ttgattcggg aatctccgaa cagaaggaag aacgaaggaa ggagcacaga	5160
cttagattgg tatatatacg catatgtagt gttgaagaaa catgaaattg cccagtattc	5220
ttaaccaaac tgcacagaac aaaaacctgc aggaacgaa gataaatcat gtcgaaagct	5280
acataataagg aacgtgctgc tactcatcct agtcctgttg ctgccaagct atttaatatc	5340
atgcacgaaa agcaaacaaa cttgtgtgct tcattggatg ttcgtaccac caaggaatta	5400
ctggagttag ttgaagcatt aggtcccaaa atttgtttac taaaaacaca tgtggatatc	5460
ttgactgatt tttccatgga gggcacagtt aagccgctaa aggcattatc cgccaagtac	5520
aatttttttac tcttcgaaga cagaaaattt gctgacattg gtaatacagt caaattgcag	5580
tactctgcgg gtgtatacag aatagcagaa tgggcagaca ttacgaatgc acacggtgtg	5640
gtggggccag gtattgtag cggtttgaag caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct	5700
agaggccttt tgatgttagc agaattgtca tgcaagggct ccctatctac tggagaatat	5760
actaagggtta ctgttgacat tgcgaagagc gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct	5820
caaagagaca tgggtggaag agatgaagggt tacgattggg tgattatgac acccggtgtg	5880
ggtttagatg acaagggaga cgcattgggt caacagtata gaaccgtgga tgatgtggtc	5940
tctacaggat ctgacattat tattgttgga agaggactat ttgcaaaggg aagggatgct	6000
aaggtagagg gtgaacgtta cagaaaagca ggctgggaag catatttgag aagatgcggc	6060
cagcaaaaact aaaaaactgt attataagta aatgcatgta tactaaactc acaaattaga	6120
gcttcaattt aattatatca gttattaccg gggaatctcg gtcgtaatga aaggaaaagc	6180
gcaacggacg ggcgagtaga ttgcgcaaca tgcgagcatg atccagagat ttctgaagca	6240
gcaaaaggat gttccatgta catgacgcgc ggcttgcggt aaattgttg gaaattttcc	6300
ggcgtagccc aaaacgcgct gtcgtcaagt cgtaagggc gtgcccttca tcatccgatc	6360
tggagtcaaa atgtcctcac gtaaagagct tgccaatgct attcgtgcgc tgagcatgga	6420
cgcagtacag aaagccaaat ccggtcaccg gggtgccct atgggtatgg ctgacattgc	6480
cgaagtcccg tggcgtgatt tcctgaaaca caaccgcag aatccgtcct gggtgaccg	6540
tgaccgcttc gtgctgtcca acggccacgg ctccatgctg atctacagcc tgctgcacct	6600
caccggttac gatctgccga tggaagaact gaaaaacttc cgtcagctgc actctaaaac	6660
tccgggccac ccggaagtag gttataccgc tgggtgtgga accaccaccg gtccgctggg	6720
tcagggtatt gccaacgcag tcggtatggc gattgcagaa aaaacgctgg cggcgcagtt	6780

ES 2 663 445 T3

taaccgtcca	ggtcacgaca	ttgtcgacca	ctacacctac	gccttcatgg	gcgacggctg	6840
catgatggaa	ggcatctccc	acgaagtttg	ctctctggcg	ggtacgctga	agctgggtaa	6900
actgattgcg	ttctacgatg	acaacggtat	ctcaatcgat	ggtcacgttg	aaggctggtt	6960
cactgacgac	accgcaatgc	gtttcgaagc	ttacggctgg	cacgttattc	gcgacatcga	7020
cggtcatgac	gcggcatcca	tcaaacgcgc	agtagaagaa	gcgcgcgcag	tgactgacaa	7080
accgtccctg	ctgatgtgca	aaaccatcat	cggtttcggt	tccccgaaca	aagccggtac	7140
ccacgactcc	cacggtgcgc	cgctgggcga	cgctgaaatt	gccctgaccc	gcgaacagct	7200
gggctggaaa	tacgcgccgt	tcgaaatccc	gtctgaaatc	tatgctcagt	gggatgcgaa	7260
agaagcaggc	caggcgaaag	aatctgcatg	gaatgagaag	tttgccgctt	acgcgaaagc	7320
ttatccgcag	gaagcggctg	aatttaccgc	ccgtatgaaa	ggcgaaatgc	cgtctgactt	7380
cgacgccaaa	gcgaaagagt	ttatcgctaa	actgcaggct	aatccggcga	aaatcgccag	7440
ccgtaaagcg	tcgcagaatg	ctatcgaagc	gttcggcccg	ctgttgccctg	aattcctcgg	7500
cggctctgct	gacctggcac	cgtctaacct	gacctgtgg	tctggttcta	aagcaatcaa	7560
cgaagatgct	gcaggtaact	acatccacta	cgggtgtcgc	gagttcggta	tgaccgcgat	7620
tgctaacggt	atctccctgc	acgggtggtt	cctgccgtac	acctccacct	tcctgatgtt	7680
cgtggaatac	gcacgtaacg	ccgtacgtat	ggctgcgctg	atgaaacagc	gtcagggtgat	7740
ggtttacacc	cacgactcca	tcggctctgg	cgaagatggc	ccgactcacc	agccggttga	7800
gcaggctcgt	tctctgcgcg	tgaccccgaa	catgtctaca	tggcgtccgt	gtgaccaggt	7860
tgaatccgcg	gtcgcgtgga	aatacggcgt	tgagcgtcag	gacggcccga	ctgcgcttat	7920
cctctcccgt	cagaacctgg	cgcagcagga	acgaactgaa	gagcaactgg	caaacatcgc	7980
gcgcggtggt	tatgtgctga	aagactgcgc	cggtcagccg	gaactgattt	tcatcgctac	8040
cggttcagaa	gttgaactgg	ctgttgctgc	ctacgaaaaa	ctgactgccg	aaggcgtgaa	8100
agcgcgcggt	gtgtccatgc	cgtctaccga	cgcatttgac	aagcaggatg	ctgcttaccg	8160
tgaatccgta	ctgccgaaag	cggttactgc	acgcgttgct	gtagaagcgg	gtattgctga	8220
ctactggtac	aagtatgttg	gcctgaacgg	tgctatcgtc	ggtatgacca	ccttcggtga	8280
atctgctccg	gcagagctgc	tgtttgaaga	gttcggttc	actgttgata	acgttggtgc	8340
gaaagcaaaa	gaactgctgt	aattagcatt	tcgggtaaaa	aggtcgcttc	ggcgaccttt	8400
tttattacct	tgatatgtcc	gtttgcggac	aagcaataga	taaagcgtgt	tgtagatcac	8460
aaatatttat	atgcaataaa	tatcaattat	gtaatatgca	tcacgatatg	cgtattgaca	8520
tttggtgtta	taactataac	tcaatgttat	ataagaaatt	aacttgaaat	aattaacaaa	8580
caaaggagtt	acagttagaa	attgtaggag	agatctcggt	tttcgcgaca	atctggcggt	8640
tttcttgcta	attccaggat	taatccgttc	atagtgtaaa	accccgttta	cacattctga	8700

ES 2 663 445 T3

cggaagatat agattggaag tattgcattc actaagataa gtatggcaac actggaacag	8760
acatgaatta tcagaacgac gatttacgca tcaaagaaat caaagagtta cttcctcctg	8820
tcgcattgct ggaaaaattc cccgctactg aaaatgccgc gaatacgggt gcccatgccc	8880
gaaaagcgat ccataagatc ctgaaaggta atgatgatcg cctgttggtt gtgattggcc	8940
catgctcaat tcatgatcct gtcgcgcaa aagagtatgc cactcgcttg ctggcgctgc	9000
gtgaagagct gaaagatgag ctggaaatcg taatgcgcgt ctattttgaa aagccgcgta	9060
ccacggtggg ctggaaaggg ctgattaacg atccgcatat ggataatagc ttccagatca	9120
acgacggtct gcgtatagcc cgtaaattgc tgcttgatat taacgacagc ggtctgccag	9180
cggcaggtga gtttctcgat atgatcacc cacaatatct cgctgacctg atgagctggg	9240
gcgcaattgg cgcacgtacc accgaatcg aggtgcaccg cgaactggca tcagggcttt	9300
cttgctccgg cggcttcaaa aatggcaccg acggtacgat taaagtggct atcgatgcca	9360
ttaatgccgc cggtgcccg cactgcttcc tgtccgtaac gaaatggggg cattcggcga	9420
ttgtgaatac cagcggtaac ggcgattgcc atatcattct gcgcggcggg aaagagccta	9480
actacagcgc gaagcacggt gctgaagtga aagaagggt gaacaaagca ggcctgccag	9540
cacagtgat gatcgatttc agccatgcta actcgtccaa acaattcaaa aagcagatgg	9600
atgtttgtgc tgacgtttgc cagcagattg ccggtggcga aaaggccatt attggcgtga	9660
tggtggaaag ccatctggtg gaaggcaatc agagcctcga gagcggggag ccgctggcct	9720
acggtaaag catcacgat gcctgcatcg gctgggaaga taccgatgct ctgttacgtc	9780
aactggcgaa tgcagtaaaa gcgcgtcgcg ggtaagggtt aattgtcgga tgcgccgtca	9840
gagtggcgta tccgatgaat caccacaggc ctgataagtc gcgcagcgtc gcatcaggca	9900
atgtgctcca ttgttagcaa caaaaaagcc gactcacttg cagtcggctt tctcatttta	9960
aacgaatgac gtttacttcg ctttaccctg gtttgcaacc gccgctgctt tcgctctcga	10020
ggctattgac gacagctatg gttcactgtc caccaaccaa aactgtgctc agtaccgcca	10080
atatttctcc cttgaggggt acaaagaggt gtccctagaa gagatccacg ctgtgtaaaa	10140
attttacaaa aaggatttga ctttccctac aggggtgtgta ataatttaac tacaggcggg	10200
ggcaaccccg cctgttctag aggaggagga atcgccatgg agaggattgt cgttactctc	10260
ggggaacgta gttacccaat taccatcgca tctggtttgt ttaatgaacc agcttcattc	10320
ttaccgctga aatcgggcga gcaggatcatg ttggtcacca acgaaaccct ggctcctctg	10380
tatctcgata aggtccgcg cgtacttgaa caggcgggtg ttaacgtcga tagcgttatc	10440
ctccctgacg gcgagcagta taaaagcctg gctgtactcg ataccgtctt tacggcgttg	10500
ttacaaaagc cgcattggtc cgatactacg ctggtggcgc ttggcggcgg cgtagtgggc	10560

ES 2 663 445 T3

gatctgaccg gcttcgcggc ggcgagttat cagcgcggtg ttcgtttcat tcaagtcccg	10620
acgacgttac tgtcgcaggt cgattcctcc gttggcggca aaactgcggt caaccatccc	10680
ctcggtaaaa acatgattgg cgcgttctac cagcctgctt cagtgggtgt ggatctcgac	10740
tgtctgaaaa cgcttcccc gcgtgagtta gcgtcggggc tggcagaagt catcaaatac	10800
ggcattattc ttgacggtgc gtttttcaac tggctggaag agaactctga tgcgttggtg	10860
cgtctggacg gtccggcaat ggcgtactgt attcgcggtt gttgtgaact gaaggcagaa	10920
gttgtcgccg ccgacgagcg cgaaaccggg ttacgtgctt tactgaatct gggacacacc	10980
tttggcatg ccattgaagc tgaaatgggg tatggcaatt ggttacatgg tgaagcggtc	11040
gctgcgggta tggatgatgg ggcgcggacg tcggaacgtc tcgggcagtt tagttctgcc	11100
gaaacgcagc gtattataac cctgctcacg cgggctgggt taccgggtcaa tgggccgcgc	11160
gaaatgtccg cgcaggcgta tttaccgcat atgctgcgtg acaagaaagt ccttgcggga	11220
gagatgcgct taattcttcc gttggcaatt ggtaagagtg aagttcgag cggcgtttcg	11280
cacgagcttg ttcttaacgc cattgccgat tgtcaatcag cgtaatcatc gttcatgcct	11340
gatgccgcta tgtaggccgg ataaggcgtt caccgcccat ccggcaaccg atgcctgatg	11400
cgacgcggtc gcgtcttacc aggcctacag gtcgatgccg atatgtacat cgtattcggc	11460
aattaataca tagca	11475

5 <210> 33
 <211> 7769
 <212> ADN
 <213> Plásmido pYEP24;

10 <400> 33

gaattctgaa ccagtcctaa aacgagtaaa taggaccggc aattcttcaa gcaataaaca	60
ggaataccaa ttattaaaag ataacttagt cagatcgtag aataaagctt tgaagaaaa	120
tgcgccttat tcaatctttg ctataaaaaa tggcccaaaa tctcacattg gaagacattt	180
gatgacctca tttctttcaa tgaagggcct aacggagttg actaatgttg tgggaaattg	240
gagcgataag cgtgcttctg ccgtggccag gacaacgtat actcatcaga taacagcaat	300
acctgatcac tacttcgcac tagtttctcg gtactatgca tatgatcaa tatcaaagga	360
aatgatagca ttgaaggatg agactaatcc aattgaggag tggcagcata tagaacagct	420
aaaggtagt gctgaaggaa gcatacgata ccccgcatgg aatgggataa tatcacagga	480
ggtactagac tacctttcat cctacataaa tagacgcata taagtacgca ttttaagcata	540
aacacgcact atgccgttct tctcatgtat atatatatac aggcaacacg cagatatagg	600
tgcgacgtga acagtgagct gtatgtgcgc agctcgcgtt gcatttttcgg aagcgtcgt	660
tttcggaaac gctttgaagt tctattccg aagttcctat tctctagaaa gtataggaac	720

ES 2 663 445 T3

ttcagagcgc	ttttgaaaac	caaaagcgct	ctgaagacgc	actttcaaaa	aaccaaaaaac	780
gcaccggact	gtaacgagct	actaaaatat	tgcgaatacc	gcttccacaa	acattgctca	840
aaagtatctc	tttgctatat	atctctgtgc	tatatcccta	tataacctac	ccatccacct	900
ttcgctcctt	gaacttgcat	ctaaactcga	cctctacatt	ttttatgttt	atctctagta	960
ttactcttta	gacaaaaaaa	ttgtagtaag	aactattcat	agagtgaatc	gaaaacaata	1020
cgaaaatgta	aacatttcct	atacgtagta	tatagagaca	aaatagaaga	aaccggtcat	1080
aattttctga	ccaatgaaga	atcatcaacg	ctatcacttt	ctgttcacaa	agtatgcgca	1140
atccacatcg	gtatagaata	taatcgggga	tgcctttatc	ttgaaaaaat	gcacccgcag	1200
cttcgctagt	aatcagtaaa	cgcggaagt	ggagtcaggc	tttttttatg	gaagagaaaa	1260
tagacaccaa	agtagccttc	ttctaacctt	aacggaccta	cagtgcacaa	agttatcaag	1320
agactgcatt	atagagcgca	caaaggagaa	aaaaagtaat	ctaagatgct	ttgttagaaa	1380
aatagcgctc	tcgggatgca	tttttgtaga	acaaaaaaga	agtatagatt	ctttgttggt	1440
aaaaatagcg	tctcgcttg	catttctggt	ctgtaaaaat	gcagctcaga	ttctttgttt	1500
gaaaaattag	cgctctcgcg	ttgcattttt	gttttacaaa	aatgaagcac	agattcttcg	1560
ttggtaaaat	agcgctttcg	cggtgcattt	ctgttctgta	aaaatgcagc	tcagattctt	1620
tgtttgaaaa	attagcgctc	tcgcgttgca	tttttgttct	acaaaatgaa	gcacagatgc	1680
ttcgttaaca	aagatatgct	attgaagtgc	aagatggaaa	cgagaaaaat	gaaccgggga	1740
tgcgacgtgc	aagattacct	atgcaataga	tgcaatagtt	tctccaggaa	ccgaaataca	1800
tacattgtct	tccgtaaagc	gctagactat	atattattat	acaggttcaa	atatactatc	1860
tgtttcaggg	aaaactccca	ggttcggatg	ttcaaaattc	aatgatgggt	aacaagtacg	1920
atcgtaaatc	tgtaaaacag	tttgtcggat	attaggctgt	atctcctcaa	agcgtattcg	1980
aatatcattg	agaagctgca	gcgtcacatc	ggataataat	gatggcagcc	attgtagaag	2040
tgccttttgc	atttctagtc	tctttctcgg	tctagctagt	tttactacat	cgcaagata	2100
gaatcttaga	tcacactgcc	tttgctgagc	tggatcaata	gagtaacaaa	agagtggtaa	2160
ggcctcggtt	aaggacaagg	acctgagcgg	aagtgtatcg	tacagtagac	ggagtatact	2220
agtatagtct	atagtccgtg	gaattctcat	gtttgacagc	ttatcatcga	taagcttttc	2280
aattcaattc	atcatttttt	ttttattctt	ttttttgatt	tcggtttctt	tgaaattttt	2340
ttgattcggt	aatctccgaa	cagaaggaag	aacgaaggaa	ggagcacaga	cttagattgg	2400
tatatatacg	catatgtagt	gttgaagaaa	catgaaattg	cccagtattc	ttaaccaaac	2460
tgcacagaac	aaaaacctgc	aggaaacgaa	gataaatcat	gtcgaaagct	acataataag	2520
aacgtgctgc	tactcatcct	agtcctgttg	ctgccaaagc	atttaatatc	atgcacgaaa	2580
agcaaacaaa	cttgtgtgct	tcattggatg	ttcgtaccac	caaggaatta	ctggagttag	2640

ES 2 663 445 T3

ttgaagcatt aggtcccaaa atttgtttac taaaaacaca tgtggatatac ttgactgatt	2700
tttccatgga gggcacagtt aagccgctaa aggcatatac cgccaagtac aattttttac	2760
tcttcgaaga cagaaaattt gctgacattg gtaatacagt caaattgcag tactctgcgg	2820
gtgtatacag aatagcagaa tgggcagaca ttacgaatgc acacggtgtg gtgggccag	2880
gtattgtagc cggtttgaag caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct agaggccttt	2940
tgatgttagc agaattgtca tgcaagggtt ccctatctac tggagaatat actaagggtg	3000
ctgttgacat tgcgaagagc gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct caaagagaca	3060
tgggtggaag agatgaaggt tacgattggt tgattatgac acccggtgtg ggttagatg	3120
acaagggaga cgcatgggt caacagtata gaaccgtgga tgatgtggtc tctacaggat	3180
ctgacattat tattgttgga agaggactat ttgcaaaggg aagggatgct aaggtagagg	3240
gtgaacgtta cagaaaagca ggctgggaag catatttgag aagatgcggc cagcaaaact	3300
aaaaaactgt attataagta aatgcatgta tactaaactc acaaattaga gcttcaattt	3360
aattatatca gttattaccc gggaatctcg gtcgtaatga tttttataat gacgaaaaaa	3420
aaaaaattgg aaagaaaaag ctttaatgcg gtagtttatc acagttaaatt tgctaacgca	3480
gtcaggcacc gtgtatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc	3540
tggatgctgt aggcataaggc ttggttatgc cggtagtgc gggcctcttg cgggatatcg	3600
tccattccga cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatatg gcgttgatgc	3660
aatttctatg cgcaccggtt ctccgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cggccagtcc	3720
tgctcgcttc gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctcc	3780
tgtggatcct ctacgccgga cgcacgtg cggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg	3840
ctggcgcta tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca	3900
tgagcgcttg ttcggcggtg ggtatggtg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg	3960
ccatctcctt gcatgcacca ttccttgccg cggcggtgct caacggcctc aacctactac	4020
tgggctgctt cctaatagcag gagtcgata agggagagcg tcgaccgatg cccttgagag	4080
ccttcaacc agtcagctcc ttcgggtggg cggggggcat gactatcgtc gccgcactta	4140
tgactgtctt ctttatcatg caactcgtag gacagggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt	4200
tcggcgagga ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg	4260
gaatcttgca cgccctcgct caagccttcg tcaactgtcc cgccaccaa cgtttcggcg	4320
agaagcaggc cattatcgcc ggcatggcg cgcacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt	4380
tcgcgacgg aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg	4440
ggatgccgc gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacct cagggacagc	4500

ES 2 663 445 T3

ttcaaggatc gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cactggaccg ctgatcgtca	4560
cggcgattta tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg	4620
ccctatacct tgtctgcctc cccgcgttgc gtgcgcgtgc atggagccgg gccacctcga	4680
cctgaatgga agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa	4740
tcaattcttg cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc	4800
gtccgccatc tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg	4860
gggtgcgatg atcgtgctcc tgtcgttgag gacccggcta ggctggcggg gttgccttac	4920
tggtagcag aatgaatcac cgatacgcga gcgaacgtga agcgactgct gctgcaaaac	4980
gtctgcgacc tgagcaacaa catgaatggt cttcggtttc cgtgtttcgt aaagtctgga	5040
aacgcggaag tcagcgcctt gcaccattat gttccggatc tgcatcgag gatgctgctg	5100
gctaccctgt ggaacaccta catctgtatt aacgaagcgc tggcattgac cctgagtgat	5160
ttttctctgg tcccgccgca tccataccgc cagttgttta ccctcacaac gttccagtaa	5220
ccgggcatgt tcatcatcag taaccggtat cgtgagcatc ctctctcgtt tcatcggtat	5280
cattaccccc atgaacagaa attccccctt acacggaggc atcaagtgac caaacaggaa	5340
aaaaccgccc ttaacatggc ccgctttatc agaagccaga cattaacgct tctggagaaa	5400
ctcaacgagc tggacgcgga tgaacaggca gacatctgtg aatcgcttca cgaccacgct	5460
gatgagcttt accgcagctg cctcgcgcgt ttccggtgat acggtgaaaa cctctgacac	5520
atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc	5580
cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg tgtcggggcg cagccatgac ccagtacgct	5640
agcgatagcg gagtgtatac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag	5700
tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcatcaggc	5760
gctcttcgcg ttccctgcgc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg	5820
tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa	5880
agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg	5940
cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga	6000
ggtaggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg	6060
tgcgctctcc tgttcgcacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg	6120
gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc	6180
gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg	6240
gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca	6300
ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg	6360
ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag	6420

ES 2 663 445 T3

	ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg	6480
	gtgggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc	6540
5	ctttgatctt ttctacggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt	6600
	tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aatgaagtt	6660
	ttaaatacaat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaa tgcttaatca	6720
10	gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac ctagttgcc tgactccccg	6780
	togttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac	6840
	cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaagg	6900
15	ccgagcgag aagtggctct gcaactttat cgcctccat ccagtctatt aattgttgc	6960
	gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgc caacgttgtt gccattgctg	7020
20	caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac	7080
	gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc	7140
	ctccgatcgt tgtcagaagt aagtggccg cagtgttacc actcatggtt atggcagcac	7200
25	tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact	7260
	caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaaa	7320
	cacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt	7380
30	cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca	7440
	ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagcaaa	7500
	aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac	7560
35	tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg	7620
	gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata acaaatagg ggttccgcgc acatttcccc	7680
40	gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaaa	7740
	ggcgtatcac gaggccctt cgtcttcaa	7769
	<210> 34	
	<211> 2000	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia de la región aroE suprimida;	
	<400> 34	
	actacgtccg tcctctgaaa tcttcagcgg atggacatat cgtcaaagtt ctggaggggc	60
	aggtttgccc tgcattgtgc gcaaatctgg tattacgcca gggacgcttt ggtatgttta	120
	ttggttgcat taactaccct gaatgcgaac ataccgaact tatcgataaa ccggacgaaa	180
	cagcaattac atgcccccaa tgcggacgg gccatctggt ccagcgccgc tccggttatg	240
50	gcaaaacatt tcactcttgt gatcgctacc cggagtgtca atttgccatt aacttcaaac	300

ES 2 663 445 T3

ccatagctgg	agaatgcct	gagtgtcatt	atccgctact	catcgaaaag	aaaaccgcgc	360
agggtgtaaa	acacttttgt	gccagtaaac	aatgtggaaa	gccggtttcg	gcggaataat	420
aacgtgaata	ataacctgca	aagagacgct	atcgagctg	cgatagatgt	tctcaatgaa	480
gaacgtgtca	tgcctatcc	aacggaagcc	gttttcggtg	ttgggtgcga	tcctgatagc	540
gaaacagcag	tgatgcgact	gttggaagta	aaacagcgtc	cggttgataa	ggggctgatt	600
ttaatcgag	caaattacga	gcagcttaaa	ccctatatgt	atgacaccat	gttgactgac	660
gtgcagcgtg	aaaccatttt	ttcccgcgtg	ccaggtcctg	tcacctttgt	ctttcccgcg	720
cctgcgacaa	caccgcgctg	gttgacgggc	cgctttgatt	cgcttgctgt	acgagtcacc	780
gaccatccgt	tggtggttgc	tttgtgccag	gcttatggta	aaccgctggt	ttctaccagt	840
gccaaactga	gtggattgcc	accttgtcga	acagtagacg	aagttcgcgc	acaatttggc	900
gcggcgctcc	cggttgtgcc	tggtgaaacg	ggggggcggt	taaatacctc	agaaatccgc	960
gatgccctga	cggtggaact	gtttcgacag	gggtaacata	atcaggccat	ccagtttccg	1020
gacagggaag	agtgggacga	gaataaaaaa	tgtgtatgtt	ttcccgcctc	cgtgaatggt	1080
atgcaactga	catgcgcgat	ctctggcgag	agtctggcgt	atcgctttac	tggagatacg	1140
ccagaacagt	ggtagcgag	ttttcgtcag	catcgctggg	acctggaaga	agaagcgga	1200
aacttaattc	aggaacaaag	tgaagatgat	caaggctggg	tctggttacc	ctgatccaga	1260
tattcgctct	tccatttcac	gtaattattc	gcggaatagc	gtaaccacgc	cttctcttca	1320
tcacttaacg	ggcggatctg	tttgacgggg	ctaccgagat	acagatatcc	gctctccagc	1380
cgtttatttt	gtgggaccag	actaccgcga	ccaatcatca	catcatcttc	tactattgcg	1440
ccatcaagta	aaattgagcc	catcccaacc	aaaactcgat	tgccaatggt	gcagccgtgg	1500
agcatcacct	tgtgaccaac	agtgacatct	tcgccaatgg	ttaatgggtt	gccatctggg	1560
ttgtacgagg	atttatgagt	gacatgcaac	atactgccat	cctggatatt	ggtgcgtgct	1620
ccgatctgta	cataatgtac	atctccacga	atcacaacga	gcggccagat	ccccacatca	1680
tcagccagac	gaacgtcacc	aatcacgaca	ctgctatcgt	cgatcattac	gcgctgaccg	1740
atttgtggaa	aaagatcgcg	gtatgggcgt	aaaacatcag	acatacttac	ctcagcaata	1800
aatgatattac	taatgacttt	gggggcatta	ttggccttgt	gcaagtcttt	tagtatgcaa	1860
aaaagcaccg	ttttgtgtgc	gattgcagca	aaaagggtga	aaaaacaaca	aacagaaaaa	1920
aagatcaaaa	aaatacttgt	gcaaaaaatt	gggatcccta	taatgcgctc	ccgttgagac	1980
gacaacgtga	aacacttcac					2000

ES 2 663 445 T3

<210> 35
 <211> 2460
 <212> ADN
 <213> Secuencia del casete P15aroB integrado en el locus ack;

<400> 35

gatcggcgccg ataaaacgga tcgcataacg cgtcatcttg ataacgcgat tttcgacaaa	60
gaccgggggca aggcgttttt ccagcggccca cgtctttgag taatgctgtc cccggcgaaa	120
caagctaaaa aaattaacag aacgattatc cggcgttgac atgcttcacc tcaacttcac	180
atataaagat tcaaaaattt gtgcaaattc acaactcagc gggacaacgt tcaaaacatt	240
ttgtcttcca taccactat caggtatcct ttagcagcct gaaggcctaa gtagtacata	300
ttcattgagt cgtcaaattc atatacatta tgccattggc tgaaaattac gcaaaatggc	360
atagactcaa gatatttctt ccatcatgca aaaaaaatt tgcaagtgcg gatgttaatc	420
ataaatgtcg gtgtcatcat gcgctacgct ctatggctcc ctgacgtttt tttagccacg	480
tatcaattat aggtacttcc ctcgaggcta ttgacgacag ctatggttca ctgtccacca	540
acaaaaactg tgctcagtag cgccaatatt tctcccttga ggggtacaaa gaggtgtccc	600
tagaagagat ccacgctgtg taaaaatttt acaaaaagggt attgactttc cctacaggggt	660
gtgtaataat ttaattacag gcgggggcaa cccgcctgt tctagaggag gaggaatcgc	720
catggagagg attgtcgta ctctcgggga acgtagttac ccaattacca tcgcatctgg	780
tttgtttaat gaaccagctt cattcttacc gctgaaatcg ggcgagcagg tcatgttggt	840
caccaacgaa accctggctc ctctgtatct cgataaggtc cgcggcgtag ttgaacaggc	900
gggtgttaac gtcgatagcg ttatcctccc tgacggcgag cagtataaaa gcctggctgt	960
actcgatacc gtctttacgg cgttggttaca aaagccgcat ggtcgcgata ctacgctgggt	1020
ggcgcttggc ggcggcgtag tgggcgatct gaccggcttc gcggcgcgga gttatcagcg	1080
cggtgttcgt ttcatccaag tcccgacgac gttactgtcg caggtcgatt cctccgttgg	1140
cggcaaaact gcggtcaacc atcccctcgg taaaaacatg attggcgcgt tctaccagcc	1200
tgcttcagtg gtggtggatc tcgactgtct gaaaacgctt ccccgcggtg agttagcgtc	1260
ggggctggca gaagtcatca aatacggcat tattcttgac ggtgcgtttt tcaactggct	1320
ggaagagaat ctggatgcgt tgttgctgtc ggacgggtccg gcaatggcgt actgtattcg	1380
ccgttggtgt gaactgaagg cagaagttgt cgccgcccgc gagcgcgaaa ccgggttacg	1440
tgctttactg aatctgggac acacctttgg tcatgccatt gaagctgaaa tggggtatgg	1500
caattgggta catggtgaag cggtcgctgc gggatggtg atggcgggcg ggacgtcgga	1560
acgtctcggg cagtttagtt ctgccgaaac gcagcgtatt ataaccctgc tcacgcgggc	1620
tgggttaccg gtcaatgggc cgcgcgaaat gtccgcgcag gcgtatttac cgcatatgct	1680
gcgtgacaag aaagtccttg cgggagagat gcgcttaatt ctccggttgg caattggtaa	1740
gagtgaagtt cgcagcgggc tttcgcacga gcttggttctt aacgccattg ccgattgtca	1800

ES 2 663 445 T3

	atcagcgtaa tcatcgttca tgcctgatgc cgctatgtag gccggataag gcgttcacgc	1860
	cgcatccggc aaccgatgcc tgatgcgacg cggtcgcgtc ttatcaggcc tacaggtcga	1920
	tgccgatatg tacatcgtat tcggcaatta atacatagca tttcacaccg ccagctcagc	1980
	tggcgggtgct gttttgtaac ccgccaaatc ggcggtaacg aaagaggata aaccgtgtcc	2040
	cgtattatta tgctgatccc taccggaacc agcgtcggtc tgaccagcgt cagccttggc	2100
	gtgatccgtg caatggaacg caaaggcgtt cgtctgagcg ttttcaaacc tatcgtcag	2160
	ccgcgtaccg gtggcgatgc gcccgatcag actacgacta tcgtgcgtgc gaactcttcc	2220
	accacgacgg ccgctgaacc gctgaaaatg agctacgttg aaggtctgct ttccagcaat	2280
	cagaaagatg tgctgatgga agagatcgtc gcaaactacc acgctaacac caaagacgct	2340
	gaagtcgttc tggttgaagg tctggtcccg acacgtaagc accagtttgc ccagtcctcg	2400
	aactacgaaa tcgctaaaac gctgaatgcg gaaatcgtct tcgttatgtc tcagggcact	2460
5	<210> 36 <211> 1000 <212> ADN <213> Secuencia de la región poxB suprimida;	
10	<400> 36	
	gcggcccgcc tccgtatatg gattgggtag agcaggaagt gaaagcgctc ggctgacgc	60
	gtttctttta agagaaattc ttcacccag tagcgaagc agcgaccagc ggtctgaaat	120
	tcaccaaact gcaaccggca cgagaatttt acgcccgggt tggcaccacg ctactggagg	180
	cgctggaaag caataacgtt ccggttgctg ccgcctgccg tgcgggtggt tgcggctgct	240
	gtaagacaaa agtggtttcc ggtgaatata cggtgagcag cacaatgacg ctgaccgacg	300
	ccgaaatcgc tgaaggttac gtactggcct gtcctgccca tccgcagggg gatttggttc	360
	tcgcataatc gccttatgcc cgatgatatt cttttcatcg ggctatttaa ccgttagtgc	420
	ctcctttctc tcccattcct tccccctccg tcagatgaac taaacttggt accgttatca	480
	cattcaggag atggagaacc aaagggtggc atttcccgtc ataataagga catgccatga	540
	ttgatttacg cagtataacc gttacccgac cgagccgcgc catgctcgaa gcaatgatgg	600
	ccgccccggt tggggacgac gtttacggag acgaccctac cgttaatgct ctgcaggact	660
	acgcccgcga gctttccggt aaagaagccg ccatttttct gccgaccggc actcaggcca	720
	acctggtcgc tctgctcagt cactgcgaac gtggcgaaga gtatattgtc ggtcaggccg	780
	cgcataacta tctgtttgaa gccggtggcg cagcggtgct gggcagtatt cagccgcaac	840
	ccatcgacgc ggctgccgac ggcacgctac cgctggataa agtggcgatg aaaatcaaac	900
	ccgacgatat ccatttcgcc cgcaccaaata tactcagtct ggaaaacacc cacaacggca	960
	aagtgtgcc gcgtgaatac ctgaaagaag catgggaatt	1000
15	<210> 37 <211> 3392 <212> ADN <213> casete tktA en el locus poxB suprimido;	

ES 2 663 445 T3

<400> 37

gcgggcccggc tccgtatatg gattgggtag agcaggaagt gaaagcgctc ggcgtgacgc	60
gtttcttttaa agagaaattc ttcaccccag tagcggaagc agcgaccagc ggtctgaaat	120
tcaccaaact gcaaccggca cgagaatttt acgccccggt tggcaccacg ctactggagg	180
cgctggaaaag caataacgtt ccggttgctg ccgcctgccg tgcgggtggt tgcggctgct	240
gtaagacaaa agtggtttcc ggtgaatata cggtgagcag cacaatgacg ctgaccgacg	300
ccgaaatcgc tgaaggttac gtactggcct gctcctgcc a tccgcagggg gatttggttc	360
tgcataatc gccttatgcc cgatgatatt cctttcatcg ggctatttaa ccgttagtgc	420
ctcctttctc tcccatccct tccccctccg tcagatgaac taaacttggt accgttatca	480
cattcaggag atggagaacc aaggaagc gcaacggacg ggcgagtaga ttgcgcaaca	540
tgcgagcatg atccagagat ttctgaagca gcaaaaggat gttccatgta catgacgcgc	600
ggcttgccgt aaattgttg caaattttcc ggcgtagccc aaaacgcgct gtcgtcaagt	660
cgttaagggc gtgcccttca tcatccgatc tggagtcaaa atgtcctcac gtaaagagct	720
tgccaatgct attcgtgcgc tgagcatgga cgcagtacag aaagccaaat ccggtcacc	780
gggtgcccct atgggtatgg ctgacattgc cgaagtcctg tggcgtgatt tcctgaaaca	840
caaccgcag aatccgtcct gggctgaccg tgaccgcttc gtgctgtcca acggccacgg	900
ctccatgctg atctacagcc tgctgcacct caccggttac gatctgccga tggaagaact	960
gaaaaacttc cgtcagctgc actctaaaac tccgggccac ccggaagtag gttataccgc	1020
tgggtgtgaa accaccaccg gtccgctggg tcagggtatt gccaacgcag tcggtatggc	1080
gattgcagaa aaaacgctgg cggcgagctt taaccgtcca ggtcacgaca ttgtcgacca	1140
ctacacctac gccttcattg gcgacggctg catgatggaa ggcatctccc acgaagtttg	1200
ctctctggcg ggtacgctga agctgggtaa actgattgog ttctacgatg acaacggtat	1260
ctcaatcgat ggtcacgttg aaggctggtt cactgacgac accgcaatgc gtttcgaagc	1320
ttacggctgg cacgttattc gcgacatcga cggcatgac gcggcatcca tcaaacgcgc	1380
agtagaagaa gcgcgcgcag tgactgacaa accgtccctg ctgatgtgca aaaccatcat	1440
cggtttcggt tccccgaaca aagccggtac ccacgactcc cacggtgcgc cgctgggcga	1500
cgctgaaatt gccctgaccc gcgaacagct gggctggaaa tacgcgcgct tcgaaatccc	1560
gtctgaaatc tatgctcagt gggatgcgaa agaagcaggc caggcgaaag aatctgcatg	1620
gaatgagaag tttgcggctt acgcgaaagc ttatccgcag gaagcggctg aatttaccgc	1680

ES 2 663 445 T3

ccgtatgaaa ggcgaaatgc cgtctgactt cgacgccaaa gcgaaagagt ttatcgctaa	1740
actgcaggct aatccggcga aaatcgccag ccgtaaagcg tcgcagaatg ctatcgaagc	1800
gttcggcccc ctggtgcctg aattcctcgg cggtctctgt gacctggcac cgtctaacct	1860
gacctgtgg tctggttcta aagcaatcaa cgaagatgct gcaggtaact acatccacta	1920
cggtgttcgc gagttcggta tgaccgcgat tgctaacggt atctccctgc acggtgggtt	1980
cctgccgtac acctccacct tcctgatgtt cgtggaatac gcacgtaacg ccgtacgtat	2040
ggctgcgctg atgaaacagc gtcagggtgat ggtttacacc cacgactcca tcggtctggg	2100
cgaagatggc ccgactcacc agccgggtga gcaggtcgct tctctgcgcg tgaccccgaa	2160
catgtctaca tggcgtccgt gtgaccagggt tgaatccgcg gtcgcgtgga aatacggcgt	2220
tgagcgtcag gacggccccg ctgcgcttat cctctcccg cagaacctgg cgcagcagga	2280
acgaactgaa gagcaactgg caaacatcgc gcgcggtggt tatgtgctga aagactgcgc	2340
cggtcagccg gaactgattt tcatcgctac cggttcagaa gttgaactgg ctggtgctgc	2400
ctacgaaaaa ctgactgccg aaggcgtgaa agcgcgcgtg gtgtccatgc cgtctaccga	2460
cgcatttgac aagcaggatg ctgcttaccg tgaatccgta ctgccgaaag cggttactgc	2520
acgcgttgct gtagaagcgg gtattgctga ctactggtac aagtatgttg gcctgaacgg	2580
tgctatcgtc ggtatgacca ccttcggtga atctgctccg gcagagctgc tgtttgaaga	2640
gttcggcttc actgtgata acgttggtgc gaaagcaaaa gaactgctgt aattagcatt	2700
tcgggtaaaa aggtcgcttc ggcgacctt tttattacct tgatatgtcc gtttgcgac	2760
aagcaataga taaagcgtgt tgtagatcac aaatatattat atgcaataaa tatcaattat	2820
gtaatatgca tcacgatatg cgtattgaca tttgttggtta taactataac tcaatgttat	2880
ataagaaatt aaaaagggtg gcatttcccg tcataataag gacatgccat gattgattta	2940
cgcagtgata ccgttaccog accgagccgc gccatgctcg aagcaatgat ggccgccccg	3000
gttggggacg acgtttacgg agacgacct accgttaatg ctctgcagga ctacgccgca	3060
gagctttccg gtaaagaagc cgccattttt ctgccgaccg gactcaggc caacctggtc	3120
gctctgctca gtcactgcga acgtggcgaa gagtatattg tcggtcaggc cgcgcataac	3180
tatctgtttg aagccggtgg cgcagcgggtg ctgggcagta ttcagccgca acccatcgac	3240
gcggctgccg acggcacgct accgctggat aaagtggcga tgaaaatcaa acccgacgat	3300
atccatttcg cccgcaccaa attactcagt ctggaaaaca cccacaacgg caaagtgctg	3360
ccgcgtgaat acctgaaaga agcatgggaa tt	3392

ES 2 663 445 T3

<210> 38
 <211> 1045
 <212> ADN
 <213> secuencia de delección de ptsHI;

5

<400> 38

gaagatgaaa gctttaccaa caagaatatt gtggttattc taccatcatc ggggtgagcgt	60
tatttaagca ccgcattggt tgccgatctc ttcactgaga aagaattgca acagtaatgc	120
cagcttggtta aaaatgcgta aaaaagcacc ttttttaggtg cttttttgtg gcctgcttca	180
aactttcgcc cctcctggca ttgattcagc ctgtcggaac tgggtatttaa ccagactaat	240
tattttgatg cgcgaaatta atcggttacag gaaaagccaa agctgaatcg attttatgat	300
ttggttcaat tcttccttta gcggcataat gtttaatgac gtacgaaacg tcagcgggtca	360
acaccgcga gcaatggact gtattgcgct cttcgtgcgt cgcgtctgtt aaaaactggc	420
gctaacaata caggctaaag tcgaaccgcc aggctagact ttagttccac aacactaaac	480
ctataagttg gggaaatata atgttccagc aagaagttac cattaccgct ccgacaatct	540
gctaatccac gagatgcggc ccaatttact gcttaggaga agatcatggg tttgttcgat	600
aaactgaaat ctctggtttc cgacgacaag aaggataccg gaactattga gatcattgct	660
ccgctctctg gcgagatcgt caatatcgaa gacgtgccgg atgtcgtttt tgcggaaaaa	720
atcgttggtg atggtattgc tatcaaacca acgggtaaca aaatggtcgc gccagtagac	780
ggcaccattg gtaaaatctt tgaaaccaac cacgcattct ctatcgaaac tgatagcggc	840
gttgaaactgt tcgtccactt cgggtatcgac accgttgaac tgaaaggcga aggcttcaag	900
cgtattgctg aagaagggtca gcgcgtgaaa gttggcgata ctgtcattga atttgatctg	960
ccgctgctgg aagagaaagc caagtctacc ctgactccgg ttgttatctc caacatggac	1020
gaaatcaaag aactgatcaa actgt	1045

10

<210> 39
 <211> 4595
 <212> ADN
 <213> casete glf-glK integrado en el locus tdc suprimido;

15

<400> 39

ctgatttctt tgtcgtgat cccttactgg aactctgcag ttatcgacca ggttgacctc	60
ggttcgtgt cgtaaccgg tcatgacggt atcctgatca ctgtctggct ggggatttcc	120
atcatggttt tctcctttaa cttctcgcca atcgtctctt ccttcgtggt ttctaaccgt	180
gaagagtatg agaaagactt cggtcgcgac ttcaccgaac gtaaagtgtc ccaaatcatt	240
tctcgtgcca gcatgctgat ggttgacgtg gtgatgttct ttgccttttag ctgcctgttt	300
actctgtctc cgccaacat ggcggaagcc aaagcgcaga atattccagt gctttcttat	360
ctggctaacc actttgcgtc catgaccggt accaaaacaa cgttcgcgat tacactggaa	420
tatgcggctt ccatcatcgc actcgtggct atcttcaaact ctttcttcgg tcactatctg	480
gggacgctgg aaggcttgaa tggctctgatt ctgaagttcg gttataaagg tgacaaaacc	540

ES 2 663 445 T3

aaagtgtcgc tgggtaaact gaatactctc agcatgatct tcatcatggg ctccacctgg	600
gttgttgcct acgccaaccc gaacatcctc gacctgattg aagccatggg cgcaccgatt	660
atcgcatccc tgctgtgcct gttgccgatg tatgccatcc gtaaagcgcc gtctctggcg	720
aaataccgtg gtcgtctgga taacgtgttt gttaccgtga ttggtctgct gaccatcctg	780
aacatcgtat acaaactgtt ttaatccgta actcaggatg agaaaagaga tgaatgaatt	840
tccggttggt ttggttatta actgtggttc gtcttcgatt aagttttccg tactcgatgc	900
cagcgactgt gaagtattaa tgtcaggatg tgccgacggt attaaactcg aaaatgcatt	960
cttatccgta aatgggggag agccagcacc gctggctcac cacagctacg aaggcgcatt	1020
gaaggcaatt gcatttgaac tggaaaaacg gagtttaaat gacagcgtgg ccttaattgg	1080
tgcaaaagtg gctgtgactg taaaaagaaa tcgaaaaaga ccgtttttgtg tgaaaaagg	1140
ctttttgttt ccttttaacc aactgccata actcgaggcc tacctagctt ccaagaaaga	1200
tatcctaaca gcacaagagc ggaaagatgt tttgttctac atccagaaca acctctgcta	1260
aaattcctga aaaattttgc aaaaagttgt tgactttatc tacaaggtgt ggtataataa	1320
tcttaacaac agcaggacgc tctagaggga gaggaatcgc catgagttct gaaagtagtc	1380
agggtctagt cacgcgacta gccctaactg ctgctatagg cggcttgctt ttcggttacg	1440
attcagcggg tatcgtgca atcggtagac cggttgatat ccattttatt gccctcgtc	1500
acctgtctgc tacggctgcg gcttcccttt ctgggatggg cggtgttgct gttttggtcg	1560
gttgtgttac cggttctttg ctgtctggct ggattgggat tcgcttcggg cgtcgcggcg	1620
gattgttgat gagttccatt tgtttcgtcg ccgccggttt tgggtgctgcg ttaaccgaaa	1680
aattatttgg aaccgggtgg tggcctttac aaattttttg ctttttccgg tttcttgccg	1740
gttttaggtat cgggtgctgt tcaaccttga cccaacctt tattgctgaa attgctccgc	1800
cagacaaacg tggtcagatg gtttctggtc agcagatggc cattgtgacg ggtgctttaa	1860
ccggttatat ctttacctgg ttactggctc atttcggttc tatcgattgg gttaatgcca	1920
gtggttggtg ctggtctccg gcttcagaag gcctgatcgg tattgccttc ttattgctgc	1980
tgtaaacgc accggatacg ccgcattggg tgggatgaa gggacgtcat tccgaggcta	2040
gcaaaatcct tgctcgtctg gaaccgcaag ccgaccta tctgacgatt caaaagatta	2100
aagctggtt tgataaagcc atggacaaa gcagcgcagg tttgtttgct tttggtatca	2160
ccgttggttt tgccggtgta tccgttgctg ccttcacgca gttagtcggg attaacgccg	2220
tgctgtatta tgcaccgag atgttccaga atttaggttt tggagctgat acggcattat	2280
tgcagaccat ctctatcggg gttgtgaact tcatcttcac catgattgct tcccgtgttg	2340
ttgaccgctt cgcccgtaaa cctctgctta tttgggtgct tctcggtatg gctgcaatga	2400
tggtgtgttt aggtgctgt ttctggttca aagtcgggtg tggtttgcct ttggcttctg	2460

ES 2 663 445 T3

tgcttcttta tattgcagtc tttggtatgt catggggccc tgtctgctgg gttgttctgt	2520
cagaaatggt cccgagttcc atcaagggcg cagctatgcc tatcgctgtt accggacaat	2580
ggtagctaa tatcttggtt aacttcctgt ttaaggttgc cgatggttct ccagcattga	2640
atcagacttt caaccacggt ttctcctatc tcgttttcgc agcattaagt atcttaggtg	2700
gcttgattgt tgctcgcttc gtgccgaaa ccaaaggctg gagcctggat gaaatcgagg	2760
agatgtggcg ctcccagaag tagttaaact tgctttggct gaatcctttt gtctttttta	2820
gataagtctt aaccaattat actttttgtt tacaacgatg gtataaagcg ggcggaactta	2880
ttttacctgt tgggtagcct tctgatttca gaaaggaatt attatggaaa ttgttgogat	2940
tgacatcggt ggaacgcatg cgcgtttctc tattgcggaa gtaagcaatg gtcgggttct	3000
ttctcttga gaagaaacaa cttttaaaac ggacagaacat gctagcttgc agttagcttg	3060
ggaacgtttc ggtgaaaaac tgggtcgctc tctgccacgt gccgcagcta ttgcatgggc	3120
tggcccggt catggtgaag ttttaaaact taccaataac ccttgggtat taagaccagc	3180
tactctgaat gaaaagctgg acatcgatac gcatgttctg atcaatgact tcggcgcggt	3240
tgcccacgcy gttgcgcata tggattcttc ttatctggat catatttgtg gtcctgatga	3300
agcgcttcct agcgatggtg ttatcactat tcttgggtccg ggaacgggct tgggtgttgc	3360
ccatctgttg cggactgaag gccgttattt cgtcatcgaa actgaaggcg gtcatatcga	3420
ctttgctccg cttgacagac ttgaagacaa aattctggca cgtttacgtg aacgtttccg	3480
ccgcgtttct atcgaacgca ttatttctgg ccgggtctt ggtaatatct acgaagcact	3540
ggctgccatt gaaggcgctc cgttcagctt gctggatgat attaaattat ggcagatggc	3600
tttgaagggt aaagacaacc ttgctgaagc cgctttggat cgcttctgct tgagccttgg	3660
cgctatcgct ggtgatcttg ctttggcaca ggtcgaacc agtggtgtta ttggcggtgg	3720
tgctcggtctt cgtatcgctt cccatttgcc agaactctggt ttccgtcagc gctttgtttc	3780
aaaaggagcg tttgaacgcy tcatgtccaa gattccgggt aagttgatta cttatccgca	3840
gcctggactg ttgggtgcyg agctgcctat gccacaaaat attctgaagt tgaataatat	3900
tttttaatat tatgaactga atttaagagg ctgccttccg ataaaatcgg gaggtggcct	3960
tttttatatt ttttactaaa aaatgaagac aaaaaagtct taagtaagaa taatattatt	4020
attaactttt gatatatatt gtattagtgg atccgccctc ccgctggaaa ttgaagccat	4080
cgcagtacgt agtgcgtaaa gcctcgtgag cgggacggtc gtaaggctcg tccgctccac	4140
ttcactgaac ggcaatccga ggggtgtggat atgattagtg cattcgatat tttcaaaatt	4200
gggattggtc cctccagttc gcataccgtg gggccaatga atgccggaaa aagttttatt	4260
gatcggtgg aaagtagcgg cttattaacc gcgacgagcc atattgtggt cgatctgtac	4320

ES 2 663 445 T3

	gggtcgttgt cactgacggg caaaggccat gccacggatg tcgccatcat catgggactg	4380
	gcaggaaaca gtccgcagga tgttgtcatt gatgagatcc ctgcatttat agagttagta	4440
	acgcgcagcg ggcggctgcc agtggcatct ggtgcgcata ttgttgattt tcctgtagca	4500
	aagaacatta tcttccatcc cgaaatgttg cctgcgccatg agaacggaat gcggatcact	4560
	gcctggaagg gacaggaaga gctattaagt aaaac	4595
5	<210> 40 <211> 1069 <212> ADN <213> región de delección de galP;	
10	<400> 40	
	actttggtcg tgaacatttc ccgtgggaaa aaaccgacaa agcgcagctg ctgcgcgatg	60
	ctgccggtct gaagtaatct ttcttcacct gcgttcaaag gccagcctcg cgctggcctt	120
	tttcttttgg ataggcgctc acgccgcacg cggcaaaaaa accgcccgcg caataacatc	180
	attcttcctg atcacgtttc accgcagatt atcatcacia ctgaaaccga ttacaccaac	240
	cacaacagac aaagatttgt aatattttca tattattatt cggttttcac agttgttaca	300
	tttcttttca gtaaagtctt aattgcagat aacagcgctt aatctatgat gatataactc	360
	aattattttc atgcacttaa atcataacta agataaatgt tagtgtaagc gattacactg	420
	atgtgatttg cttcacatct ttttacgtcg tactcaccta tcttaattca caataaaaaa	480
	taaccatatt ggagggcatc atgcctgacg ctaaaaaaca ggggcggtca aacaaggcaa	540
	tgacgtttga aataggcgct cagattaat ctccccagc ttccctccat cgcggaggaa	600
	gccacctctt gcagtcactt tttcttcgct ctatcctctg ccgctatgaa aacatcccgt	660
	ctccctatcg ccattccaaca ggccgttatg cgtcgcctgc gggaaaaact cgcccaggcc	720
	aacctgaagc tagggcgtaa ctaccggag ccaaaaactct cttacacca gcgcggaacc	780
	tccgccggaa cggcctggct ggaaagctat gaaattcgcc tcaatcccgt tttgctgttg	840
	gaaaacagtg aagcttttat tgaagaagt gtaccgcacg aactggcaca tttgctggta	900
	tggaaacatt tcggccgcgt agcgcacat ggcaaagagt ggaagtggat gatggaaaac	960
	gtgctgggtg ttcccgcctg tcgtacgcat cagtgcgaac tgcaatccgt gcgtcgcaac	1020
	accttcccct accgctgcaa gtgccaggag catcagctta ccgtacgcc	1069
15	<210> 41 <211> 6100 <212> ADN <213> casete P15-catAX +PR-aroY+P26-quiC en el locus adhE;	
20	<400> 41	
	ttgattttca taggttaagc aaatcatcac cgactgact atactctcgt attcgagcag	60
	atgatttact aaaaaagttt aacattatca ggagagcatt agcttgctat tgacgacagc	120

ES 2 663 445 T3

tatggttcac tgtccaccaa ccaaaactgt gctcagtacc gccaatattht ctcccttgag	180
gggtacaaag aggtgtccct agaagagatc cacgctgtgt aaaaatttta caaaaaggta	240
ttgactttcc ctacaggggtg tgtaataatt taattacagg cgggggcaac cccgcctgtt	300
ctgcagagga ggaatatagc catggaagtg aaaatcttca acaccagga tgttcaggat	360
tttctgctgt ttgcaagcgg tctggaacaa gaggggtgta atccgctgt taaacaaatt	420
attcatcgtg ttctgagcga cctgtataaa gcaattgaag atctgaatat caccagcgac	480
gaatattggg caggcgttgc atatctgaat cagctgggtg caaatcaaga agcagggtctg	540
ctgagtccgg gtctgggttt tgatcattat ctggatatgc gtatggatgc agaagatgca	600
gcactgggta ttgaaaatgc aacaccgctg accattgaag gtccgctgta tgttgccgggt	660
gcaccggaaa gcgttggtta tgcacgcatg gatgatgta gcatccgaa tggcataacc	720
ctgattctgc atggcaccat ttttgatgca gatggtaaac cgctgccgaa tgcaaaagtt	780
gaaatttggc atgcaaacac caaaggcttt tatagccatt ttgatccgac cggatgaacag	840
caggccttta atatgcgtcg tagcattatt accgatgaga atggtcagta tcgtgttcgt	900
accattctgc ctgccggtta tggttgtcct ccggaaggta cgaccagca actgctgaac	960
caactgggtc gtcattgtaa tcgtccggca catattcatt attttgttag cgcagatggt	1020
caccgtaaac tgaccacca gattaatgtt gccgggtgat cgtataccta tgatgatttt	1080
gcatatgcca cccgtgaagg tctggttggt gatgcagttg aacataaccg tccggaagca	1140
attaaagcca atgatgtgga aggtcctttt gccgaaatgg tgtttgatct gaaactgacc	1200
cgtctggttg atggtgttga taatcagggt gtggatcgtc cgcgtctggc agtttaatac	1260
acaaaaatgg ttcaaaatta tcaggcgagt gatcatgat actggcctgt ttttatttca	1320
gggaagggtg gagacaatta cgtggataat cagatcatcc aagaaaccgt ggataaaatt	1380
ctgagcgttc tgccgaatca ggcaggtcag ctggcacgtc tgggtcgtct gatgcaattt	1440
gcatgcgatc cgaccattac cgttattggc aaatataacc atggtaaaag ccgtctgctg	1500
aatgaactga ttggcaccga tatcttttagc gttgcagata aacgtgaaac cattcagctg	1560
gccgaacata aacaggatca ggttcgttgg ctggatgcac ctggtctgga tgccgatgtt	1620
gcagcagttg atgatcgtca tgcatttgaa gcagtttgga ccaggcaga tattcgtctg	1680
tttgttcata gcgttcgtga aggtgaactg gatgcaaccg aacaccatct gctgcaacag	1740
ctgattgaag atgccgatca tagccgtcgt cagaccattc tggttctgac ccagattgat	1800
cagattccgg atcagaccat cctgacacag attaaaacca gcattgcaca gcaggttccg	1860
aaactggata tttgggcagt tagcgaacc cgtcatcgtc agggcattga aaacggtaaa	1920
accctgctga tcgaaaaaag cgttattggt gcaactgcgc ataccctgga acaggcactg	1980

ES 2 663 445 T3

gcacaggtgc cgagcgcacg tacctatgaa aaaaatcgtc tgctgtcaga tctgcaccat 2040
cagctgaaac aactgctgct ggatcagaaa catgttctgc aacaactgca acagacacag 2100
caacagcagc tgcattgattt tgataccggt ctgattaaca ttctggacaa aattcgtgtt 2160
gatctggaac cgattgtgaa tattgatggt caggatcaag cactgaatcc ggatagcttt 2220
gcaaccatgt ttaaaaacac cgcagcaaaa cagcagcgtg ccaaagttca gattgcatat 2280
agccgtgcat gcattgaaat caacagccat ctgattcgcc atgggtgtgt tggtctgcct 2340
gcggaacagc agaccacat taaaagcatt gataccgtga ttgttgccgt gtttggtatc 2400
agcgttaaat ttcgtgatca gctgcgtgcc ctgttttata ccgataccga acgtcagcgt 2460
ctgcaacgtg aatttcgttt ctattttgaa aaaagtgcg gtccgatgat tctggcagca 2520
aaaattgaac agaccatgcg tcagcagggc tgtattcaga atgccatgat ggcaactgcaa 2580
caaattgaaa gcgcagcata aaaacacgga cgccgcaaac ggcgccgaa tttcttggtc 2640
gaccgttaaa tctatcaccc caagggataa atatctaaca ccgtgcgtgt tgactatttt 2700
acctctggcg gtgataatgg ttgcatgtac taatctagat aaggaatata gccatgaccg 2760
caccgattca ggatctgcgt gatgcaattg ccctgctgca acagcatgat aatcagtatc 2820
tggaaccgga tcatccggtt gatccgaatg cagaactggc aggcgtttat cgtcatattg 2880
gtgccggtgg caccgttaaa cgtccgaccc gtattggtcc ggcaatgatg ttaataaca 2940
ttaaagggtt tccgcacagc cgtattctgg ttggtatgca tgcaagccgt cagcgtgcag 3000
cactgctgct gggttgtgaa gcaagtcagc tggcactgga agttggtaaa gcagttaaaa 3060
aaccggttgc accggtgggt gttccggcaa gcagcgacc gtgtcaagag cagatttttc 3120
tggcagatga tccggtttt gatctgcgt cctgctgcc tgacataacc aataccccga 3180
ttgatgcagg tccgtttttt tgtctgggtc tggccctggc aagcgatccg gtggatgcaa 3240
gcctgaccga tgttaccatt catcgtctgt gtgttcaggg tcgtgatgaa ctgagcatgt 3300
tcctggcagc aggtcgccat attgaagttt ttcgtcagaa agcagaagca gcaggtaaac 3360
cgctgccgat taccattaat atgggtctgg acccagcaat ctatattggc gcatgttttg 3420
aagcaccgac caccctgtt ggttataatg aactgggtgt tgccggtgca ctgcgtcagc 3480
gtccggttga actggttcag ggtgttagcg ttccggaaaa agcaattgca cgtgccgaaa 3540
ttgttattga aggtgaactg ctgcctggtg ttcgtgttcg tgaagatcag cataccaatt 3600
caggtcatgc aatgccggaa tttccgggtt attgtggtgg tgcaaatccg agcctgccgg 3660
ttattaaagt taaagccgtt accatgcgca ataacgcaat tctgcaaacc ctggttggtc 3720
cgggtgaaga acataccacc ctggcaggtc tgccgaccga agcaagcatt tggaatgcag 3780
ttgaagcagc aattccgggt tttctgcaaa atgtttatgc ccataccgca gccggtggtg 3840
aatttctggg tattctgcaa gtgaaaaaac gtcagcctgc cgatgaaggt cgtcagggtc 3900

ES 2 663 445 T3

aggcagccct gctggcgctg gcaacctata gcgaactgaa aaatatcatt ctggtggatg	3960
aggatgtgga catttttgat agtgatgata ttctgtgggc aatgaccacc cgtatgcagg	4020
gtgatgttag cattaccacc attccgggta ttccggtca tcagctggac ccgagccaga	4080
caccggaata ttcaccgagc attcgtggta atgggtattag ctgcaaaacc atctttgatt	4140
gtaccgttcc gtgggcactg aaaagccatt ttgaacgtgc accgtttgca gatgttgatc	4200
cgcgtccgtt tgcacctgaa tattttgcac gtctggaaaa aaatcagggc agcgcaaaat	4260
aagctaataa caggcctgct ggtaatcgca ggaattttta tttggatgga tccgcctacc	4320
tagcttccaa gaaagatatc ctaacagcac aagagcggaa agatgttttg ttctacatcc	4380
agaacaacct ctgctaaaat tcctgaaaaa ttttgcaaaa agttgttgac tttatctaca	4440
aggtgtggta taataatctt aacaacagca ggacgctccc ggggttgagga aaacctaatag	4500
aaactgacca gcctgcgtgt tagcctgctg gcaactgggtc tggttaccag cggttttgca	4560
gcagcagaaa cctataaccgt tgatcgttat caggatgata gcgaaaaagg tagcctgcgt	4620
tgggcaattg aacagagcaa tgcaaatagc gcacaagaaa accagattct gattcaggca	4680
gttggttaaag caccgtatgt tatcaaagtt gataaaccgc tgcctccgat taaaagcagc	4740
gttaaaatca ttggcaccga gtgggataaa accggtgaat ttattgcaat tgatggcagc	4800
aactatatca aaggcgaagg tgaaaaagca tgtccgggtg caaatccggg tcagtatggc	4860
accaatgttc gtaccatgac cctgcctggg ctggttctgc aagatgttaa tgggtgtacc	4920
ctgaaaggtc tggatgttca tcgtttttgt attggtgttc tggttaatcg cagcagcaat	4980
aacctgattc agcataatcg tatcagcaac aattatgggt gtgccggtgt tatgattacc	5040
ggtgatgatg gtaaaggtaa tccgaccagc accaccacca ataataacaa agttctggat	5100
aacgtgttca tcgataatgg tgatggctct gaactgacct gtggtgcagc atttaatctg	5160
attgcaaata acctgtttac cagcacaaaa gccaatccgg aaccgagcca gggatttgaa	5220
attctgtggg gtaatgataa tgccgtgggt ggtaacaaat tcgaaaacta ttcagatggc	5280
ctgcaaatca attggggtaa acgtaactat atcgccctata acgaaactgac caataacagc	5340
ctgggtttca atctgacagg tgatggtaac attttcgaca gcaataaagt gcatggtaac	5400
cgtattggta ttgccattcg tagtgaaaaa gatgccaatg cacgtattac cctgaccaaa	5460
aatcagattt gggataacgg caaagatatc aaacgttggt aagccgggtg tagctgtgtt	5520
ccgaatcagc gtctgggtgc aattgttttt ggtgttccgg cactggaaca tgaaggtttt	5580
gttggtagcc gtggcgggtg tgttgttatt gaaccggcaa aactgcaaaa aacctgcacc	5640
cagccgaacc agcagaattg taatgcaatt cctaatacagg gtattcaggc accgaaactg	5700
acagttagca aaaaacagct gaccgttgaa gttaaaggca cccctaataca gcgttataat	5760
gtggaatttt ttggcaatcg taatgccagc agcagcgaag cagaacagta tctgggtagc	5820
attgttggtt ttaccgatca tcagggtctg gcaaaagcaa attgggctcc gaaagttagc	5880
atgccgagcg ttaccgcaaa tgtgacagat catctgggtg cgaccagcga actgagcagc	5940
gcagttaaaa tgcgttaaat gcatgcgcgc cgcgttcgcg cggcgctttt ttttggtact	6000
cagtgcgct gtctggcaac ataaacggcc ccttctgggc aatgccgatc agttaaggat	6060
tagttgaccg atccttaaac tgaggcacta taacggcttc	6100

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo modificado genéticamente que produce ácido cis,cis-mucónico a partir de una fuente de carbono no aromático, que comprende un gen que codifica una enzima shikimato deshidrogenasa con pérdida de función parcial, en donde dicha enzima shikimato deshidrogenasa con pérdida de función parcial confiere prototrofia a los aminoácidos aromáticos y vitaminas, pero sin conducir a una secreción significativa de compuestos aromáticos.
- 10 2. Un microorganismo modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho microorganismo modificado genéticamente es una bacteria.
3. Microorganismo modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho microorganismo modificado genéticamente es *Escherichia coli*.
- 15 4. Un microorganismo modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente uno o más genes exógenos seleccionados de un grupo que consiste en *aroZ*, *qa-4*, *asbF*, *aroY*, *quiC* y *catAX*, en donde dichos genes exógenos codifican proteínas funcionales en una ruta del ácido mucónico.
- 20 5. Un microorganismo modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente uno o más genes exógenos seleccionados de un grupo que consiste en *aroB*, *aroD*, *aroF*, *aroG*, *aroH*, *tktA*, *talB*, *rpe*, y *rpi*, donde dichos genes exógenos codifican proteínas funcionales en una ruta del ácido shikímico.
- 25 6. Un microorganismo modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la actividad de una proteína reguladora negativa de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos codificada por un *tyrR* gen o su homólogo se reduce o elimina sustancialmente.
7. Un microorganismo modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un gen *aroG** que codifica una enzima DAHP sintasa que es sustancialmente resistente a la inhibición por fenilalanina.
- 30 8. Un organismo de ingeniería genética de la reivindicación 7, que comprende un gen *aroG** que codifica una enzima DAHP sintasa que se selecciona de un grupo que consiste en *aroG*20-893*, *aroG*20-897*, *aroG*20-899*, *aroG*20-901*, *aroG*111*, *aroG*211*, *aroG*212*, *aroG*311*, *aroG*312*, *aroG*411*, *aroG*412*, y *aroG*511*.

Figura 1

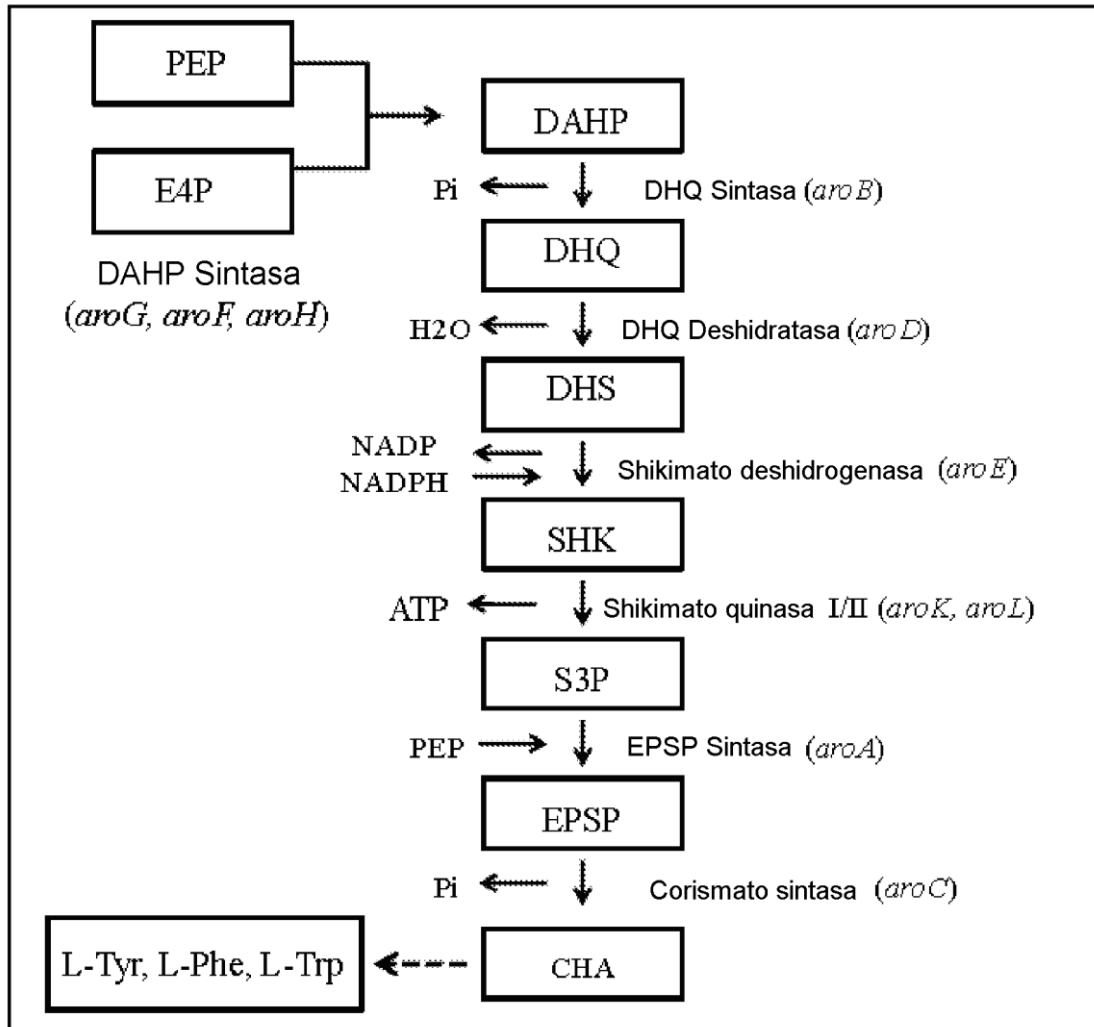


Figura 2

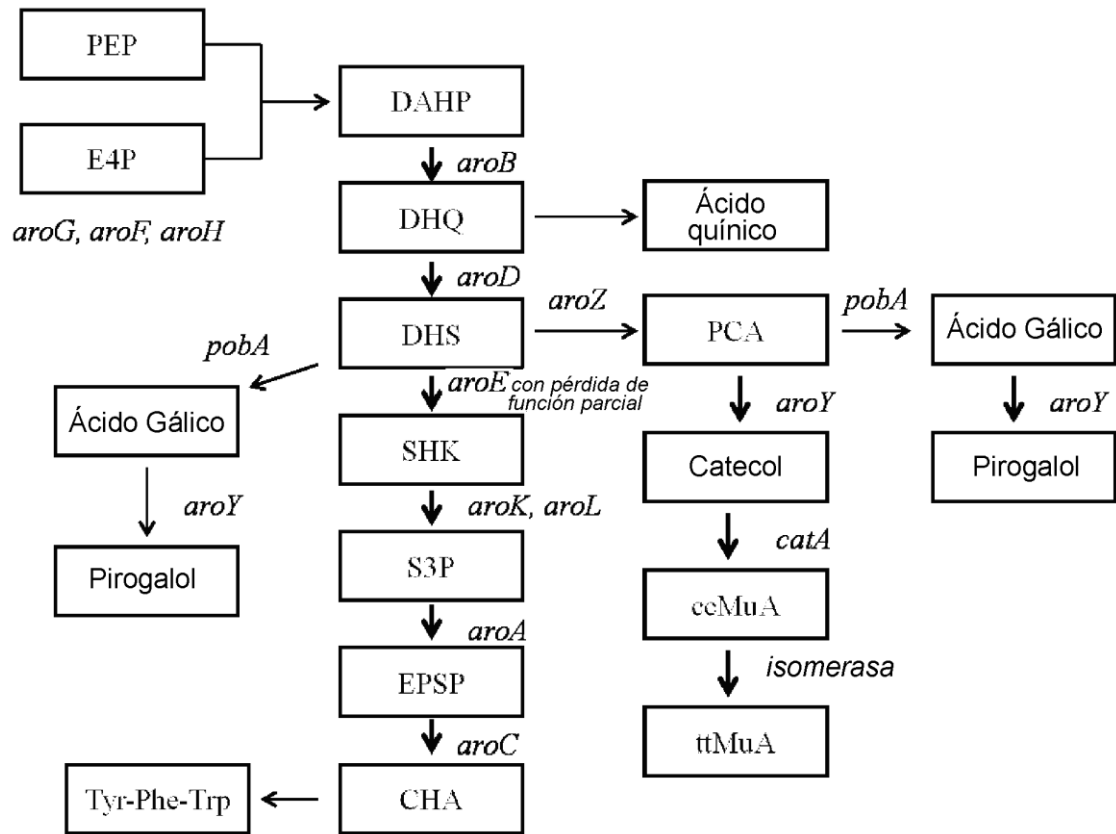


Figura 3

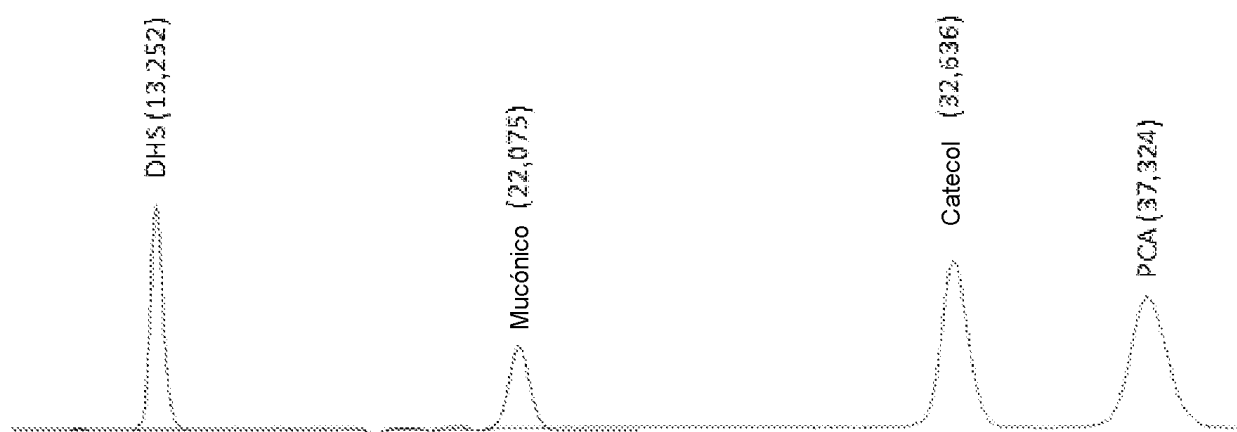


Figura 4

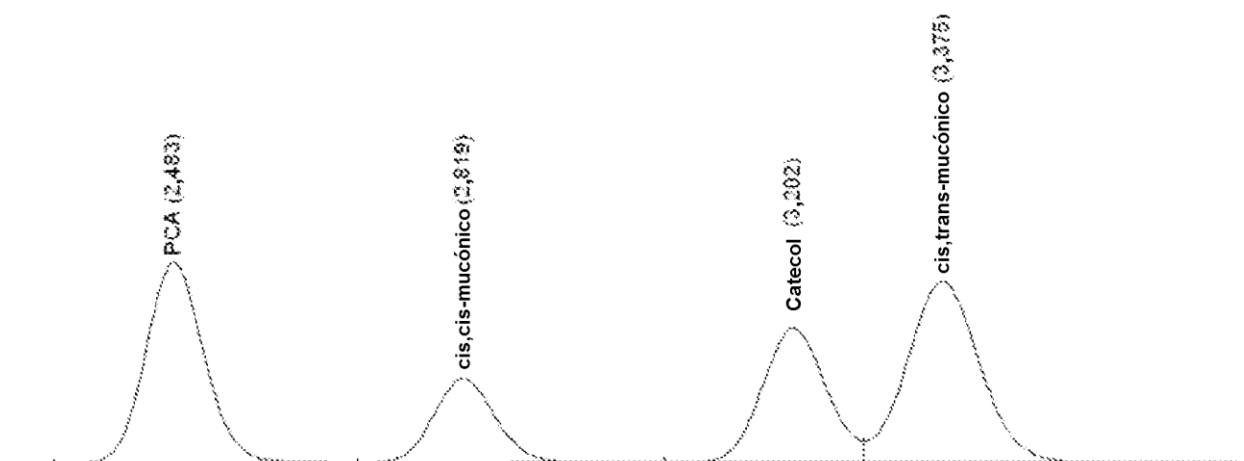


Figura 5

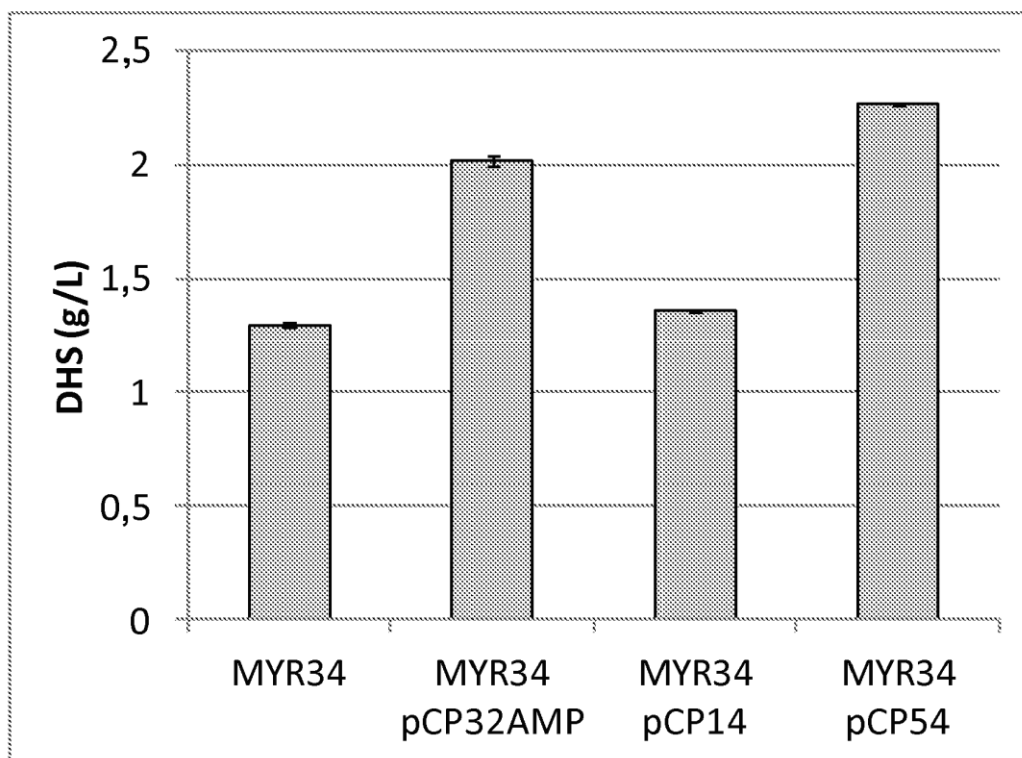


Figura 6

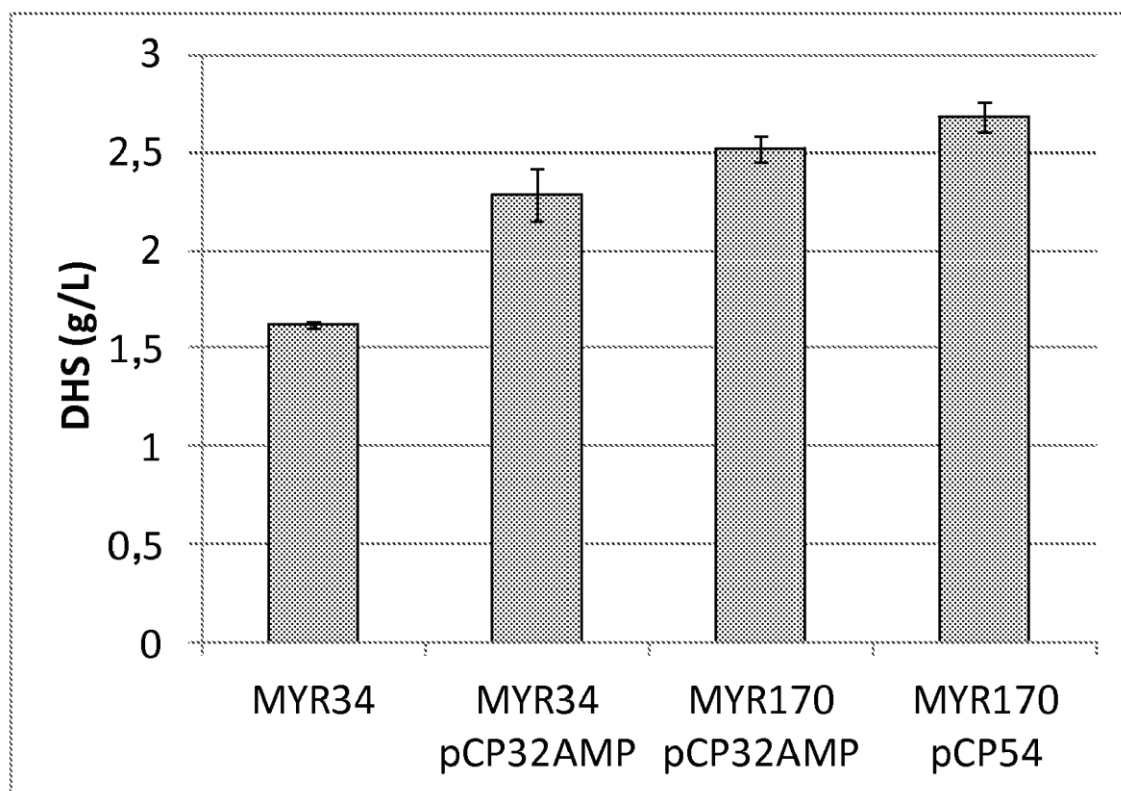


Figura 7

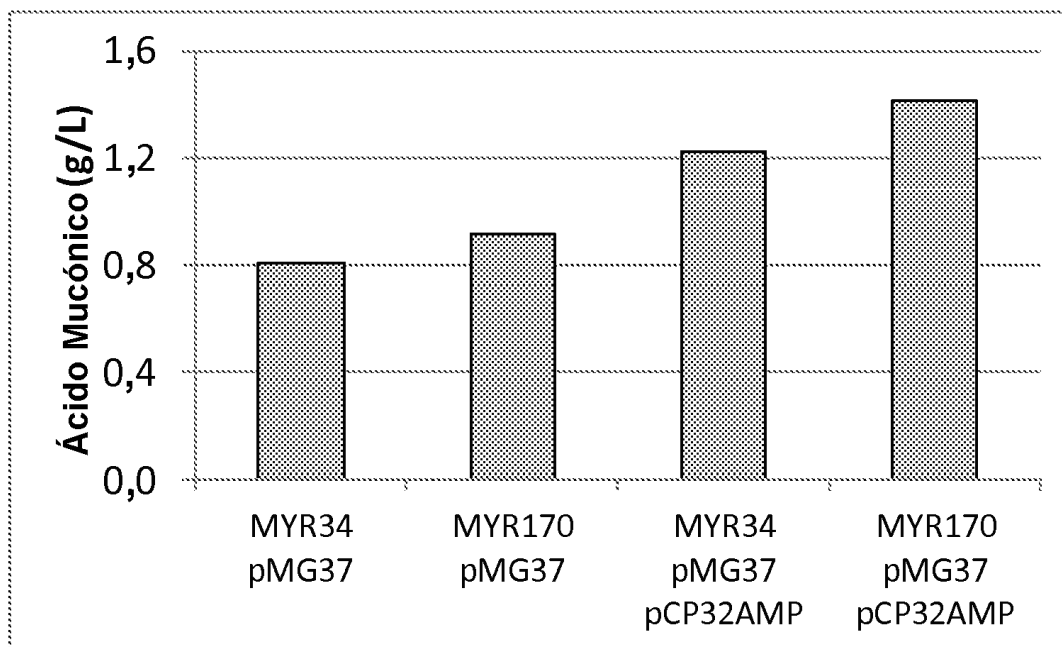


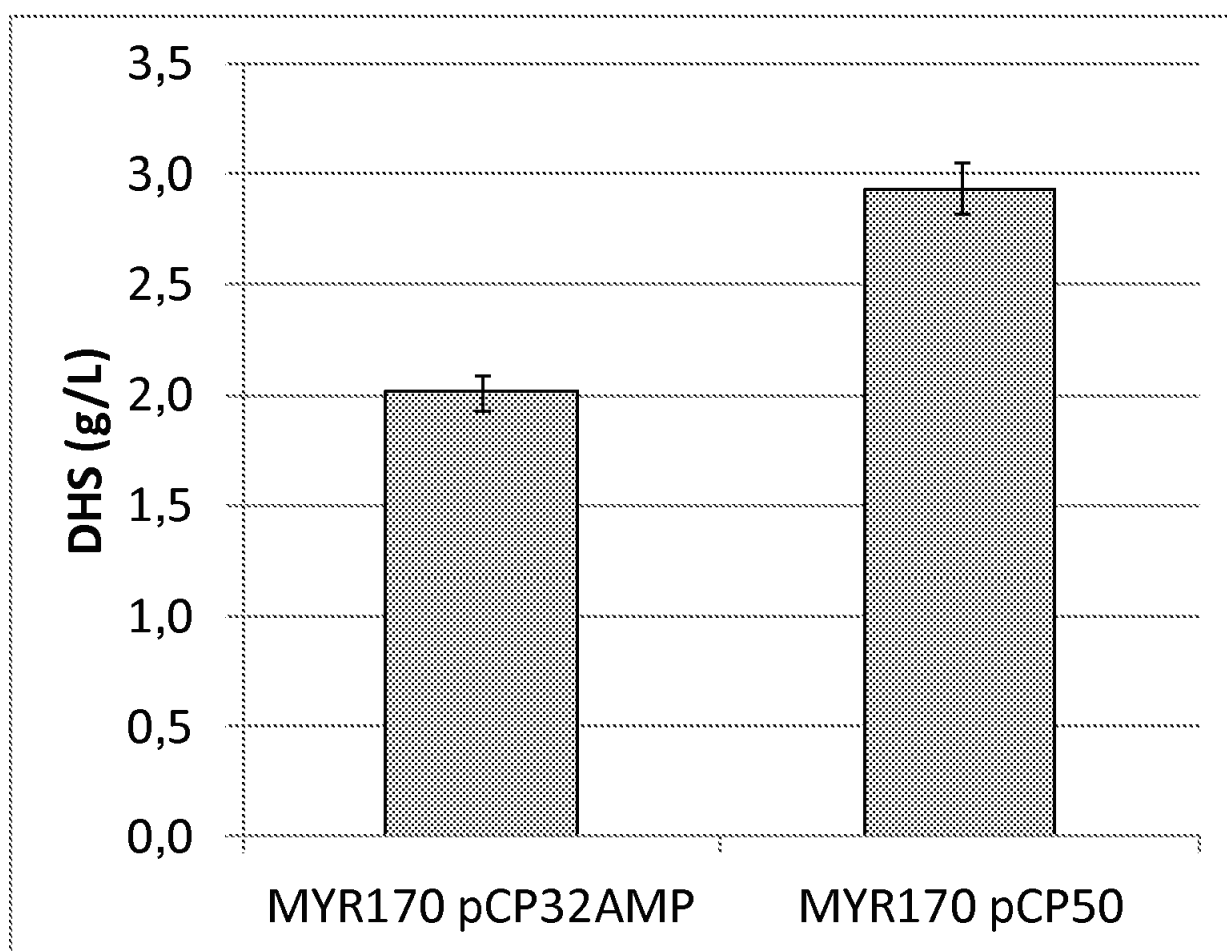
Figura 8

Figura 9

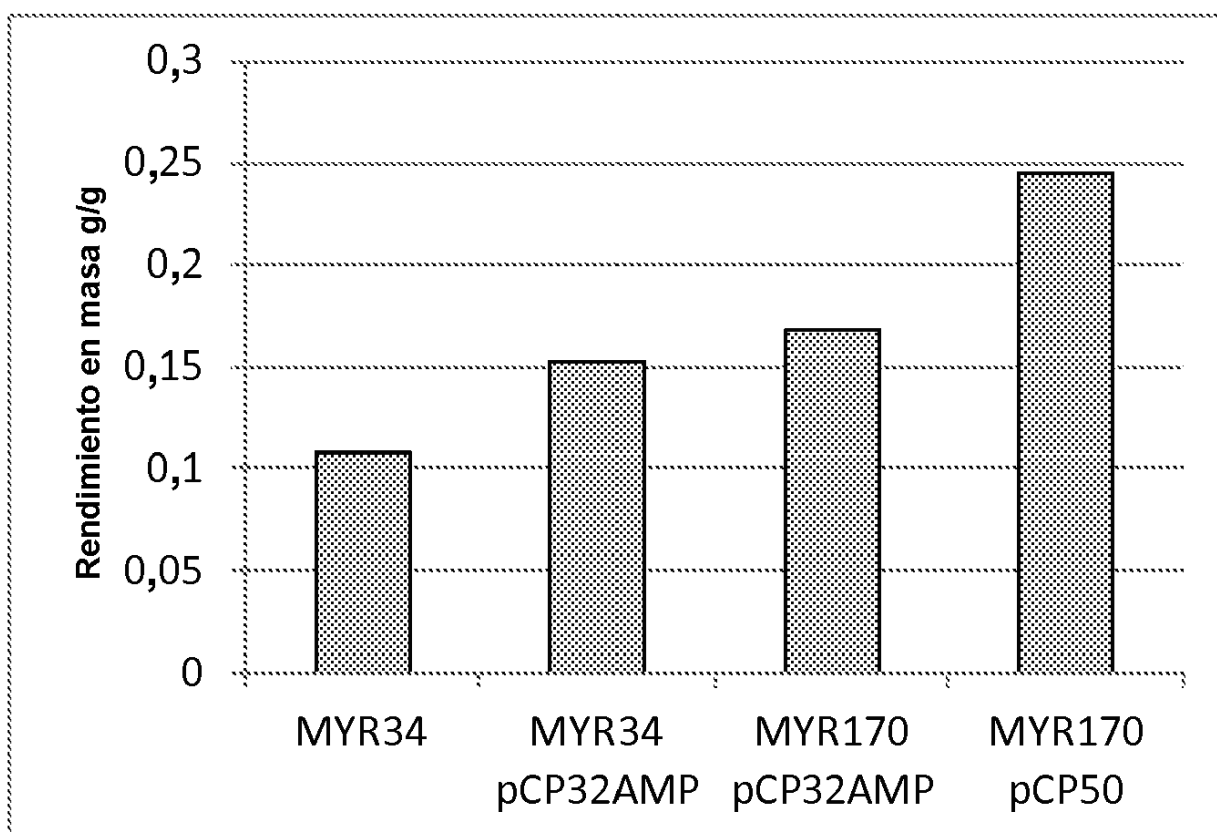


Figura 10

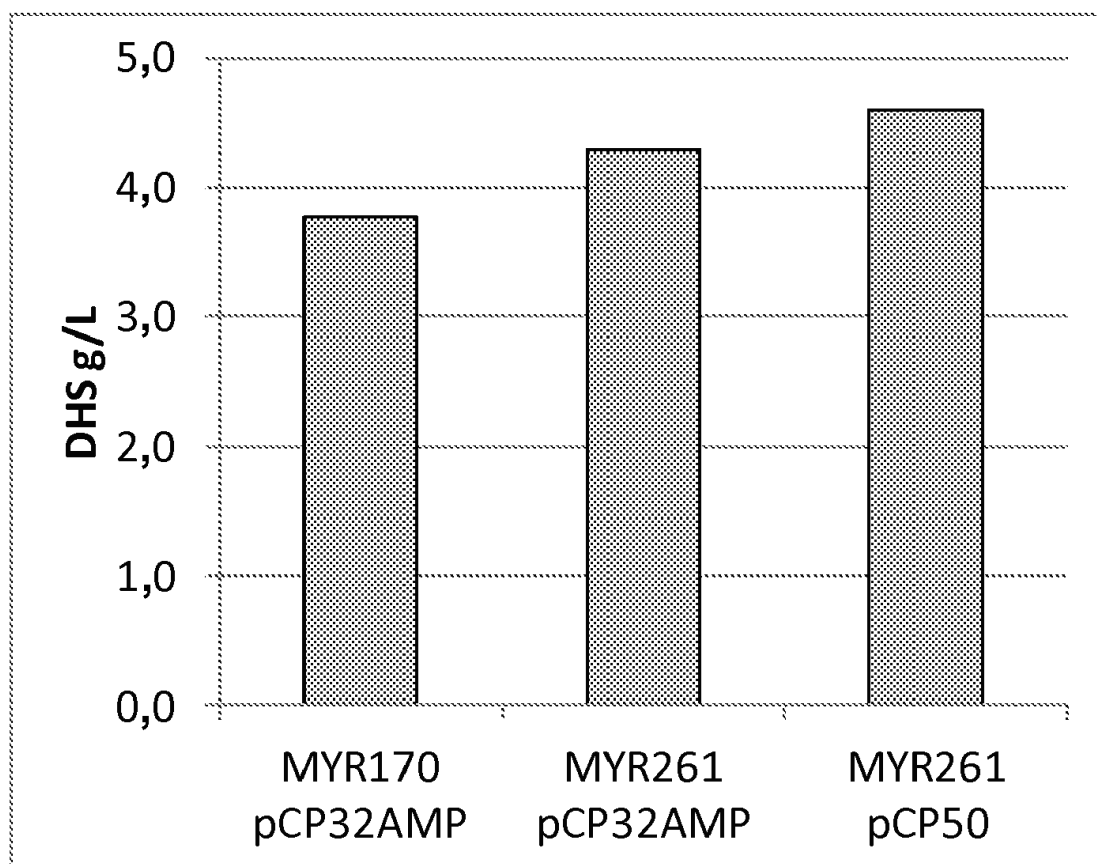


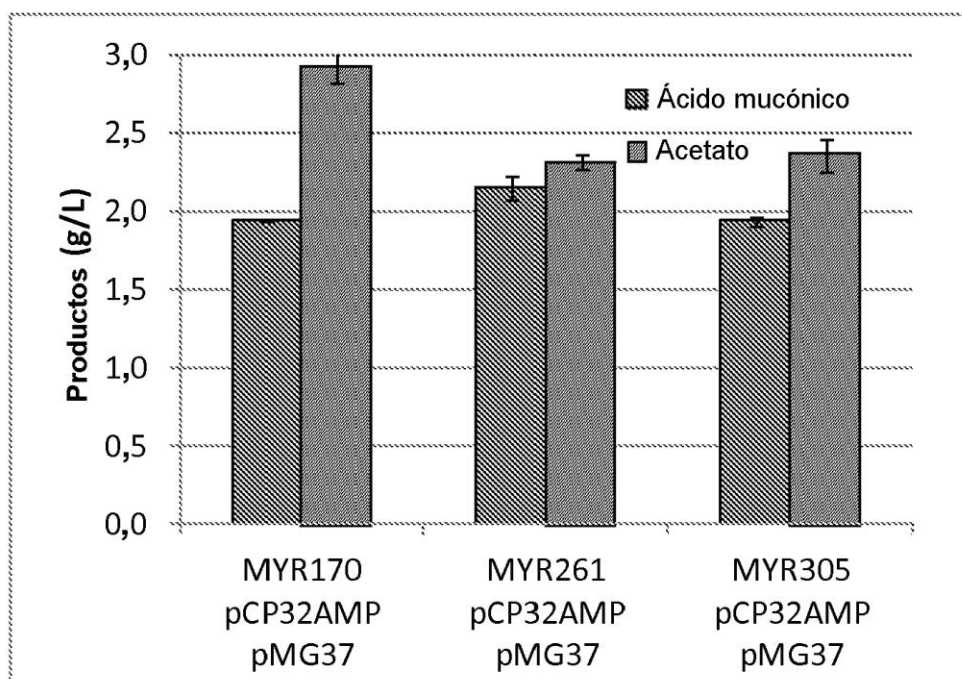
Figura 11

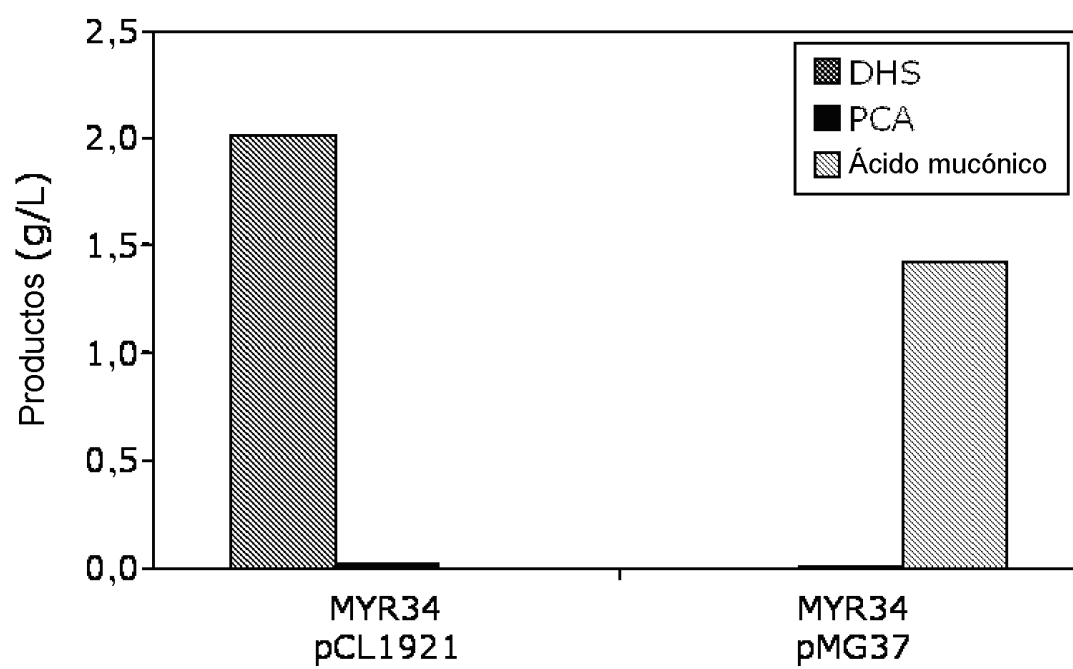
Figura 12

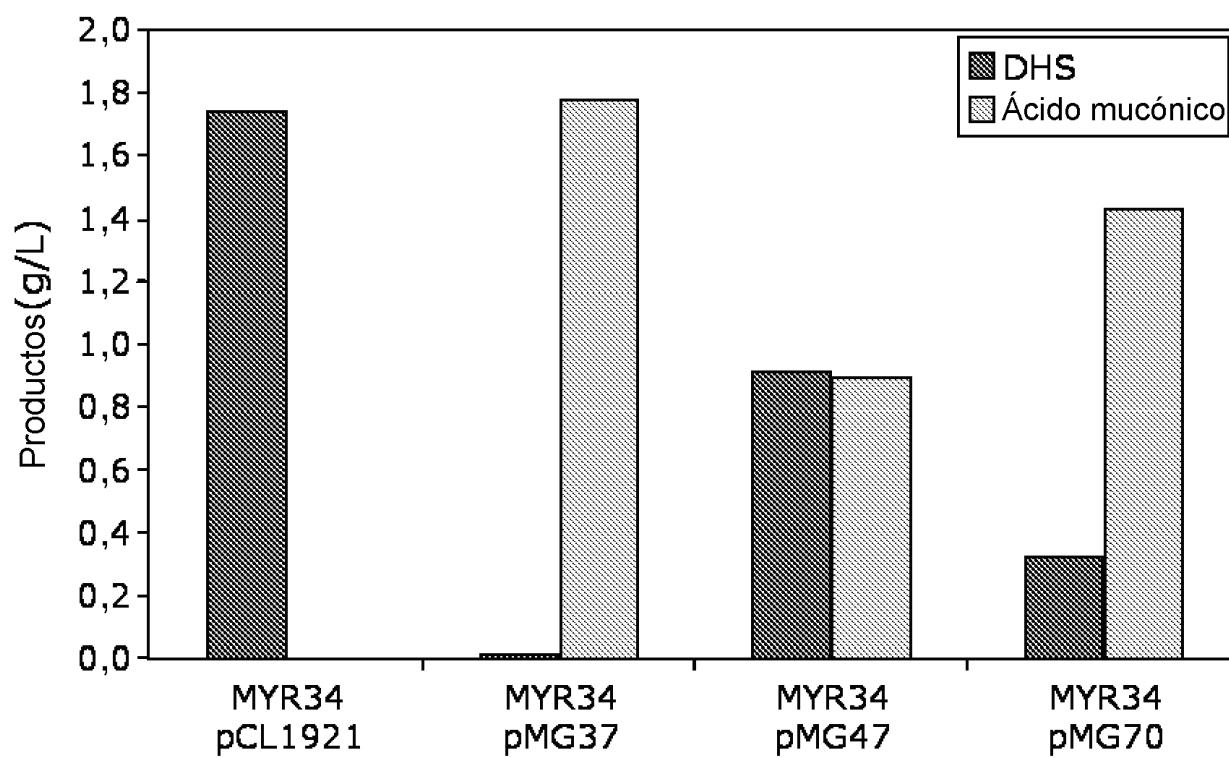
Figura 13

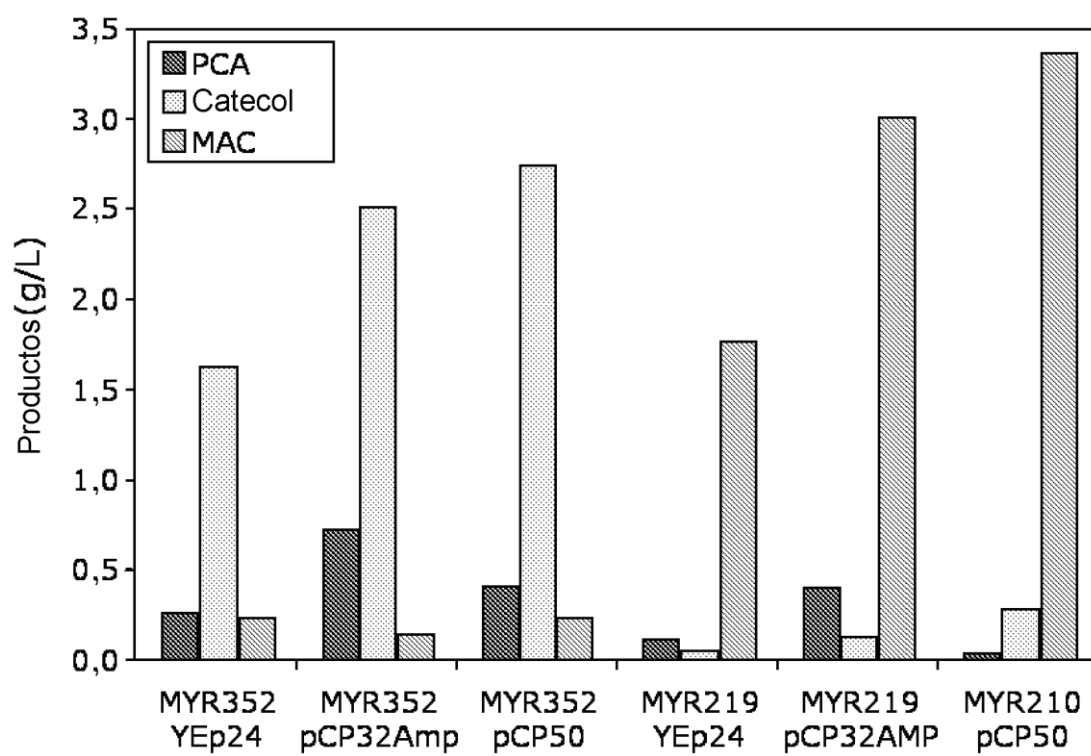
Figura 14

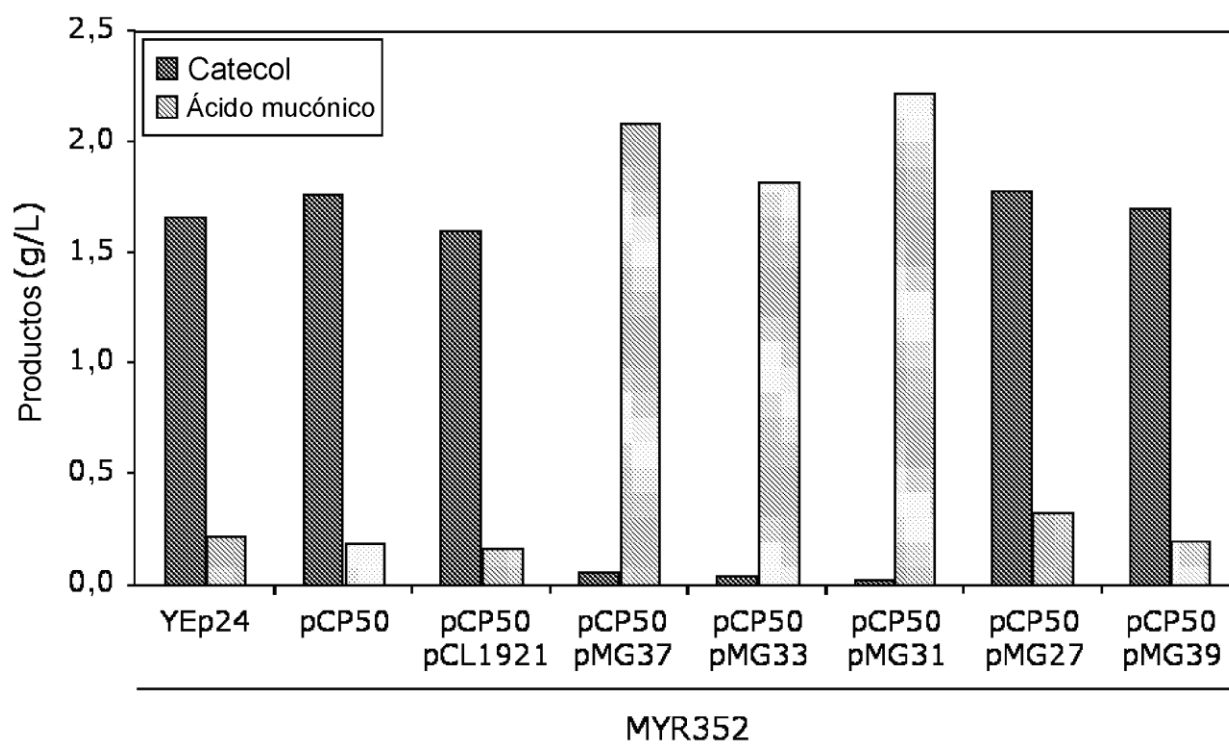
Figura 15

Figura 16

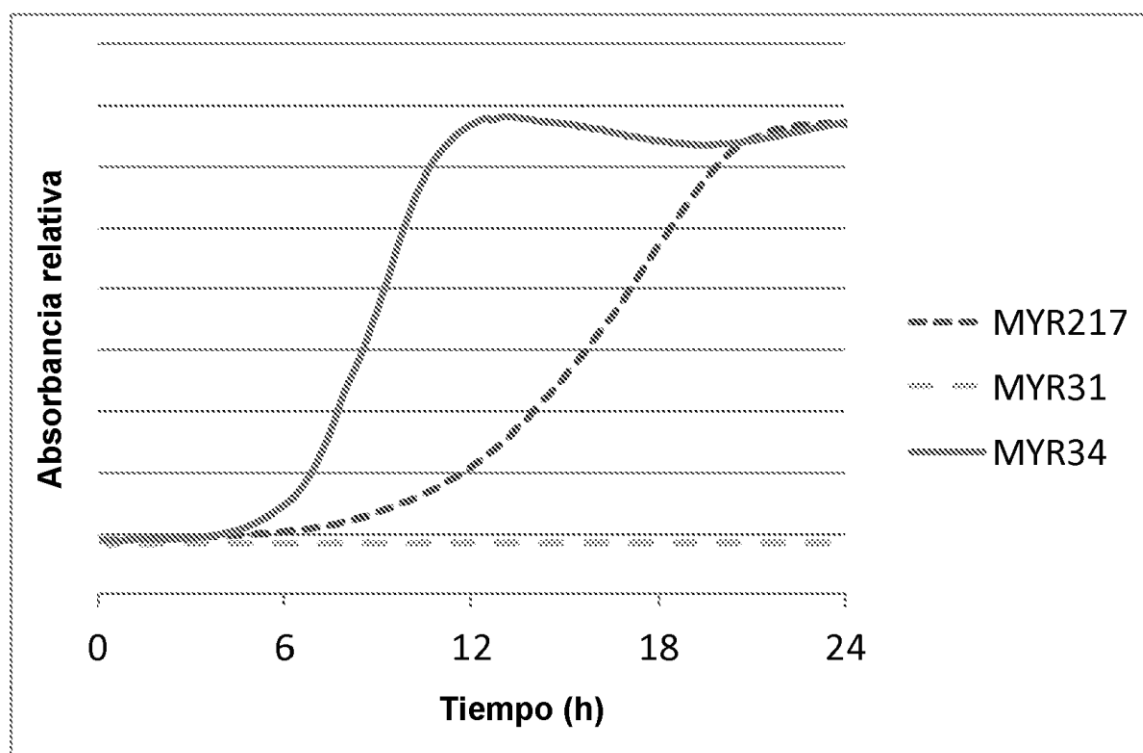


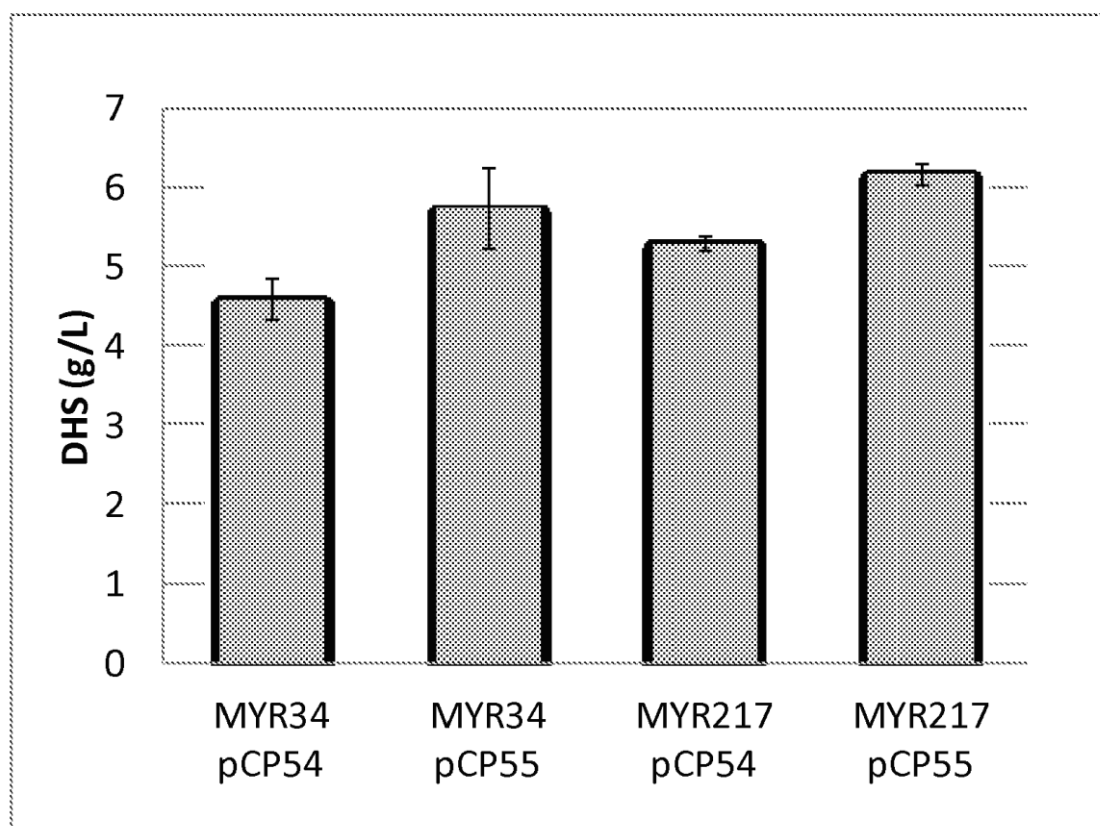
Figura 17

Figura 18

