

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 984**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12P 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2013 PCT/NZ2013/000095**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13180584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2013 E 13797982 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2855662**

54 Título: **Microorganismos recombinantes y sus usos**

30 Prioridad:

**01.06.2012 US 201261654412 P**

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

**05.07.2018**

73 Titular/es:

**LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED (100.0%)  
24 Balfour Road  
Parnell, Auckland 1052, NZ**

72 Inventor/es:

**CHEN, WENDY;  
LIEW, FUNGMIN y  
KOEPKKE, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 674 984 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

Microorganismos recombinantes y sus usos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a microorganismos recombinantes y a métodos para la producción de terpenos y/o sus precursores por fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO.

**Antecedentes de la invención**

10 Los terpenos son una clase diversa de compuestos químicos que se encuentran de forma natural compuestos de unidades de isopreno de cinco carbonos. Los derivados de terpeno incluyen terpenoides (también conocidos como isoprenoides) que se pueden formar por oxidación o reordenación de la cadena principal de carbonos o una serie de adiciones o transposiciones de grupos funcionales.

Los ejemplos de terpenos incluyen: isopreno (hemiterpeno C5), farneseno (sesquiterpenos C15 ), artemisinina (sesquiterpenos C15), citral (monoterpenos C10), carotenoides (tetraterpenos C40), mentol (monoterpenos C10 ), alcanfor (monoterpenos C10), y cannabinoides.

15 Los terpenos son productos comerciales valiosos usados en una serie diversa de industrias. Los usos de mayor tonelaje de los terpenos son como resinas, disolventes, fragancias y vitaminas. Por ejemplo, el isopreno se usa en la producción de caucho sintético (cis-1,4-poliisopreno) por ejemplo en la industria de los neumáticos; el farneseno se usa como un combustible de baja densidad energética usado para el transporte o como combustible para aviones; la artemisinina se usa como un fármaco para la malaria; y el citral, carotenoides, mentol, alcanfor y cannabinoides se usan en la fabricación de productos farmacéuticos, butadieno y como ingredientes aromáticos.

20 Los terpenos se pueden producir a partir de fuentes petroquímicas y de materias primas del terpeno, tales como la trementina. Por ejemplo, el isopreno se produce por vía petroquímica como un subproducto de la nafta o craqueo del petróleo en la producción de etileno. Muchos terpenos se extraen también en cantidades relativamente pequeñas de fuentes naturales. Sin embargo, estos métodos de producción son caros, no son sostenibles y a menudo causan problemas ambientales que incluyen la contribución al cambio climático.

25 Debido a la naturaleza extremadamente inflamable del isopreno, los métodos de producción conocidos requieren amplias protecciones para limitar el potencial de incendios y explosiones.

Un objeto de la invención es superar una o más de las desventajas de la técnica anterior, o al menos proporcionar al público un medio alternativo para producir terpenos y otros productos relacionados.

**Resumen de la invención**

30 La fermentación microbiana proporciona una opción alternativa para la producción de terpenos. Los terpenos son de naturaleza ubicua, por ejemplo, están implicados en la biosíntesis de la pared celular bacteriana, y son producidos por algunos árboles (por ejemplo, álamos) para proteger las hojas de la exposición a la luz UV. Sin embargo, no todas las bacterias comprenden la maquinaria celular necesaria para producir terpenos y/o sus precursores como productos metabólicos. Los acetógenos carboxidotróficos, tales como *C. autoethanogenum* o *C. ljungdahlii*, que  
35 pueden fermentar sustratos que comprenden monóxido de carbono para producir productos tales como etanol, no se sabe que produzcan y emitan terpenos y/o sus precursores como productos metabólicos. Además, la mayoría de las bacterias no se sabe que produzcan ningún terpeno que tenga valor comercial.

40 La invención proporciona en general, entre otros, métodos para la producción de uno o más terpenos y/o sus precursores por fermentación microbiana de un sustrato que comprende CO, y microorganismos recombinantes para usar en dichos métodos.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método de producción de uno o más terpenos y/o sus precursores, por fermentación microbiana, comprendiendo el método proporcionar un sustrato gaseoso que comprende CO a un biorreactor que contiene un cultivo de una bacteria acetógena carboxidotrófica recombinante y fermentar el cultivo para producir uno o más terpenos y/o sus precursores a partir del sustrato gaseoso,

45 en donde el terpeno o su precursor se selecciona del grupo que consiste en ácido mevalónico, pirofosfato de isopentenilo (IPP), pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), isopreno, pirofosfato de geranilo (GPP), pirofosfato de farnesilo (FPP), y farneseno.

En un segundo aspecto, la invención proporciona el método del aspecto 1, en donde el terpeno o su precursor se selecciona del grupo que consiste en pirofosfato de geranilo (GPP), pirofosfato de farnesilo (FPP), y farneseno.

50 En un tercer aspecto, la invención proporciona el método del aspecto 1, en donde la bacteria comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican:

(a) una enzima en una ruta del mevalonato seleccionada del grupo que consiste en tiolasa (EC 2.3.1.9); HMG-CoA sintasa (EC 2.3.3.10); HMG-CoA reductasa (EC 1.1.1.88); mevalonato quinasa (EC 2.7.1.36); fosfomevalonato quinasa (EC 2.7.4.2); y mevalonato difosfato descarboxilasa (EC 4.1.1.33);

5 (b) una enzima en una ruta de la DXS seleccionada del grupo que consiste en 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa DXS (EC:2.2.1.7); 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa DXR (EC:1.1.1.267); 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa IspD (EC:2.7.7.60); 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa IspE (EC:2.7.1.148); 2-C-metil-D-eritritol 2;4-ciclodifosfato sintasa IspF (EC:4.6.1.12); 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa IspG (EC:1.17.7.1); y 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (EC:1.17.1.2); o

10 (c) una enzima en una ruta de biosíntesis de terpenos seleccionada del grupo que consiste en geraniltranstransferasa Fps (EC:2.5.1.10); heptaprenil difosfato sintasa (EC:2.5.1.10); octaprenil-difosfato sintasa (EC:2.5.1.90); isopreno sintasa (EC 4.2.3.27); isopentenil-difosfato delta-isomerasa (EC 5.3.3.2); y farneseno sintasa (EC 4.2.3.46 / EC 4.2.3.47).

15 En un cuarto aspecto, la invención proporciona el método del aspecto 3, en donde la bacteria comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican una enzima en una ruta de biosíntesis de terpenos del grupo que consiste en geraniltranstransferasa Fps (EC:2.5.1.10); heptaprenil difosfato sintasa (EC:2.5.1.10); octaprenil-difosfato sintasa (EC:2.5.1.90); isopreno sintasa (EC 4.2.3.27); isopentenil-difosfato delta-isomerasa (EC 5.3.3.2); y farneseno sintasa (EC 4.2.3.46 / EC 4.2.3.47).

En un quinto aspecto, la invención proporciona el método del aspecto 1, en donde el terpeno o su precursor es isopreno, y la bacteria comprende un ácido nucleico que codifica una isopreno sintasa.

20 En un sexto aspecto, la invención proporciona el método del aspecto 1, en donde el terpeno o su precursor es el pirofosfato de isopentenilo (IPP), y en donde la bacteria comprende un ácido nucleico exógeno que codifica la isopentenil-difosfato delta-isomerasa.

En una realización, el uno o más terpenos y/o sus precursores, se seleccionan de ácido mevalónico, IPP, pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), isopreno, pirofosfato de geranilo (GPP), pirofosfato de farnesilo (FPP) y farneseno.

25 En realizaciones particulares de los aspectos del método, el sustrato gaseoso procede de un procedimiento industrial seleccionado del grupo que consiste en fabricación de productos de metales ferrosos, fabricación de productos de metales no ferrosos, refinación del petróleo, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de humo, producción de amoníaco, producción de metanol y fabricación de coque. En algunas realizaciones, el sustrato gaseoso es gas residual de acería o gas de síntesis.

30 En una realización, el sustrato típicamente contendrá una proporción principal de CO, tal como al menos de aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de CO en volumen, de 20% a 70% de CO en volumen, de 30% a 60% de CO en volumen, y de 40% a 55% de CO en volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 50% de CO, o aproximadamente 55% de CO, o aproximadamente 60% de CO en volumen.

35 En una realización, el sustrato comprende al menos uno de CO<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona el método del aspecto 1, en donde la bacteria comprende ácidos nucleicos exógenos que codifican la isopreno sintasa, isopentenil-difosfato delta-isomerasa, y 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa DXS.

40 Las bacterias acetógenas carboxidotróficas, genéticamente modificadas, aisladas adecuadas para cualquiera de los aspectos o realizaciones de la invención, se pueden seleccionar del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium jungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium metilotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii* y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

45 La invención también puede decirse de forma amplia, que consiste en las partes, elementos y características a los que se hace referencia o indicados en la memoria descriptiva de la solicitud, individual o colectivamente, en cualquiera o todas las combinaciones de dos o más de dichas partes, elementos o características.

## 50 Breve descripción de las figuras

Estos y otros aspectos de la presente invención, que deberían considerarse en todos sus nuevos aspectos, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, que se da solo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas.

Figura 1: Diagrama de ruta para la producción de terpenos, las dianas génicas descritas en esta solicitud se destacan con flechas en negrita.

Figura 2: Mapa genético del plásmido pMTL 85146-ispS

Figura 3: Mapa genético del plásmido pMTL 85246-ispS-idi

5 Figura 4: Mapa genético del plásmido pMTL 85246-ispS-idi-dxs

Figura 5: Resultados de la secuenciación para el plásmido pMTL 85246-ispS-idi-dxs

Figura 6: Comparación de energía para la producción de terpenos a partir de CO por la ruta de la DXS y el mevalonato.

Figura 7: Ruta del mevalonato

10 Figura 8: Imagen de electroforesis en gel de agarosa que confirma la presencia del plásmido de expresión de isopreno pMTL 85246-ispS-idi en transformantes *C. autoethanogenum*. Las bandas 1 y 20 muestran 100 pb Plus DNA Ladder. Las bandas 3-6, 9-12, 15-18 muestran la PCR con plásmidos aislados de 4 clones diferentes como molde, cada uno en el siguiente orden: colE1, ermB, e idi. Las bandas 2, 8, y 14 muestran la PCR sin moldes como control negativo, cada uno en el siguiente orden: colE1, ermB, e idi. Las bandas 7, 13, y 19 muestran la PCR con pMTL 85246-ispS-idi de *E. coli* como control positivo, cada uno en el siguiente orden: colE1, ermB, e idi.

Figura 9 - Plásmido de expresión del mevalonato pMTL8215-Pptaack-thIA-HMGS-Patp-HMGR

Figura 10 - Plásmido de expresión del isopreno pMTL 8314-Pptaack-thIA-HMGS-Patp-HMGR-Prnf MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispS

20 Figura 11 - Plásmido de expresión del farneseno pMTL8314-Pptaack-thIA-HMGS-Patp-HMGR-Prnf MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS

Figura 12 - Mapa genético del plásmido pMTL 85246-ispS-idi-dxs

Figura 13 - Gráfica de amplificación para el experimento de expresión de genes con *C. autoethanogenum* que lleva el plásmido pMTL 85146-ispS

25 Figura 14 - Gráfica de amplificación para el experimento de expresión de genes con *C. autoethanogenum* que lleva el plásmido pMTL 85246-ispS-idi

Figura 15 - Gráfica de amplificación para el experimento de expresión de genes con *C. autoethanogenum* que lleva el plásmido pMTL 85246-ispS-idi-dxs

Figura 16 - Comprobación por PCR de la presencia del plásmido pMTL8314Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS. Tamaño de banda esperado 1584 pb. Marcador de ADN 1 kb DNA ladder de Fermentas.

30 Figura 17 - Curva de crecimiento para *C. autoethanogenum* transformado que lleva el plásmido pMTL8314Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS

35 Figura 18 - Datos de RT-PCR que muestran la expresión de los genes de la mevalonato quinasa (MK SEQ ID NO: 51), fosfomevalonato quinasa (PMK SEQ ID NO: 52), mevalonato difosfato descarboxilasa (PMD SEQ ID NO: 53), isopentil-difosfato delta-isomerasa (idi SEQ ID NO: 54), geraniltranstransferasa (ispA SEQ ID NO: 56) y farneseno sintasa (FS SEQ ID NO: 57).

40 Figura 19 - Detección por GC-MS y confirmación de la presencia de farneseno en cultivos enriquecidos en mevalonato 1 mM que llevan pMTL8314Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS. Cromatograma de GC-MS barrido para picos que contienen iones con una masa de 93. El cromatograma 1 y 2 son *C. autoethanogenum* transformado, 3 es referencia de beta-farneseno realizado al mismo tiempo que las muestras de *C. autoethanogenum*. 4 es *E. coli* que lleva los plásmidos pMTL8314Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS cultivada en glucosa M9 que muestra la producción de alfa-farneseno y 5 es la referencia de beta-farneseno realizado al mismo tiempo que las muestras de *E. coli*. La diferencia en el tiempo de retención entre las muestras de *E. coli* y *C. autoethanogenum* se debe a cambios minoritarios del instrumento. Sin embargo, la diferencia en el tiempo de retención entre la referencia de beta-farneseno y el alfa-farneseno producido es exactamente la misma en ambos casos, lo cual junto con la correspondencia en los espectros de masas confirma la producción de alfa-farneseno en *C. autoethanogenum*.

Figura 20 - Espectros de MS para los picos marcados 1A y 2A en la figura 19. Los espectros de masas se corresponden con los espectros de la base de datos NIST (figura 21) que confirman que el pico es alfa-farneseno.

Figura 21 - Espectro de MS del alfa-farneseno de la base de datos de espectros de masas de NIST.

**Descripción detallada de la invención**

- 5 A continuación se da una descripción de la presente invención, que incluye realizaciones preferidas de la misma, dadas en términos generales. La invención se elucida adicionalmente en la descripción dada bajo el encabezado "Ejemplos" más adelante en la presente memoria, que proporciona datos experimentales que respaldan la invención, ejemplos específicos de diferentes aspectos de la invención y medios ilustrativos de llevar a cabo la invención.
- 10 Los autores de la invención sorprendentemente han podido modificar genéticamente un microorganismo acetógeno carboxidotrófico para producir terpeno y sus precursores que incluyen isopreno y farneseno por fermentación de un sustrato que comprende CO. Esto ofrece un medio de producción alternativo de estos productos que puede tener beneficios frente a los métodos actuales para su producción. Además, ofrece un medio de uso del monóxido de carbono de procedimientos industriales que de lo contrario se liberaría a la atmósfera y contaminaría el entorno.
- Como se menciona en la presente memoria, un "caldo de fermentación" es un medio de cultivo que comprende al menos un medio nutriente y células bacterianas.
- 15 Como se menciona en la presente memoria, un "microorganismo lanzadera" es un microorganismo en el que se expresa una enzima metiltransferasa y es distinta del microorganismo de destino.
- Como se menciona en la presente memoria, un "microorganismo destino" es un microorganismo en el que son expresados los genes incluidos en una construcción/vector de expresión y es distinto del microorganismo lanzadera.
- La expresión "producto de fermentación principal" se pretende que signifique el producto de fermentación que es producido en la mayor concentración y/o rendimiento.
- 20 Las expresiones "aumento de la eficacia", "mayor eficacia" y similares, cuando se usan en relación con un proceso de fermentación incluyen, pero no se limitan, a aumentar uno o más de la velocidad de crecimiento de los microorganismos que catalizan la fermentación, la velocidad de crecimiento y/o producción de producto en concentraciones de producto elevadas, el volumen de producto deseado producido por volumen de sustrato consumido, la velocidad de producción o nivel de producción del producto deseado, y la proporción relativa del producto deseado producido comparado con otros subproductos de la fermentación.
- 25 Debe entenderse que la frase "sustrato que comprende monóxido de carbono" y las expresiones similares incluyen cualquier sustrato en el que haya disponible monóxido de carbono para una o más cepas de bacterias para el crecimiento y/o la fermentación, por ejemplo.
- La frase "sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono" y frases y términos similares, incluyen cualquier gas que contiene un nivel de monóxido de carbono. En algunas realizaciones, el sustrato contiene al menos de aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de CO en volumen, de 20% a 70% de CO en volumen, de 30% a 60% de CO en volumen y de 40% a 55% de CO en volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 50% CO, o aproximadamente 55% CO, o aproximadamente 60% CO en volumen.
- 30 Aunque no es necesario que el sustrato contenga hidrógeno, la presencia de H<sub>2</sub> no debe ser perjudicial para la formación del producto de acuerdo con los métodos de la invención. En realizaciones particulares, la presencia de hidrógeno da como resultado una eficacia total mejorada de producción de alcohol. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el sustrato puede comprender una relación de aproximadamente 2:1, o 1:1, o 1:2 de H<sub>2</sub>:CO. En una descripción, el sustrato comprende aproximadamente 30% o menos H<sub>2</sub> en volumen, 20% o menos H<sub>2</sub> en volumen, aproximadamente 15% o menos H<sub>2</sub> en volumen o aproximadamente 10% o menos H<sub>2</sub> en volumen. En otras descripciones, la corriente de sustrato comprende concentraciones bajas de H<sub>2</sub>, por ejemplo menos de 5%, o menos de 4%, o menos de 3%, o menos de 2%, o menos de 1%, o está sustancialmente exenta de hidrógeno. El sustrato también puede contener algo de CO<sub>2</sub> por ejemplo, tal como de aproximadamente 1% a aproximadamente 80% de CO<sub>2</sub> en volumen, o de 1% a aproximadamente 30% de CO<sub>2</sub> en volumen. En una descripción el sustrato comprende menos o igual a aproximadamente 20% de CO<sub>2</sub> en volumen. En descripciones particulares, el sustrato comprende menos de o igual a aproximadamente 15% de CO<sub>2</sub> en volumen, menos de o igual a aproximadamente 10% de CO<sub>2</sub> en volumen, menos de o igual a aproximadamente 5% de CO<sub>2</sub> en volumen o sustancialmente no comprende CO<sub>2</sub>.
- 35 En la siguiente descripción, las realizaciones de la invención se describen en términos de suministro y fermentación de un "sustrato gaseoso que contiene CO". Sin embargo, debe apreciarse que el sustrato gaseoso se puede proporcionar en formas alternativas. Por ejemplo, el sustrato gaseoso que contiene CO se puede proporcionar disuelto en un líquido. Esencialmente, se satura un líquido con un gas que contiene monóxido de carbono y después se añade el líquido al biorreactor. Esto se puede lograr usando metodología convencional. A modo de ejemplo, se podría usar un generador de dispersión de microburbujas (Hensirisak et. al. "Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation"; *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volumen 101, Número 3 / Octubre, 2002). A modo de ejemplo adicional, el sustrato gaseoso que contiene CO se puede adsorber en un soporte sólido.
- 50 Dichos métodos alternativos están englobados por el uso de la expresión "sustrato que contiene CO" y similares.
- 55

En realizaciones particulares de la invención, el sustrato gaseoso que contiene CO es un gas residual o de descarga industrial. Los "gases residuales o de descarga industrial" deben considerarse de forma amplia que incluyen cualesquiera gases que comprenden CO producido por un procedimiento industrial, e incluyen gases producidos como resultados de la fabricación de productos metálicos ferrosos, fabricación de productos no ferrosos, procedimientos de refinado del petróleo, gasificación de carbón, gasificación de biomasa, producción de energía eléctrica, producción de negro de humo y fabricación de coque. Se pueden proporcionar ejemplos adicionales en otra parte en la presente memoria.

Salvo que el contexto requiera otra cosa, las frases "fermentación", "procedimiento de fermentación" o "reacción de fermentación" y similares, como se usan en la presente memoria, se pretende que abarquen tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis de producto del procedimiento. Como se describirá además en la presente memoria, en algunas realizaciones el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, la adición de metales o composiciones a la reacción de fermentación debe entenderse que incluye la adición a uno o ambos de estos reactores.

El término "biorreactor" incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o torres o disposición de tuberías, que incluye el reactor de tanque agitado continuo (CSTR), el reactor celular inmovilizado (ICR), reactor de rejilla (TBR), columna de burbujas, fermentador de gas, mezclador estático u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para el contacto gas-líquido. En algunas realizaciones, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, cuando se menciona la adición de sustrato al biorreactor o reacción de fermentación debe entenderse que incluye adición a cualquiera o ambos de estos reactores donde sea apropiado.

Los "ácidos nucleicos exógenos" son ácidos nucleicos que se originan fuera del microorganismo en el que se introducen. Los ácidos nucleicos exógenos se pueden obtener de cualquier fuente adecuada, que incluye, pero no se limita al microorganismo en el que se van a introducir (por ejemplo, en un microorganismo parental del que deriva el microorganismo recombinante), cepas o especies de microorganismos que difieren del organismo en el que se van a introducir, o se pueden crear de forma artificial o recombinante. En una realización, los ácidos nucleicos exógenos representan secuencias de ácido nucleico presentes de forma natural dentro del microorganismo en el que se van a introducir, y se introducen para aumentar la expresión o sobreexpresar un gen particular (por ejemplo, aumentando el número de copias de la secuencia (por ejemplo un gen) o introduciendo un promotor fuerte o constitutivo para aumentar la expresión. En otra realización, los ácidos nucleicos exógenos representan secuencias de ácido nucleico que no se encuentran naturalmente dentro del microorganismo al que han de ser introducidas y permiten la expresión de un producto que no se encuentra naturalmente dentro del microorganismo o la mayor expresión de un gen natural del microorganismo (por ejemplo, en el caso de la introducción de un elemento regulador tal como un promotor). El ácido nucleico exógeno se puede adaptar para integrarlo en el genoma del microorganismo al que se va a introducir o para permanecer en un estado extracromosómico.

"Exógeno" también se puede usar para referirse a proteínas. Esto se refiere a una proteína que no está presente en el microorganismo parental del cual deriva el microorganismo recombinante.

El término "endógeno" como se usa en la presente memoria en relación con un microorganismo recombinante y un ácido nucleico o proteína, se refiere a cualquier ácido nucleico o proteína que está presente en un microorganismo parental del que deriva el microorganismo recombinante.

Debe apreciarse que la invención se puede poner en práctica usando ácidos nucleicos cuya secuencia varía de las secuencias específicamente ejemplificadas en la presente memoria siempre que realicen sustancialmente la misma función. Para secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína o péptido esto significa que la proteína codificada, o el péptido, tiene sustancialmente la misma función. Para secuencias de ácido nucleico que representan secuencias promotoras, la secuencia variante tendrá la capacidad de promover la expresión de uno o más genes. Tales ácidos nucleicos se pueden denominar en la presente memoria "variantes funcionalmente equivalentes". A modo de ejemplo, las variantes funcionalmente equivalentes de un ácido nucleico incluyen variantes alélicas, fragmentos de un gen, genes que incluyen mutaciones (eliminación, inserción, sustituciones de nucleótidos y similares) y/o polimorfismos y similares. Los genes homólogos de otros microorganismos también se pueden considerar como ejemplos de variantes funcionalmente equivalentes de las secuencias ilustradas específicamente en la presente memoria. Estos incluyen genes homólogos en especies tales como *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* y *C. saccharoperbutylacetonicum*, de los cuales se encuentran detalles disponibles al público en sitios de internet tales como Genbank o NCBI. La frase "variantes funcionalmente equivalentes" también debe considerarse que incluye ácidos nucleicos cuya secuencia varía como resultado de la optimización de codones para un organismo particular. Las "variantes funcionalmente equivalentes" de un ácido nucleico de la presente invención tendrán preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 70%, preferiblemente aproximadamente 80%, más preferiblemente aproximadamente 85%, preferiblemente aproximadamente 90%, preferiblemente aproximadamente 95% o más con el ácido nucleico identificado.

También debe apreciarse que la invención se puede poner en práctica usando polipéptidos cuya secuencia varía de las secuencias de aminoácidos específicamente ejemplificadas en la presente memoria. Estas variantes se pueden

denominar en la presente memoria "variantes funcionalmente equivalentes". Una variante funcionalmente equivalente de una proteína o un péptido incluye aquellas proteínas o péptidos que comparten al menos el 40%, preferiblemente el 50%, preferiblemente el 60%, preferiblemente el 70%, preferiblemente el 75%, preferiblemente el 80%, preferiblemente el 85%, preferiblemente el 90%, preferiblemente el 95% o mayor de identidad de aminoácidos con la proteína o el péptido identificado y tiene sustancialmente la misma función que el péptido o la proteína de interés. Dichas variantes incluyen dentro de su alcance fragmentos de una proteína o un péptido en donde el fragmento comprende una forma truncada del polipéptido en el que las eliminaciones pueden ser de 1 a 5, a 10, a 15, a 20, a 25 aminoácidos, y pueden extenderse desde el resto 1 al 25 en cualquiera de los extremos del polipéptido, y en donde las eliminaciones pueden ser de cualquier longitud dentro de la región; o puede estar en un lugar interno. También se deben tomar variantes funcionalmente equivalentes de los polipéptidos específicos de la presente invención para incluir polipéptidos expresados por genes homólogos en otras especies de bacterias, por ejemplo como se ejemplifica en el párrafo anterior.

"Sustancialmente la misma función" como se usa en la presente memoria, pretende significar que el ácido nucleico o polipéptido es capaz de realizar la función del ácido nucleico o polipéptido del que es una variante. Por ejemplo, una variante de una enzima de la invención será capaz de catalizar la misma reacción que esa enzima. Sin embargo, no debe entenderse que la variante tiene el mismo nivel de actividad que el polipéptido o ácido nucleico del que es una variante.

Se puede evaluar si una variante funcionalmente equivalente tiene sustancialmente la misma función que el ácido nucleico o polipéptido del que es una variante usando cualquier número de métodos conocidos. Sin embargo, a modo de ejemplo, los métodos descritos por Silver et al. (1991, *Plant Physiol.* 97: 1588-1591) o Zhao et al. (2011, *Appl Microbiol Biotechnol.* 90:1915-1922) para la enzima isopreno sintasa, por Green et al. (2007, *Photochemistry*; 68:176-188) para la enzima farneseno sintasa, por Kuzuyama et al. (2000, *J. Bacteriol.* 182, 891-897) para la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa Dxs, por Berndt y Schlegel (1975, *Arch. Microbiol.* 103, 21-30) o por Stim-Herndon et al. (1995, *Gene* 154: 81-85) para la tiolasa, por Cabano et al. (1997, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 499-505) para la HMG-CoA sintasa, por Ma et al. (2011, *Metab. Engin.*, 13:588-597) para la enzima HMG-CoA reductasa y mevalonato quinasa, por Herdendorf y Mizioro (2007, *Biochemistry*, 46: 11780-8) para la fosfomevalonato quinasa, y por Krepiy et al. (2004, *Protein Sci.* 13: 1875-1881) para la mevalonato difosfato descarboxilasa. También se pueden identificar genes para la ruta de la DXS y el mevalonato usando inhibidores tales como fosmidomicina o mevinolina, como describen Trutko et al. (2005, *Microbiology* 74: 153-158).

"Sobreexpresar" o "exceso de expresión" y términos y frases similares, cuando se usan en relación con la invención deben considerarse de forma amplia para incluir cualquier aumento de expresión de una o más proteínas (incluyendo la expresión de uno o más ácidos nucleicos que las codifican) comparado con el nivel de expresión de la proteína (incluyendo los ácidos nucleicos) de un microorganismo parental en las mismas condiciones. No debe considerarse que significa que la proteína (o ácido nucleico) se expresa en cualquier nivel particular.

Un "microorganismo parental" es un microorganismo usado para generar un microorganismo recombinante de la invención. El microorganismo parental puede ser uno que se encuentre en la naturaleza (es decir, un microorganismo de tipo natural) o uno que se ha modificado previamente pero que no expresa o sobreexpresa una o más de las enzimas que son el objeto de la presente invención. Por consiguiente, los microorganismos recombinantes de la invención se pueden haber modificado para expresar o sobreexpresar una o más enzimas que no se expresaban o sobreexpresaban en el microorganismo parental.

Los términos "construcciones" o "vectores" de ácido nucleico y términos similares, debe considerarse de forma amplia que incluyen cualquier ácido nucleico (incluyendo ADN o ARN) adecuado para usar como un vehículo para transferir material genético a una célula. Se debe considerar que los términos incluyen plásmidos, virus (incluyendo bacteriófagos), cósmidos y cromosomas artificiales. Las construcciones o vectores pueden incluir uno o más elementos reguladores, un origen de replicación, un sitio de multiclonación y/o un marcador seleccionable. En una descripción, las construcciones o vectores están adaptados para permitir la expresión de uno o más genes codificados por la construcción o el vector. Las construcciones o vectores de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos desnudos así como ácidos nucleicos formulados con uno o más agentes para facilitar el suministro a una célula (por ejemplo, ácido nucleico conjugado con liposoma, un organismo en el que está contenido el ácido nucleico).

Un "terpeno" como se menciona en la presente memoria, debe considerarse de forma amplia para incluir cualquier compuesto formado por unidades de isopreno C<sub>5</sub> unidas entre sí, que incluyen terpenos simples y complejos y compuestos terpénicos que contienen oxígeno, tales como alcoholes, aldehídos y cetonas. Los terpenos simples se encuentran en los aceites esenciales y resinas de plantas tales como coníferas. Los terpenos más complejos incluyen los terpenoides y vitamina A, pigmentos carotenoides (tales como licopeno), escualeno y caucho. Los ejemplos de monoterpenos incluyen, pero no se limitan a isopreno, pineno, nerol, citral, alcanfor, mentol, limoneno. Los ejemplos de sesquiterpenos incluyen, pero no se limitan a nerolidol, farnesol. Los ejemplos de diterpenos incluyen pero no se limitan a fitol, vitamina A<sub>1</sub>. El escualeno es un ejemplo de un triterpeno, y el caroteno (provitamina A<sub>1</sub>) es un tetraterpeno.

Un "precursor de terpeno" es un compuesto o compuesto intermedio producido durante la reacción para formar un terpeno partiendo de acetil-CoA y opcionalmente piruvato. El término se refiere a un compuesto precursor o compuesto intermedio encontrado en la ruta del mevalonato (MVA) y opcionalmente en la ruta de la DXS, así como precursores más abajo de terpenos de cadena más larga, tales como FPP y GPP. En realizaciones particulares, incluye, pero no se limita al ácido mevalónico, IPP, pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), pirofosfato de geranilo (GPP) y pirofosfato de farnesilo (FPP).

La ruta de la "DXS" es una ruta enzimática del piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato a DMAPP o IPP. Se conoce también como la ruta de la desoxixilulosa-5-fosfato (DXP/DXPS/DOXP o DXS)/metileritritol-fosfato (MEP).

La "ruta del mevalonato (MVA)" es la ruta enzimática desde el acetil-CoA a IPP.

## 10 **Microorganismos**

Se conocen dos rutas de producción de terpenos, la ruta de la desoxixilulosa-5-fosfato (DXP/DXPS/DOXP o DXS)/metileritritol-fosfato (MEP) (Hunter et al., 2007, *J. Biol. Chem.* 282: 21573-77) que parte del piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P), los dos compuestos intermedios clave en la glucólisis, y la ruta del mevalonato (MVA) (Miziorko, 2011, *Arch Biochem Biophys*, 505: 131-143) que parte de la acetil-CoA. Se ha investigado en muchas clases diferentes de microorganismos la presencia de cualquiera de estas rutas (Lange et al., 2000, *PNAS*, 97: 13172-77; Trutko et al., 2005, *Microbiology*, 74: 153-158; Julsing et al., 2007, *Appl Microbiol Biotechnol*, 75: 1377-84), pero no en acetógenos carboxidotróficos. Se encontró por ejemplo, que la ruta de la DXS estaba presente en *E. coli*, *Bacillus*, o *Mycobacterium*, mientras que la ruta del mevalonato está presente en levaduras *Saccharomyces*, *Cloroflexus*, o *Myxococcus*.

20 Los autores de la invención analizaron en los genomas de los acetógenos carboxidotróficos *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* la presencia de cualquiera de las dos rutas. Se identificaron todos los genes de la ruta de la DXS en *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii* (tabla 1), mientras que la ruta del mevalonato está ausente. Además, no se sabe que los acetógenos carboxidotróficos tales como *C. autoethanogenum* o *C. ljungdahlii* produzcan ningún terpeno como productos finales metabólicos.

25 Tabla 1: Genes de la biosíntesis de terpenos de la ruta de DXS identificados en *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii*:

Gen/Enzima	<i>C. autoethanogenum</i>	<i>C. ljungdahlii</i>
1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa DXS (EC:2.2.1.7)	SEQ ID NO: 1-2	YP_003779286.1; GI: 300854302, CLJU_c11160
1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa DXR (EC:1.1.1.267)	SEQ ID NO: 3-4	YP_003779478.1; GI: 300854494, CLJU_c13080
2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa lspD (EC:2.7.7.60)	SEQ ID NO: 5-6	YP_003782252.1 GI: 300857268, CLJU_c41280
4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa lspE (EC:2.7.1.148)	SEQ ID NO: 7-8	YP_003778403.1; GI: 300853419, CLJU_c02110
2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa lspF (EC:4.6.1.12)	SEQ ID NO: 9-10	YP_003778349.1; GI: 300853365, CLJU_c01570
4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa lspG (EC:1.17.7.1)	SEQ ID NO: 11-12	YP_003779480.1; GI: 300854496, CLJU_c13100



4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (EC:1.17.1.2)	SEQ ID NO: 13-14	YP_003780294.1; GI: 300855310, CLJU_c21320
---	------------------	--

También se identificaron genes para la síntesis corriente abajo a partir de unidades de isopreno, en ambos organismos (tabla 2).

Gen/Enzima	<i>C. autoethanogenum</i>	<i>C. jungdahlii</i>
geraniltranstransferasa Fps (EC:2.5.1.10)	SEQ ID NO: 15-16	YP_003779285.1; GI: 300854301, CLJU_c11150
heptaprenil difosfato sintasa (EC:2.5.1.10)	SEQ ID NO: 17-18	YP_003779312.1; GI: 300854328, CLJU_c11420
octaprenil-difosfato sintasa [EC:2.5.1.90]	SEQ ID NO: 19-20	YP_003782157.1; GI: 300857173, CLJU_c40310

5 Los terpenos son compuestos con alta densidad energética, y su síntesis requiere que la célula invierta energía en forma de trifosfatos de nucleósidos tales como ATP. El uso de azúcar como un sustrato requiere que la glucólisis suministre suficiente energía para dar varias moléculas de ATP. La producción de terpenos y/o sus precursores por la ruta de la DXS usando azúcar como un sustrato procede de una forma relativamente directa debido a la disponibilidad del piruvato y el D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P), procediendo el G3P de azúcares pentosas C5 y hexosas C6. Estas moléculas C5 y C6 se convierten, por lo tanto, de forma relativamente fácil en unidades de isopreno C5 de las cuales están compuestas los terpenos.

15 Para los acetógenos anaerobios que usan un sustrato C1 como CO o CO<sub>2</sub>, es más difícil sintetizar moléculas largas tales como hemiterpenoides a partir de unidades C1. Esto es especialmente cierto para terpenos de cadenas más largas como los monoterpenos C10, sesquiterpenos C15 o tetraterpenos C40. Hasta la fecha el producto con más átomos de carbono descrito en acetógenos (tanto organismos naturales como recombinantes) son los compuestos C4 butanol (Köpke et al., 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22: 320-325; Schiel-Bengelsdorf y Dürre, 2012, *FEBS Letters*: 10.1016/j.febslet.2012.04.043; Köpke et al., 2011, *Proc. Nat. Sci. U.S.A.* 107: 13087-92; patente de EE.UU. 2011/0236941) y 2,3-butanodiol (Köpke et al., 2011, *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5467-75). Los autores de la invención han mostrado que sorprendentemente se pueden producir de forma anaerobia estas moléculas de terpeno de cadena más larga usando de materia prima C1 el CO a través del intermedio acetil-CoA.

25 La energía de la ruta de Wood-Ljungdahl de los acetógenos anaerobios, está emergiendo ahora, pero a diferencia de las condiciones de crecimiento aerobias o glucólisis de organismos fermentadores de azúcar, no se gana ATP en la ruta Wood-Ljungdahl por la fosforilación a nivel del sustrato, de hecho, la activación del CO<sub>2</sub> a formiato requiere realmente una molécula de ATP y se requiere un gradiente de membrana. Los autores de la invención indican que es importante que una ruta para la formación de producto sea energéticamente eficiente. Los autores de la invención indican que en acetógenos el sustrato CO o CO<sub>2</sub> es canalizado directamente en acetil-CoA, lo que representa la ruta más directa a terpenos y/o sus precursores, en especial cuando se compara con los sistemas basados en azúcar, requiriéndose solo seis reacciones (Fig. 1). Aunque hay menos ATP disponible en los acetógenos carboxidotróficos, los autores de la invención creen que esta ruta más directa puede mantener un flujo metabólico mayor (debido a la mayor fuerza motriz química de las reacciones intermedias). Un flujo metabólico altamente eficaz es importante ya que varios productos intermedios en la ruta de biosíntesis de terpenos, tales como los compuestos intermedios clave mevalonato y FPP, son tóxicos para la mayor parte de las bacterias cuando no se renuevan eficazmente. A pesar de tener una mayor disponibilidad de ATP, este problema de la toxicidad de los compuestos intermedios, puede ser un cuello de botella en la producción de terpenos a partir de azúcares.

35 Cuando se compara la energía de la producción de los precursores de terpenos IPP y DMAPP a partir de CO (Fig. 6) por la ruta del mevalonato frente a la ruta de la DXS, los autores de la invención observaron que la ruta del mevalonato requiere menos trifosfatos de nucleósidos como ATP, menos equivalentes de reducción, y también es

más directa cuando se compara con la ruta de la DXS, siendo necesarias solo seis etapas de reacción a partir de la acetil-CoA. Esto proporciona ventajas en la velocidad de las reacciones y flujos metabólicos y aumenta la eficiencia energética global. Además, el menor número de enzimas requeridas simplifica el método de recombinación requerido para producir un microorganismo recombinante.

5 No se han identificado acetógenos con una ruta del mevalonato, pero los autores de la invención han mostrado que se puede introducir la ruta del mevalonato y opcionalmente la ruta de la DXS en un acetógeno carboxidotrófico tal como *Clostridium autoethanogenum* o *C. jungdahlii* para producir eficazmente terpenos y/o sus precursores a partir del sustrato de C1 carbono CO. Contemplan que esto se puede aplicar a todos los microorganismos acetógenos carboxidotróficos.

10 Además, no se ha mostrado nunca que la producción de terpenos y/o sus precursores fuera posible usando microorganismos recombinantes en condiciones anaerobias. La producción anaerobia de isopreno tiene la ventaja de proporcionar un entorno de trabajo más seguro porque el isopreno es extremadamente inflamable en presencia de oxígeno y tiene un límite de inflamabilidad inferior (LFL) de 1,5-2,0 % y un límite de inflamabilidad superior (UFL) de 2,0-12 % a temperatura ambiente y presión atmosférica. Puesto que no se pueden producir llamas en ausencia de oxígeno, los autores de la invención creen que un procedimiento de fermentación anaerobia es conveniente, ya que sería más seguro a lo largo de todos los intervalos de concentraciones de producto, composiciones de gases, temperaturas y presiones.

15 Como se ha descrito en lo que antecede, la invención proporciona un microorganismo recombinante capaz de producir uno o más terpenos y/o sus precursores, y opcionalmente uno o más de otros productos, por fermentación de un sustrato que comprende CO.

20 En una realización adicional, el microorganismo está adaptado para:

expresar una o más enzimas exógenas de la ruta del mevalonato (MVA) y/o sobreexpresar una o más enzimas endógenas de la ruta del mevalonato (MVA); y

25 a) expresar una o más enzimas exógenas de la ruta de la DXS y/o sobreexpresar una o más enzimas endógenas de la ruta de la DXS.

En una descripción, el microorganismo parental del que deriva el microorganismo recombinante es capaz de fermentar un sustrato que comprende CO para producir acetil-CoA, pero no de convertir la acetil-CoA en ácido mevalónico o pirofosfato de isopentenilo (IPP) y el microorganismo recombinante está adaptado para expresar una o más enzimas implicadas en la ruta del mevalonato.

30 El microorganismo puede adaptarse para expresar o sobreexpresar la una o más enzimas mediante cualquier número de métodos recombinantes, incluyendo, por ejemplo, aumentando la expresión de genes naturales dentro del microorganismo (por ejemplo, introduciendo un promotor más fuerte o constitutivo para dirigir la expresión de un gen), aumentando el número de copias de un gen que codifica una enzima particular mediante la introducción de ácidos nucleicos exógenos que codifican y se adaptan para expresar la enzima, introduciendo un ácido nucleico exógeno que codifica y se adapta para expresar una enzima que no se encuentra naturalmente dentro del microorganismo parental.

35 En una realización, la una o más enzimas son de la ruta del mevalonato (MVA) y se seleccionan del grupo que consiste en:

a) Tiolasa (EC 2.3.1.9),

40 b) HMG-CoA sintasa (EC 2.3.3.10),

c) HMG-CoA reductasa (EC 1.1.1.88),

d) Mevalonato quinasa (EC 2.7.1.36),

e) Fosfomevalonato quinasa (EC 2.7.4.2), y

f) Mevalonato difosfato descarboxilasa (EC 4.1.1.33),

45 En una realización adicional, la una o más enzimas opcionales son de la ruta de la DXS, se seleccionan del grupo que consiste en:

a) 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa DXS (EC:2.2.1.7),

b) 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa DXR (EC:1.1.1.267),

c) 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa IspD (EC:2.7.7.60),

50 d) 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa IspE (EC:2.7.1.148),

- e) 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa IspF (EC:4.6.1.12),
- f) 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa IspG (EC:1.17.7.1), y
- g) 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (EC:1.17.1.2).

5 En una realización adicional, una o más enzimas adicionales exógenas o endógenas son expresadas o sobreexpresadas para dar como resultado la producción de un compuesto terpénico y/o su precursor, en donde la enzima exógena que se expresa, o la enzima endógena que se sobreexpresa se selecciona del grupo que consiste en:

- a) geranyltranstransferasa Fps (EC:2.5.1.10),
- b) heptaprenil difosfato sintasa (EC:2.5.1.10),
- 10 c) octaprenil-difosfato sintasa (EC:2.5.1.90),
- d) isopreno sintasa (EC 4.2.3.27),
- e) isopentenil-difosfato delta-isomerasa (EC EC 5.3.3.2), y
- f) farneseno sintasa (EC 4.2.3.46 / EC 4.2.3.47).

15 Solo a modo de ejemplo, la información de secuencia de cada una de las enzimas se da en las figuras en la presente memoria.

Las enzimas para usar en los microorganismos de la invención pueden proceder de cualquier fuente adecuada, que incluye diferentes géneros y especies de bacterias, u otros organismos. Las enzimas pueden proceder de *Staphylococcus aureus*.

20 La enzima isopreno sintasa (ispS) puede proceder de *Poplar tremuloides*, que tiene opcionalmente la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 21 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

La enzima desoxixilulosa 5-fosfato sintasa puede proceder de *C. autoethanogenum*, ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 1 y/o la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO: 2 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

25 La enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa DXR puede proceder de *C. autoethanogenum* y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 3, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

La enzima 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa IspD puede proceder de *C. autoethanogenum* y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 5, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

30 La enzima 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa IspE puede proceder de *C. autoethanogenum* y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 7, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

35 La enzima 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa IspF puede proceder de *C. autoethanogenum* y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 9, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

La enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa IspG puede proceder de *C. autoethanogenum* y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 11, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

40 La enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa puede proceder de *C. autoethanogenum* y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 13, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

La enzima mevalonato quinasa (MK) puede proceder de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Mu50 y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 51 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

45 La enzima fosfomevalonato quinasa (PMK) puede proceder de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Mu50 y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 52 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

La enzima mevalonato difosfato descarboxilasa (PMD) puede proceder de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Mu50 y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 53 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

5 La enzima isopentenil-difosfato delta-isomerasa (idi) puede proceder de *Clostridium beijerinckii* y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 54 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

La enzima tiolasa (thIA) puede proceder de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 40 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

10 La enzima puede ser una enzima tiolasa y una acetil-CoA c-acetiltransferasa (vraB) derivada de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Mu50 y codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 41 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

15 La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS) puede proceder de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Mu50 y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 42 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

La enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR) puede proceder de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Mu50 y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 43 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

20 La enzima geraniltransferasa (ispA) puede proceder de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655 codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 56 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

La enzima heptaprenil difosfato sintasa puede proceder de *C. autoethanogenum* y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 17, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

25 La enzima poliprenil sintetasa puede proceder de *C. autoethanogenum* y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 19, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

La enzima alfa-farneseno sintasa (FS) puede proceder de *Malus x domestica* y ser codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 57 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

30 La enzimas y variantes funcionales de uso en los microorganismos se pueden identificar por ensayos conocidos para un experto en la técnica. En realizaciones particulares, la enzima isopreno sintasa se puede identificar por el método indicado por Silver et al. (1991, *Plant Physiol.* 97: 1588-1591) o Zhao et al. (2011, *Appl Microbiol Biotechnol*, 90:1915-1922). En una realización particular adicional, la enzima farneseno sintasa se puede identificar por el método indicado por Green et al., 2007, *Phytochemistry*, 68:176-188. En realizaciones particulares adicionales, las enzimas de la ruta del mevalonato se pueden identificar por el método indicado en Cabano et al. (1997, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 499-505) para la HMG-CoA sintasa, por Ma et al. (2011, *Metab. Engin.*, 13:588-597) para la enzima HMG-CoA reductasa y mevalonato quinasa, Herdendorf y Miziorko (2007, *Biochemistry*, 46: 11780-8) para la fosfomevalonato quinasa, y Krepkiy et al. (2004, *Protein Sci.* 13: 1875-1881) para la mevalonato difosfato descarboxilasa. Ma et al., 2011, *Metab. Engin.*, 13:588-597. La 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa de la ruta de la DXS se puede ensayar usando el método indicado por Kuzuyama et al. (2000, *J. Bacteriol.* 182, 891-897). También se pueden identificar genes de la ruta de la DXS y el mevalonato usando inhibidores tales como fosmidomicina o mevinolina, como describen Trutko et al. (2005, *Microbiology* 74: 153-158).

40 En una realización, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos adaptados para aumentar la expresión de uno o más ácidos nucleicos endógenos y cuyos uno o más ácidos nucleicos endógenos codifican una o más de las enzimas mencionadas antes en la presente memoria. En una descripción, el uno o más ácidos nucleicos exógenos adaptados para aumentar la expresión es un elemento regulador. En una descripción, el elemento regulador es un promotor. En una descripción, el promotor es un promotor constitutivo que es preferiblemente altamente activo bajo condiciones de fermentación apropiadas. También se podrían usar promotores inducibles. En realizaciones preferidas, el promotor se selecciona del grupo que comprende un conjunto génico de Wood-Ljungdahl o promotores del operón de la fosfotransacetilasa/acetato quinasa. Los expertos en la técnica apreciarán que otros promotores que pueden dirigir la expresión, preferiblemente un alto nivel de expresión en condiciones de fermentación apropiadas, serían eficaces como alternativas.

45 En una realización, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar una o más de las enzimas mencionadas antes en la presente memoria. En una realización, los microorganismos comprenden uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar al menos dos, al menos de las enzimas. En otras realizaciones, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o más de las enzimas.

55

En una realización particular, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican una enzima de la invención.

5 El microorganismo puede comprender uno o más ácidos nucleicos exógenos. Cuando se desea transformar el microorganismo parental con dos o más elementos genéticos (tal como genes o elementos reguladores (por ejemplo un promotor)) pueden estar contenidos en uno o más ácidos nucleicos exógenos.

En una realización, el uno o más ácidos nucleicos exógenos es una construcción o vector de ácido nucleico, en una realización particular un plásmido, que codifica una o más enzimas mencionadas en lo que antecede en cualquier combinación.

10 Los ácidos nucleicos exógenos pueden permanecer extracromosómicos después de la transformación del microorganismo parental o pueden integrarse en el genoma del microorganismo parental. Por consiguiente, pueden incluir secuencias de nucleótidos adicionales adaptadas para ayudar a la integración (por ejemplo, una región que permite la recombinación homóloga e integración dirigida en el genoma del hospedante) o expresión y replicación de una construcción extracromosómica (por ejemplo, origen de replicación y otros elementos o secuencias reguladoras).

15 En una descripción, los ácidos nucleicos exógenos que codifican una o más enzimas como se menciona en lo que antecede, comprenderán además un promotor adaptado para promover la expresión de la una o más enzimas codificadas por los ácidos nucleicos exógenos. En una descripción, el promotor es un promotor constitutivo que es preferentemente altamente activo bajo condiciones de fermentación apropiadas. También se podrían usar promotores inducibles. En descripciones preferidas, el promotor se selecciona del grupo que comprende un conjunto  
20 génico de Wood-Ljungdahl y promotores de la fosfotransacetilasa/acetato quinasa. Los expertos en la técnica apreciarán que otros promotores que pueden dirigir la expresión, preferiblemente un alto nivel de expresión en condiciones de fermentación apropiadas, serían eficaces como alternativas.

En una realización, el ácido nucleico exógeno es un plásmido de expresión.

25 En una realización particular, el microorganismo parental se selecciona del grupo de bacterias acetógenas carboxidotróficas. En algunas realizaciones el microorganismo se selecciona del grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium jungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium metilotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*,  
30 *Oxobacterpfennigii*, y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

En una realización particular, el microorganismo parental se selecciona del conjunto de clostridios acetógenos, etanologénicos, que comprenden *C. autoethanogenum*, *C. jungdahlii*, y *C. ragsdalei* y aislados relacionados. Estos incluyen pero no se limitan a cepas de *C. autoethanogenum* JAI-1T (DSM10061) [Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., una bacteria anaerobia que produce etanol a partir de monóxido de carbono. *Arch Microbiol* 1994, 4: 345-351], *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) [Simpson SD, Forster RL, Tran PT, Rowe MJ, Warner IL: "Novel bacteria and methods thereof". Patente internacional 2009, WO/2009/064200], *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. jungdahlii* PETC<sup>T</sup> (DSM13528 = ATCC 55383) [Tanner RS, Miller LM, Yang D: "Clostridium jungdahlii sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I". *Int J Syst Bacteriol* 1993, 43: 232-236], *C. jungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) [Gaddy JL: "Clostridium stain which produces acetic acid from waste gases". patente de EE.UU. 1997, 5.593.886], *C. jungdahlii* C-01 (ATCC 55988) [Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: "Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction from the fermentation broth". patente de EE.UU., 2002, 6.368.819], *C. jungdahlii* O-52 (ATCC 55989) [Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: "Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction from the fermentation broth". patente de EE.UU., 2002, 6.368.819], *C. ragsdalei* P11<sup>T</sup>(ATCC BAA-622) [Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: "Isolation and Characterization of novel Clostridial Species". Patente internacional 2008, WO 2008/028055], aislados relacionados tales como "*C. coskatii*" [Zahn *et al* - "Novel ethanologenic species Clostridium coskatii" (Solicitud de patente de EE.UU. número US20110229947)] y "*Clostridium sp.*" (Tyurin *et al.*, 2012, *J. Biotech Res.* 4: 1-12), o cepas mutadas tales como *C. jungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. "Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using Clostridium jungdahlii". Tesis doctoral, North Carolina State University, 2010).  
50 Estas cepas forman un subconjunto dentro del conjunto I de ARNr de clostridio y su gen de ARNr 16S es más de 99% idéntico con un contenido de GC bajo similar de aproximadamente 30%. Sin embargo, la reasociación de ADN-ADN y los experimentos de huella dactilar de ADN mostraron que estas cepas pertenecen a diferentes especies [Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: "Isolation and Characterization of novel Clostridial Species". Patente internacional 2008, WO 2008/028055].

55 Todas las especies de este conjunto tienen una morfología y tamaño similares (las células en crecimiento logarítmico son entre 0,5-0,7 x 3-5 µm), son mesófilas (temperatura de crecimiento óptima 30-37°C) y estrictamente anaerobias [Tanner RS, Miller LM, Yang D: "Clostridium jungdahlii sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I". *Int J Syst Bacteriol* 1993, 43: 232-236; Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: "Clostridium autoethanogenum, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide". *Arch Microbiol*

1994, 4: 345-351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: "Isolation and Characterization of novel Clostridial Species". Patente internacional 2008, WO 2008/028055]. Además, comparten todos los mismos rasgos filogenéticos principales, tal como un mismo intervalo de pH (pH 4-7,5, con un pH inicial óptimo de 5,5-6), crecimiento autótrofo fuerte en gases que contienen CO con velocidades de crecimiento similares y un perfil metabólico similar con etanol y ácido acético como el producto final de fermentación principal, y pequeñas cantidades de 2,3-butanodiol y ácido láctico formados en determinadas condiciones. [Tanner RS, Miller LM, Yang D: "Clostridium jungdahlii sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I". *Int J Syst Bacteriol* 1993, 43: 232-236; Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: "Clostridium autoethanogenum, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide". *Arch Microbiol* 1994, 4: 345-351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: "Isolation and Characterization of novel Clostridial Species". Patente internacional 2008, WO 2008/028055]. La producción de indol se observó también con las tres especies. Sin embargo, las especies se diferencian en el uso de sustratos de diferentes azúcares (p. ej. ramnosa, arabinosa), ácidos (p. ej. gluconato, citrato), aminoácidos (p. ej. arginina, histidina), u otros sustratos (p. ej. betaína, butanol). Además, se encontró que algunas de las especies eran auxótrofas para ciertas vitaminas (por ejemplo, tiamina, biotina), mientras que otras no.

En una realización, el microorganismo acetógeno carboxidotrófico parental se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Butyribacterium limosum*, *Butyribacterium metilotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Oxobacter pfennigii* y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

En una realización particular del primer o segundo aspecto, el microorganismo parental se selecciona del grupo de Clostridia carboxidotróficos que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium jungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*.

En una realización, el microorganismo se selecciona de un grupo de clostridios carboxidotróficos que comprenden las especies *C. autoethanogenum*, *C. jungdahlii*, y "*C. ragsdalei*" y aislados relacionados. Estos incluyen, pero no se limitan a *C. autoethanogenum* JAI-1<sup>T</sup> (DSM10061) (Abrini, Naveau, y Nyns, 1994), *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) (WO/2009/064200), *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETC<sup>T</sup> (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, Miller, y Yang, 1993), *C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) (patente de EE.UU. 5.593.886), *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) (patente de EE.UU. 6.368.819), *C. ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989) (patente de EE.UU. 6.368.819), o "*C. ragsdalei* P11<sup>T</sup>" (ATCC BAA-622) (WO 2008/028055), y aislados relacionados tales como "*C. coskati*" (patente de EE.UU. 2011/0229947), "*Clostridium* sp. MT351" (Michael Tyurin y Kiriukhin, 2012) y sus cepas mutantes tales como *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. "Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using Clostridium ljungdahlii." Tesis doctoral, North Carolina State University, 2010).

Estas cepas forman un subconjunto dentro del conjunto I de ARNr de clostridio (Collins et al., 1994), que tiene una identidad de al menos 99% en el nivel del gen de ARNr 16S, aunque son distintas especies como se determina por reasociación de ADN-ADN y experimentos de huella dactilar de ADN (WO 2008/028055, patente de EE.UU. 2011/0229947).

Las cepas de este conjunto están definidas por características comunes, que tienen tanto genotipo como fenotipo similar, y todas comparten el mismo modo de conservación de energía y metabolismo fermentador. Estas cepas de este conjunto carecen de citocromos y conservan energía por un complejo Rnf.

Todas las cepas de este conjunto tienen un tamaño de genoma de aproximadamente 4,2 Mpb (Köpke et al., 2010) y una composición de GC de aproximadamente 32% en moles (Abrini et al., 1994; Köpke et al., 2010; Tanner et al., 1993) (documento WO 2008/028055; patente de EE.UU. 2011/0229947), y operones de genes clave esenciales conservados que codifican las enzimas de la ruta Wood-Ljungdahl (monóxido de carbono deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato sintetasa, metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato ciclohidrolasa, metileno-tetrahidrofolato reductasa, y monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa), hidrogenasa, formiato deshidrogenasa, complejo Rnf (*rnfCDGEAB*), piruvato:ferredoxina oxidoreductasa, aldehído:ferredoxina oxidoreductasa (Köpke et al., 2010, 2011). Se ha encontrado que la organización y número de genes de la ruta Wood-Ljungdahl, responsables de la absorción de gas, son los mismos en todas las especies, a pesar de las diferencias en las secuencias nucleicas y de aminoácidos (Köpke et al., 2011).

Las cepas tienen todas morfología y tamaño similares (las células en crecimiento logarítmico son entre 0,5-0,7 x 3-5 µm), son mesófilos (temperatura de crecimiento óptimo entre 30-37°C) y estrictamente anaerobios (Abrini et al., 1994; Tanner et al., 1993)(documento WO 2008/028055). Además, comparten todos los mismos rasgos filogenéticos principales, tal como un mismo intervalo de pH (pH 4-7,5, con un pH inicial óptimo de 5,5-6), crecimiento autótrofo fuerte en gases que contienen CO con velocidades de crecimiento similares y un perfil metabólico con etanol y ácido acético como el producto final de fermentación principal, con pequeñas cantidades de 2,3-butanodiol y ácido láctico formados en determinadas condiciones (Abrini et al., 1994; Köpke et al., 2011; Tanner et al., 1993). Sin embargo, las especies se diferencian en el uso de sustratos de diferentes azúcares (p. ej. ramnosa, arabinosa), ácidos (p. ej. gluconato, citrato), aminoácidos (p. ej. arginina, histidina), u otros sustratos (p. ej. betaína, butanol). Algunas de las especies se encontró que eran auxótrofas para determinadas vitaminas (p. ej., tiamina, biotina) mientras que otras

no lo eran. Se ha mostrado la reducción de ácidos carboxílicos a sus correspondientes alcoholes en una variedad de estos organismos (Perez, Richter, Loftus, y Angenent, 2012).

5 Por lo tanto, los rasgos descritos no son específicos a un organismo como *C. autoethanogenum* o *C. ljungdahlii*, sino más bien rasgos generales para clostridios sintetizadores de etanol, carboxidotróficos. Por lo tanto, la invención se puede prever para trabajar con estas cepas, aunque puede haber diferencias de rendimiento.

10 Los microorganismos acetógenos carboxidotróficos recombinantes de la invención se pueden preparar a partir de un microorganismo acetógeno carboxidotrófico original y uno o más ácidos nucleicos exógenos usando cualquier número de técnicas conocidas en la materia para la producción de microorganismos recombinantes. A modo de ejemplo solo, la transformación (que incluye transducción o transfección) se puede lograr por electroporación, electrofusión, ultrasonidos, transformación mediada por polietilenglicol, conjugación o competencia química y natural. Se describen técnicas de transformación adecuadas, por ejemplo, en Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Labrotary Press, Cold Spring Harbour, 1989.

15 Se ha descrito la electroporación por varios acetógenos carboxidotróficos como *C. ljungdahlii* (Köpke et al., 2010; Leang, Ueki, Nevin, y Lovley, 2012) (PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905), *C. autoethanogenum* (PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905), *Acetobacterium woodii* (Strätz, Sauer, Kuhn, y Dürre, 1994) o *Moorella thermoacetica* (Kita et al., 2012) y es un método estándar usado en muchos clostridios tales como *C. acetobutylicum* (Mermelstein, Welker, Bennett, y Papoutsakis, 1992), *C. cellulolyticum* (Jennert, Tardif, Young, y Young, 2000) o *C. thermocellum* (MV Tyurin, Desai, y Lynd, 2004).

Se ha descrito la electrofusión para el acetógeno *Clostridium sp.* MT351 (Tyurin y Kiriukhin, 2012).

20 La inducción por profago se ha descrito para acetógeno carboxidotrófico así como en el caso de *C. scatologenes* (Prasanna Tamarapu Parthasarathy, 2010, Development of a Genetic Modification System in *Clostridium scatologenes* ATCC 25775 for Generation of Mutants, Masters Project Western Kentucky University).

25 La conjugación se ha descrito como el método de elección para el acetógeno *Clostridium difficile* (Herbert, O'Keeffe, Purdy, Elmore, y Minton, 2003) y muchos otros clostridios incluyendo *C. acetobutylicum* (Williams, Young, y Young, 1990).

En una realización, la cepa original usa CO como la única fuente de carbono y energía.

En una realización el microorganismo parental es *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*. En una realización particular, el microorganismo es *Clostridium autoethanogenum* DSM23693. En otra realización particular, el microorganismo es *Clostridium ljungdahlii* DSM13528 (o ATCC55383).

30 Ácidos nucleicos

También se describen uno o más ácidos nucleicos o construcciones de ácidos nucleicos útil en la generación de un microorganismo recombinante de la invención.

35 En una descripción, el ácido nucleico comprende secuencias que codifican una o más de las enzimas de la ruta del mevalonato (MVA) y opcionalmente la ruta de la DXS, que cuando se expresa en un microorganismo permite que el microorganismo produzca uno o más terpenos y/o sus precursores por fermentación de un sustrato que comprende CO. Una descripción particular proporciona un ácido nucleico que codifica dos o más enzimas que cuando se expresan en un microorganismo permiten que el microorganismo produzca uno o más terpenos y/o sus precursores por fermentación del sustrato que comprende CO. En una descripción, un ácido nucleico codifica tres, cuatro, cinco o más de dichas enzimas.

40 En una realización, la una o más enzimas codificadas por el ácido nucleico son de la ruta del mevalonato (MVA) y se seleccionan del grupo que consiste en:

a) Tiolasa (EC 2.3.1.9),

b) HMG-CoA sintasa (EC 2.3.3.10),

c) HMG-CoA reductasa (EC 1.1.1.88),

45 d) Mevalonato quinasa (EC 2.7.1.36),

e) Fosfomevalonato quinasa (EC 2.7.4.2), y

f) Mevalonato difosfato descarboxilasa (EC 4.1.1.33),

En una realización adicional, la una o más enzimas opcionales codificadas por el ácido nucleico son de la ruta de la DXS y se seleccionan del grupo que consiste en:

50 a) 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa DXS (EC:2.2.1.7),

- b) 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa DXR (EC:1.1.1.267),
- c) 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa lspD (EC:2.7.7.60),
- d) 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa lspE (EC:2.7.1.148),
- e) 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa lspF (EC:4.6.1.12),
- 5 f) 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa lspG (EC:1.17.7.1), y
- g) 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (EC:1.17.1.2).

En una realización adicional, el ácido nucleico codifica una o más enzimas adicionales que son expresadas o sobreexpresadas para dar como resultado la producción de un compuesto terpenico y/o su precursor, en donde la enzima exógena que se expresa, o la enzima endógena que se sobreexpresa se selecciona del grupo que consiste en:

- a) geraniltranstransferasa Fps (EC:2.5.1.10),
- b) heptaprenil difosfato sintasa (EC:2.5.1.10),
- c) octaprenil-difosfato sintasa (EC:2.5.1.90),
- d) isopreno sintasa (EC 4.2.3.27),
- 15 e) isopentenil-difosfato delta-isomerasa (EC EC 5.3.3.2), y
- f) farneseno sintasa (EC 4.2.3.46 / EC 4.2.3.47).

Las secuencias de aminoácidos de ejemplo y secuencias de ácidos nucleicos que codifican cada una de las enzimas anteriores se proporcionan en la presente memoria o se pueden obtener de GenBank como se menciona en lo que antecede. Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente secuencias de ácidos nucleicos alternativas que codifican enzimas o sus variantes funcionalmente equivalentes, teniendo en cuenta la información contenida en la presente memoria, en GenBank y otras bases de datos, y el código genético.

En una descripción adicional, el ácido nucleico que codifica la tiolasa (thIA) derivada de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 es codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 40 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

25 En una descripción adicional, el ácido nucleico que codifica la tiolasa en donde la tiolasa es la acetil-CoA c-acetiltransferasa (vraB) derivada de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Mu50 es codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 41 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

30 En una descripción adicional, el ácido nucleico que codifica la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS) derivada de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Mu50 es codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 42 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

En una descripción adicional, el ácido nucleico que codifica la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR) derivada de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Mu50 es codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 43 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

35 En una descripción adicional, el ácido nucleico que codifica la mevalonato quinasa (MK) derivada de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Mu50 es codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 51 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

En una descripción adicional, el ácido nucleico que codifica la fosfomevalonato quinasa (PMK) derivada de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Mu50 es codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 52 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

40 En una descripción adicional, el ácido nucleico que codifica la mevalonato difosfato descarboxilasa (PMD) derivada de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Mu50 es codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 53 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

45 En una descripción adicional, el ácido nucleico que codifica la desoxixilulosa 5-fosfato sintasa derivada de *C. autoethanogenum*, es codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 1 y/o la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO: 2 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.

En una descripción, el ácido nucleico que codifica la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa DXR (EC:1.1.1.267) tiene la secuencia SEQ ID NO: 3, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.



- En una descripción, el ácido nucleico que codifica la 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa IspD (EC:2.7.7.60) tiene la secuencia SEQ ID NO: 5, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.
- En una descripción, el ácido nucleico que codifica la 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa IspE (EC:2.7.1.148) tiene la secuencia SEQ ID NO: 7, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.
- 5 En una descripción, el ácido nucleico que codifica la 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa IspF (EC:4.6.1.12) tiene la secuencia SEQ ID NO: 9, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.
- En una descripción, el ácido nucleico que codifica la 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa IspG (EC:1.17.7.1) tiene la secuencia SEQ ID NO: 11, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.
- 10 En una descripción, el ácido nucleico que codifica la 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (EC:1.17.1.2) tiene la secuencia SEQ ID NO: 13, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.
- En una descripción adicional, el ácido nucleico que codifica la geraniltransferasa (ispA) derivada de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655 es codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 56 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.
- 15 En una descripción, el ácido nucleico que codifica la heptaprenil difosfato sintasa tiene la secuencia SEQ ID NO: 17, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.
- En una descripción, el ácido nucleico que codifica la octaprenil-difosfato sintasa (EC:2.5.1.90) en donde la octaprenil-difosfato sintasa es poliprenil sintetasa es codificada por la secuencia SEQ ID NO: 19, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.
- 20 En una descripción, el ácido nucleico que codifica la isopreno sintasa (ispS) derivada de Poplar *tremuloides* se ilustra en la SEQ ID NO: 21 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.
- En una descripción adicional, el ácido nucleico que codifica la isopentenil-difosfato delta-isomerasa (idi) derivada de *Clostridium beijerinckii* es codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 54 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.
- 25 En una descripción adicional, el ácido nucleico que codifica la alfa-farneseno sintasa (FS) derivada de *Malus x domestica* es codificada por la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la SEQ ID NO: 57 en lo sucesivo, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente.
- 30 En una descripción, los ácidos nucleicos comprenderán además un promotor. En una descripción, el promotor permite la expresión constitutiva de los genes bajo su control. Sin embargo, también se pueden usar promotores inducibles. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente promotores útiles. Preferiblemente, el promotor puede dirigir un nivel alto de expresión en condiciones de fermentación adecuadas. En una descripción particular, se usa un promotor de grupo de Wood-Ljungdahl. En otra realización, se usa un promotor de fosfoacetilasa/acetato quinasa. En otra realización, un promotor de piruvato:ferredoxina oxidoreductasa, un promotor de operón de complejo Rnf o un promotor de operón de ATP sintasa. En una descripción particular, el promotor es de *C. autoethanogenum*.
- 35 Los ácidos nucleicos pueden permanecer extracromosómicos tras la transformación de un microorganismo parental o se pueden adaptar para la integración en el genoma del microorganismo. Por consiguiente, los ácidos nucleicos pueden incluir secuencias de nucleótidos adicionales adaptadas para ayudar a la integración (por ejemplo, una región que permite la recombinación homóloga e integración dirigida en el genoma del hospedante) o expresión estable y replicación de una construcción extracromosómica (por ejemplo, origen de replicación, promotor y otras
- 40 secuencias reguladoras).
- En una descripción, el ácido nucleico es una construcción o vector de ácido nucleico. En una descripción particular, la construcción o vector de ácido nucleico es una construcción o vector de expresión, sin embargo, están abarcadas otras construcciones y vectores, tales como los usados para la clonación. En una descripción particular, la construcción o vector de expresión es un plásmido.
- 45 Se apreciará que una construcción/vector de expresión puede contener cualquier número de elementos reguladores además del promotor así como genes adicionales adecuados para la expresión de otras proteínas si se desea. En una descripción, la construcción/vector de expresión incluye un promotor. En otra descripción, la construcción/vector de expresión incluye dos o más promotores. En una descripción particular, la construcción/vector de expresión incluye un promotor para cada gen a expresar. En una descripción, la construcción/vector de expresión incluye uno o
- 50 más sitios de unión ribosómicos, preferiblemente un sitio de unión ribosómico para cada gen a expresar.
- Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias de ácidos nucleicos y las secuencias de construcciones/vectores descritas en la presente memoria pueden contener nucleótidos conectores convencionales tales como los requeridos para los sitios de unión a ribosomas y/o los sitios de restricción. Tales secuencias

enlazadoras no deben ser interpretadas como requeridas y no proporcionan una limitación en las secuencias definidas.

Los ácidos nucleicos y las construcciones de ácido nucleico, incluyendo las construcciones/vectores de expresión, se pueden construir usando cualquier número de técnicas estándar en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de síntesis química o recombinante. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Se describen técnicas de ejemplo adicionales en la sección de ejemplos en lo sucesivo. Esencialmente, los genes individuales y los elementos reguladores estarán operativamente unidos entre sí de tal manera que los genes se puedan expresar para formar las proteínas deseadas. Los expertos en la técnica apreciarán los vectores adecuados. Sin embargo, a modo de ejemplo, los siguientes vectores pueden ser adecuados: vectores pMTL80000, pIMP1, pJIR750 y los plásmidos ilustrados en la sección de Ejemplos en la presente memoria después.

Se apreciará que los ácidos nucleicos pueden tener cualquier forma adecuada, incluyendo ARN, ADN o ADNc.

La invención también proporciona organismos hospedantes, particularmente microorganismos, e incluyendo virus, bacterias y levaduras, que comprenden uno o más de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria.

#### Métodos de producción de organismos

El uno o más ácidos nucleicos exógenos se pueden suministrar a un microorganismo original como ácidos nucleicos desnudos o se pueden formular con uno o más agentes para facilitar el proceso de transformación (por ejemplo, ácido nucleico conjugado con liposoma, un organismo en el que está contenido el ácido nucleico). El uno o más ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN o combinaciones de los mismos, si es adecuado. En algunas realizaciones se pueden usar inhibidores de restricción; véase, por ejemplo, Murray, N.E. et al. (2000) *Microbial. Molec. Biol. Rev.* 64, 412.)

Los microorganismos de la invención se pueden preparar a partir de un microorganismo parental y uno o más ácidos nucleicos exógenos usando cualquier número de técnicas conocidas en la materia para la producción de microorganismos recombinantes. A modo de ejemplo solo, la transformación (que incluye transducción o transfección) se puede lograr por electroporación, ultrasonidos, transformación mediada por polietilenglicol, competencia química y natural, o conjugación. Se describen técnicas de transformación adecuadas, por ejemplo, en Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Labrotary Press, Cold Spring Harbour, 1989.

En ciertas realizaciones, debido a los sistemas de restricción que son activos en el microorganismo a transformar, es necesario metilar el ácido nucleico que se va a introducir en el microorganismo. Esto se puede hacer usando una variedad de técnicas, incluyendo las descritas a continuación e ilustradas además en la sección de ejemplos en lo sucesivo.

A modo de ejemplo, en una realización, se produce un microorganismo recombinante por un método que comprende las siguientes etapas:

b) introducción de un microorganismo lanzadera de (i) una construcción/vector de expresión como se describe en la presente memoria, y (ii) una construcción/vector de metilación que comprende un gen de metiltransferasa;

c) expresión del gen de metiltransferasa;

d) aislamiento de una o más construcciones/vectores a partir del microorganismo lanzadera; e,

e) introducción de una o más construcciones/vectores en un microorganismo destino.

En una realización, el gen de metiltransferasa de la etapa B se expresa de forma constitutiva. En otra realización, la expresión del gen de metiltransferasa de la etapa B es inducida.

El microorganismo lanzadera es un microorganismo, preferiblemente un microorganismo de restricción negativa, que facilita la metilación de las secuencias de ácido nucleico que componen la construcción/vector de expresión. En una descripción particular, el microorganismo lanzadera es *E. coli*, *Bacillus subtilis* o *Lactococcus lactis* de restricción negativa.

La construcción/vector de metilación comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una metiltransferasa.

Una vez que la construcción/vector de expresión y la construcción/vector de metilación se introducen en el microorganismo lanzadera, es inducido el gen de metiltransferasa presente en la construcción/vector de metilación. La inducción puede ser cualquier sistema promotor adecuado aunque en una descripción particular, la construcción/vector de metilación comprende un promotor lac inducible y es inducido por la adición de lactosa o un análogo de la misma, más preferiblemente de isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido (IPTG). Otros promotores adecuados incluyen los sistemas ara, tet o T7. En una descripción adicional, el promotor de la construcción/vector de metilación es un promotor constitutivo.

5 En una descripción particular, la construcción/vector de metilación tiene un origen de replicación específico para la identidad del microorganismo lanzadera, de modo que cualquiera de los genes presentes en la construcción/vector de metilación son expresados en el microorganismo lanzadera. Preferiblemente, la construcción/vector de expresión tiene un origen de replicación específico para la identidad del microorganismo de destino de modo que cualquier gen presente en la construcción/vector de expresión se expresa en el microorganismo de destino.

10 La expresión de la enzima metiltransferasa da como resultado la metilación de los genes presentes en la construcción/vector de expresión. La construcción/vector de expresión después se puede aislar del microorganismo lanzadera de acuerdo con uno cualquiera de una serie de métodos conocidos. A modo de ejemplo solo, se puede usar la metodología descrita en la sección de ejemplos en lo sucesivo para aislar la construcción/vector de expresión.

En una descripción particular, se aíslan simultáneamente ambas construcciones/vectores.

15 La construcción/vector de expresión puede introducirse en el microorganismo de destino usando cualquier número de métodos conocidos. Sin embargo, a modo de ejemplo, se puede usar la metodología descrita en la sección de ejemplos en lo sucesivo. Dado que la construcción/vector de expresión está metilado, las secuencias de ácido nucleico presentes en la construcción/vector de expresión pueden ser incorporadas al microorganismo de destino y expresadas con éxito.

20 Está previsto que se pueda introducir un gen de metiltransferasa en un microorganismo lanzadera y ser sobreexpresado. Por lo tanto, en una descripción, la enzima metiltransferasa resultante se puede recoger usando métodos conocidos y usar in vitro para metilar un plásmido de expresión. La construcción/vector de expresión puede entonces introducirse en el microorganismo de destino para la expresión. En otra descripción, se introduce el gen de metiltransferasa en el genoma del microorganismo lanzadera seguido de introducción de la construcción/vector de expresión en el microorganismo lanzadera, se aíslan una o más construcciones/vectores a partir del microorganismo lanzadera y después se introduce la construcción/vector de expresión en el microorganismo de destino.

25 Se prevé que la construcción/vector de expresión y la construcción/vector de metilación como se ha definido anteriormente se pueden combinar para proporcionar una composición objeto de la memoria. Dicha composición tiene utilidad particular para evitar mecanismos barrera de restricción para producir microorganismos recombinantes de la invención.

En una descripción particular, la construcción/vector de expresión y/o la construcción/vector de metilación son plásmidos.

30 Los expertos en la técnica apreciarán una serie de metiltransferasas adecuadas para usar en la producción de microorganismos de la invención. Sin embargo, a modo de ejemplo se puede usar la metiltransferasa del fago  $\Phi$ T1 de *Bacillus subtilis* y la metiltransferasa descrita en los ejemplos en lo sucesivo. En una descripción, la metiltransferasa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente. Los ácidos nucleicos que codifican metiltransferasas adecuadas serán fácilmente evidentes teniendo en cuenta la secuencia de la metiltransferasa deseada y el código genético. En una descripción, el ácido nucleico que codifica una metiltransferasa es como describe en los ejemplos en lo sucesivo (por ejemplo, el ácido nucleico de SEQ ID NO: 63, o es una de sus variantes funcionalmente equivalente).

40 Se puede usar cualquier número de construcciones/vectores adaptados para permitir la expresión de un gen de metiltransferasa, para generar una construcción/vector de metilación. Sin embargo, a modo de ejemplo, se puede usar el plásmido descrito en la sección de ejemplos en lo sucesivo.

#### Métodos de producción

45 La invención proporciona un método para la producción de uno o más terpenos y/o sus precursores, y opcionalmente uno o más de otros productos, por fermentación microbiana que comprende fermentar un sustrato que comprende CO usando un microorganismo recombinante de la invención. Preferiblemente, el uno o más terpenos y/o sus precursores son el producto de fermentación principal. Los métodos de la invención se pueden usar para reducir las emisiones atmosféricas totales de carbono de un procedimiento industrial.

Preferiblemente, la fermentación comprende las etapas de fermentar de forma anaerobia un sustrato en un biorreactor para producir al menos uno o más terpenos y/o uno de sus precursores usando un microorganismo recombinante de la invención.

50 En una realización, el uno o más terpenos y/o sus precursores, se seleccionan de ácido mevalónico, IPP, pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), isopreno, pirofosfato de geranilo (GPP), pirofosfato de farnesilo (FPP) y farneseno.

En lugar de producir isopreno directamente a partir de los intermedios clave de terpenoides IPP o DMAPP y después usarlos para la síntesis de terpenos de cadenas más largas, también se pueden sintetizar terpenos de cadena más larga tales como monoterpenoides C10 o sesquiterpenoides C15, directamente a través de la geraniltransferasa

(véase la tabla 6). A partir de la unidad estructural sesquiterpenoide C15 farnesil-PP se puede producir farneseno, que de forma similar al etanol, se puede usar como combustible para el transporte.

En una realización el método comprende las etapas de:

5 (a) proporcionar un sustrato que comprende CO a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos de la invención; y

(b) fermentar de forma anaerobia el cultivo en el biorreactor para producir al menos uno o más terpenos y/o sus precursores.

En una realización el método comprende las etapas de:

a) capturar el gas que contiene CO producido como resultado del procedimiento industrial;

10 b) fermentación anaerobia del gas que contiene CO para producir el al menos uno o más terpenos y/o sus precursores mediante un cultivo que contiene uno o más microorganismos de la invención.

En una realización de la invención, el sustrato gaseoso fermentado por el microorganismo es un sustrato gaseoso que contiene CO. El sustrato gaseoso puede ser un gas residual que contiene CO obtenido como un subproducto de un procedimiento industrial, o de alguna otra fuente tal como de humos de escape de automóvil. En algunas 15 realizaciones, el procedimiento industrial se selecciona del grupo que consiste en la fabricación de productos de metales ferrosos, tales como una acería, fabricación de productos no ferrosos, procesos de refinación de petróleo, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de humo, producción de amoníaco, producción de metanol y fabricación de coque. En estas realizaciones, el gas que contiene CO puede capturarse del procedimiento industrial antes de emitirse a la atmósfera, usando cualquier método conveniente. El CO puede ser un 20 componente de gas de síntesis (gas que comprende monóxido de carbono e hidrógeno). El CO producido de procedimientos industriales normalmente se quema para producir CO<sub>2</sub> y por lo tanto, la invención tiene utilidad particular en la reducción de las emisiones gaseosas de CO<sub>2</sub> de efecto invernadero y producción de un terpeno para usar como un biocombustible. Dependiendo de la composición del sustrato que contiene CO gaseoso, puede ser conveniente tratarlo para eliminar cualquier impureza indeseada, tal como partículas de polvo antes de introducirlo a 25 la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso se puede filtrar o depurar por métodos conocidos.

Se apreciará que para el cultivo de las bacterias y CO hasta que se produzcan al menos uno o más terpenos y/o sus precursores, además de gas sustrato que contiene CO, será necesario alimentar medio nutriente líquido adecuado para el biorreactor. El sustrato y medio se pueden alimentar al biorreactor en una forma continua, discontinua o 30 discontinua alimentada. Un medio nutriente contendrá vitaminas y minerales suficientes para permitir el crecimiento del microorganismo usado. Los medios anaerobios adecuados para la fermentación para producir un terpeno y/o uno de sus precursores usando CO son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describen medios adecuados en Biebel (2001). En una descripción de la invención, el medio es como se describe en la sección de ejemplos en lo sucesivo.

La fermentación debería llevarse a cabo convenientemente en condiciones adecuadas para que se produzca la 35 fermentación de CO a al menos uno o más terpenos y/o sus precursores. Las condiciones de reacción que deberían considerarse incluyen presión, temperatura, caudal de gas, caudal de líquido, pH del medio, potencial rédox del medio, velocidad de agitación (si se usa un reactor de tanque agitado continuo), nivel de inóculo, concentraciones de sustrato gaseoso máximo para asegurar que el CO en la fase líquida no se convierte en limitante, y concentraciones de producto máximas para evitar la inhibición de producto.

Además, a menudo es conveniente aumentar la concentración de CO de una corriente de sustrato (o presión parcial de CO en un sustrato gaseoso) y por lo tanto aumentar la eficacia de las reacciones de fermentación cuando el CO es un sustrato. El trabajo a mayores presiones permite un aumento significativo de la velocidad de transferencia de CO de la fase gaseosa a la fase líquida, donde puede ser absorbido por el microorganismo como una fuente de 40 carbono para la producción de al menos uno o más terpenos y/o sus precursores. Esto a su vez significa que el tiempo de retención (definido como el volumen líquido en el biorreactor dividido entre el caudal de gas de entrada) se puede reducir cuando los biorreactores se mantienen a presión elevada en lugar de a presión atmosférica. Las condiciones de reacción óptimas dependerán en parte del microorganismo particular de la invención usado. Sin embargo, en general, se prefiere que la fermentación se lleve a cabo a presión mayor que la presión ambiente. Además, puesto que una velocidad dada de conversión de CO a al menos uno o más terpenos y/o sus precursores es en parte una función del tiempo de retención del sustrato, y alcanzar un tiempo de retención deseado a su vez 45 dicta el volumen necesario de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados pueden reducir en gran medida el volumen del biorreactor necesario, y por consiguiente el coste de capital del equipo de fermentación. Según los ejemplos dados en la patente de EE.UU. nº 5.593.886, el volumen del reactor se puede reducir en proporción lineal a los aumentos de la presión de trabajo del reactor, es decir, los biorreactores que trabajan a 10 atmósferas de presión necesitan solo una décima parte del volumen de los que trabajan a 1 atmósfera de presión. 55

A modo de ejemplo, los beneficios de llevar a cabo una fermentación de gas a etanol a presiones elevadas se han descrito. Por ejemplo, el documento WO 02/08438 describe fermentaciones de gas a etanol realizadas a presiones

de 2,11 kg/cm<sup>2</sup> (30 psig) y 5,27 kg/cm<sup>2</sup> (75 psig), dando productividades de etanol de 150 g/L/día a 369 g/L/día respectivamente. Sin embargo, se encontró que fermentaciones de ejemplo realizadas usando medios y composiciones de gas de entrada similares a presión atmosférica, producen entre 10 y 20 veces menos etanol por litro por día.

- 5 Es conveniente también que la velocidad de introducción del sustrato gaseoso que contiene CO sea tal que asegure que la concentración de CO en la fase líquida no se convierte en limitante. Esto se debe a que una consecuencia de condiciones limitadas por el CO puede ser que el uno o más productos sean consumidos por el cultivo.

La composición de las corrientes de gas usadas para alimentar una reacción de fermentación puede tener un impacto importante en la eficacia y/o en los costes de esta reacción. Por ejemplo, el O<sub>2</sub> puede reducir la eficacia de un proceso de fermentación anaerobio. El procesamiento de gases no deseados o innecesarios en etapas de un proceso de fermentación antes o después de la fermentación, puede aumentar la carga en dichas etapas (p. ej., donde la corriente de gas es comprimida antes de entrar en un biorreactor, se puede usar energía innecesaria para comprimir gases que no son necesarios en la fermentación). Por consiguiente, puede ser conveniente tratar las corrientes de sustrato, en particular corrientes de sustrato obtenidas de fuentes industriales, para separar componentes no deseados y aumentar la concentración de los componentes convenientes.

En algunas realizaciones, un cultivo de una bacteria de la invención se mantiene en un medio de cultivo acuoso. Preferiblemente, el medio de cultivo acuoso es un medio de crecimiento microbiano anaerobio mínimo. Los medios adecuados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.173.429 y 5.593.886 y el documento WO 02/08438, y como se describe en la sección de ejemplos más adelante en este documento.

Los terpenos y/o sus precursores, o una corriente mixta que contiene uno o más terpenos, sus precursores y/o uno o más de otros productos, se pueden recuperar del caldo de fermentación por métodos conocidos en la técnica, tales como destilación o evaporación fraccionada, pervaporación, separación por corriente gaseosa y fermentación extractiva, que incluye por ejemplo, extracción líquido-líquido.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, el uno o más terpenos y/o sus precursores y uno o más productos se recuperan del caldo de fermentación separando continuamente una parte del caldo del biorreactor, separando las células microbianas del caldo (convenientemente por filtración), y recuperando uno o más productos del caldo. Los alcoholes se pueden recuperar convenientemente, por ejemplo, por destilación. La acetona se puede recuperar, por ejemplo, por destilación. Cualquier ácido producido se puede recuperar, por ejemplo, por adsorción sobre carbón activado. Las células microbianas separadas preferiblemente se devuelven al biorreactor de fermentación. El permeado exento de células que queda después de haber separado todos los alcoholes y ácidos, preferiblemente también se devuelve al biorreactor de fermentación. Se pueden añadir nutrientes adicionales (tales como vitamina B) al permeado exento de células para recargar el medio nutriente antes de devolverlo al biorreactor.

Además, si el pH del caldo se ajustó como se ha descrito antes para potenciar la absorción de ácido acético en el carbón activado, el pH debería reajustarse a un pH similar al del caldo en el biorreactor de fermentación, antes de devolverlo al biorreactor.

### Ejemplos

La invención ahora se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1 - Expresión de la isopreno sintasa en *C. autoethanogenum* para la producción de isopreno a partir de CO

Los autores de la invención han identificado los genes de la biosíntesis de terpenos en acetógenos carboxidotróficos tales como *C. autoethanogenum* y *C. jungdahlii*. Se modificó genéticamente un organismo recombinante para producir isopreno. El isopreno es emitido de forma natural por algunas plantas tales como el álamo para proteger las hojas de la radiación UV. Se llevó a cabo la optimización de codones del gen de la isopreno sintasa (EC 4.2.3.27) del álamo y se introdujo en un acetógeno carboxidotrófico *C. autoethanogenum* para producir isopreno a partir de CO. La enzima lleva el intermedio clave DMAPP (difosfato de dimetilalilo) de la biosíntesis de terpenoides a isopreno en una reacción irreversible (Fig. 1).

### Cepas y condiciones de crecimiento:

Todas las etapas de subclonación se llevaron a cabo en *E. coli* usando cepas convencionales y condiciones de crecimiento como se ha descrito antes (Sambrook et al, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Labrotary Press, Cold Spring Harbour, 1989; Ausubel et al, Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 1987).

*C. autoethanogenum* DSM10061 y DSM23693 (un derivado de DSM10061) se obtuvieron de DSMZ (La colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania). El cultivo se llevó a cabo a 37°C usando condiciones y técnicas estrictamente anaerobias (Hungate, 1969, *Methods in Microbiology*, vol. 3B. Academic Press, Nueva York: 117-132; Wolfe, 1971, *Adv. Microb. Physiol.*, 6: 107-146). Se

## ES 2 674 984 T3

usó el medio PETC químicamente definido sin extracto de levadura (Tabla 1) y 2,11 kg/cm<sup>2</sup> (30 psi) de gas residual de acería que contenía monóxido de carbono (recogido de la acería de nueva Zelanda en Glenbrook, NZ; composición: 44% de CO, 32% de N<sub>2</sub>, 22% de CO<sub>2</sub>, 2% de H<sub>2</sub>) como la única fuente de carbono y energía.

Tabla 1

Componente del medio	Concentración por 1,0 litro de medio
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
Solución de metales traza	10 ml
Solución de vitaminas de Wolfe	10 ml
Resazurina (2 g/L de cultivo madre)	0,5 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
Agente reductor	0,006-0,008 % (v/v)
Agua destilada	Hasta 1 litro, pH 5,5 (ajustada con HCl)
Solución de vitaminas de Wolfe	por litro de solución madre
Biotina	2 mg
Ácido fólico	2 mg
Hidrocloruro de piridoxina	10 mg
Riboflavina	5 mg
Ácido nicotínico	5 mg
D-(+)-Pantotenato de calcio	5 mg
Vitamina B <sub>12</sub>	0,1 mg
Ácido p-aminobenzoico	5 mg
Ácido lipoico	5 mg
Tiamina	5 mg
Agua destilada	hasta 1 litro
Solución de metales traza	por litro de solución madre
Ácido nitrilotriacético	2 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1 g
Fe (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,8 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2 g

ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,02 g
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02 g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Agua destilada	hasta 1 litro
Solución madre de agente reductor	por 100 ml de solución madre
NaOH	0,9 g
Cisteína.HCl	4 g
Na <sub>2</sub> S	4 g
Agua destilada	Hasta 100 ml

#### Construcción del plásmido de expresión:

En esta invención se usaron técnicas de ADN recombinante y clonación molecular convencionales (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989; Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K: Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 1987). Se realizó la optimización de codones de la isopreno sintasa de *Poplar tremuloides* (AAQ16588.1; GI:33358229) (SEQ ID NO: 21) y se sintetizó. Se usó una región de promotor de la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa de *C. autoethanogenum* (SEQ ID NO: 22) para expresar el gen.

El ADN genómico de *Clostridium autoethanogenum* DSM23693 se aisló usando un método modificado por Bertram y Dürre (1989). Se recogió un cultivo de 100 ml de toda la noche (6000 xg, 15 min, 4°C), se lavó con tampón de fosfato de potasio (10 mM, pH 7,5) y se suspendió en 1,9 ml de tampón STE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, Sacarosa 200 mM; pH 8,0). se añadieron 300 µl de lisozima (-100.000 U) y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min, seguido de la adición de 280 µl de una solución de SDS al 10% (p/v) y otra incubación durante 10 min. El ARN se digirió a temperatura ambiente mediante la adición de 240 µl de una solución de EDTA (0,5 M, pH 8), 20 µl de Tris-HCl (1 M, pH 7,5) y 10 µl de RNasa A (Fermentas Life Sciences). A continuación, se añadieron 100 µl de proteinasa K (0,5 U) y se produjo la proteólisis durante 1-3 horas a 37°C. Finalmente, se añadieron 600 µl de perclorato de sodio (5 M), seguido de una extracción con fenol-cloroformo y una precipitación con isopropanol. La cantidad y calidad de ADN se inspeccionaron espectrofotométricamente. La secuencia promotora de la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos Ppfor-NotI-F (SEQ ID NO: 23: AAGCGGCCGCAAAATAGTTGATAATAATGC) y Ppfor-NdeI-R (SEQ ID NO: 24: TACGCATATGAATTCCTCTCCTTTCAAGC) usando la ADN polimerasa de alta fidelidad iProof (Bio-Rad Laboratories) y el siguiente programa: desnaturalización inicial a 98°C durante 30 segundos, seguido de 32 ciclos de desnaturalización (98°C durante 10 segundos), reasociación (50-62°C durante 30-120 segundos) y alargamiento (72°C durante 30-90 segundos), antes de una etapa de extensión final (72°C durante 10 minutos).

#### 25 Construcción del plásmido de expresión de la isopreno sintasa:

La construcción de un plásmido de expresión se llevó a cabo en *E. coli* DH5α-T1<sup>R</sup> (Invitrogen) y XL1-Blue MRF' Kan (Stratagene). En una primera etapa, la región de promotor P<sub>pfor</sub> se clonó en el vector lanzadera de *E. coli-Clostridium* pMTL85141 (FJ797651.1; Nigel Minton, University of Nottingham; Heap et al., 2009) usando los sitios de restricción *NotI* y *NdeI*, generando el plásmido pMTL85146. Como una segunda etapa, se clonó *ispS* en pMTL85146 usando los sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI*, dando como resultado el plásmido pMTL 85146-ispS (Fig. 2, SEQ ID NO: 25).

#### Transformación y expresión en *C. autoethanogenum*

Antes de transformación, el ADN se metiló in vivo en *E. coli* usando un híbrido de metiltransferasa tipo II sintetizado (SEQ ID NO: 63) coexpresado en un plásmido de metilación (SEQ ID NO: 64) diseñado a partir de los genes de metiltransferasa genes de *C. autoethanogenum*, *C. ragsdalei* y *C. ljungdahlii* como se describe en la patente de EE.UU. 2011/0236941.

Tanto el plásmido de expresión como el plásmido de metilación se transformaron en las mismas células que *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> Kan de restricción negativa (Stratagene), lo cual se debe posiblemente a sus orígenes de replicación de Gram(-) compatibles (número de copias alto de ColE1 en el plásmido de expresión y número de copias bajo de p15A en el plásmido de metilación). La metilación in vivo se indujo por adición de IPTG 1 mM, y los plásmidos metilados se usaron en el kit Plasmid Midi Kit de QIAGEN (QIAGEN). La mezcla resultante se usó para los experimentos de transformación con *C. autoethanogenum* DSM23693, pero solo el plásmido de expresión abundante (alto número de copias) tiene un origen de replicación de Gram-(+) (*repL*) dejando que se replique en clostridias.

Transformación en *C. autoethanogenum*:

10 Durante el experimento de transformación completo, *C. autoethanogenum* DSM23693 se cultivó en medio PETC (Tabla 1) complementado con extracto de levadura 1 g/L y fructosa 10 g/L así como 2,11 kg/cm<sup>2</sup> (30 psi) de gas residual de acería (recogido en el sitio de la acería de Nueva Zelanda, en Glenbrook, NZ; composición: 44% de CO, 32% de N<sub>2</sub>, 22% de CO<sub>2</sub>, 2% de H<sub>2</sub>) como fuente de carbono.

15 Para hacer células competentes, se subcultivaron 50 ml de cultivo de *C. autoethanogenum* DSM23693 en medio de nueva aportación durante 3 días consecutivos. Estas células se usaron para inocular 50 ml de medio PETC que contenía DL-treonina 40 mM a una DO<sub>600nm</sub> de 0,05. Cuando el cultivo alcanzó una DO<sub>600nm</sub> de 0,4, las células se transfirieron a una cámara anaeróbica y se recuperaron a 4.700 x g y 4°C. El cultivo se lavó dos veces con tampón de electroporación enfriado con hielo (sacarosa 270 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, fosfato sódico 7 mM, pH 7,4) y finalmente se suspendió en un volumen de 600 µl de tampón de electroporación de nueva aportación. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación previamente enfriada con una separación de los electrodos de 0,4 cm, que contenía 1 µg de la mezcla de plásmido metilados y se aplicaron pulsos inmediatamente usando un sistema de electroporación Gene pulser Xcell (Bio-Rad) con los siguientes ajustes: 2,5 kV, 600 Ω y 25 µF. Se lograron constantes de tiempo de 3,7-4,0 ms. El cultivo se transfirió a 5 ml de medio de nueva aportación. La regeneración de las células se controló a una longitud de onda de 600 nm usando un espectrofotómetro Spectronic Helios Epsilon (Thermo) equipado con un tubo de objetivo. Después de una disminución inicial en la biomasa, las células empezaron a crecer de nuevo. Una vez que la biomasa se había duplicado desde este punto, se recogieron las células, se suspendieron en 200 µl de medio de nueva aportación y se cultivaron en placas de PETC selectivas (que contenían agar Bacto™ al 1,2% (BD)) con los antibióticos adecuados claritromicina 4 µg/ml o toianfenicol 15 µg/ml. Después de 4-5 días de la inoculación con 2,11 kg/cm<sup>2</sup> (30 psi) de gas de acería a 37°C, las colonias eran claramente visibles.

30 Las colonias se usaron para inocular antibióticos en 2 ml de medio PETC. Cuando se produjo el crecimiento, los cultivos se ampliaron de escala hasta un volumen de 5 ml y más tarde de 50 ml con 2,11 kg/cm<sup>2</sup> (30 psi) de gas de acería como única fuente de carbono.

Confirmación de la transformación satisfactoria:

35 Para verificar la transferencia de ADN, se llevó a cabo un plásmido miniprep a partir de 10 ml de volumen de cultivo usando el kit de miniprep de plásmido Zyppy (Zymo). Puesto que la calidad del plásmido aislado no era suficiente para una digestión de restricción debido a la actividad de exonucleasa clostridial [Burchhardt y Dürre, 1990], se llevó a cabo una PCR con el plásmido aislado con la pareja de oligonucleótidos colE1-F (SEQ ID NO: 65: CGTCAGACCCCGTAGAAA) más colE1-R (SEQ ID NO: 66: CTCTCCTGTTCCGACCCT). La PCR se llevó a cabo usando el kit de PCR iNtRON Maximise Premix (Intron Bio Technologies) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C durante 20 segundos), reasociación (55°C durante 20 segundos) y elongación (72°C durante 60 segundos), antes de una etapa de extensión final (72°C durante 5 minutos).

45 Para confirmar la identidad de los clones, se aisló ADN genómico (véase antes) de cultivos de 50 ml de *C. autoethanogenum* DSM23693. Se llevó a cabo una PCR contra el gen ARNr 16S usando los oligonucleótidos fD1 (SEQ ID NO: 67: CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y rP2 (SEQ ID NO: 68: CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT) [Weisberg et al., 1991] y el kit de PCR iNtRON Maximise Premix (Intron Bio Technologies) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C durante 20 segundos), reasociación (55°C durante 20 segundos) y elongación (72°C durante 60 segundos), antes de una etapa de extensión final (72°C durante 5 minutos). Los resultados de secuenciación eran al menos 99,9% frente al gen de ARNr 16s (*rrsA*) of *C. autoethanogenum* (Y18178, GI:7271109).

Expresión del gen de la isopreno sintasa

Se llevaron a cabo experimentos de qRT-PCR para confirmar la expresión satisfactoria del gen de la isopreno sintasa introducido en *C. autoethanogenum*.

55 Un cultivo que albergaba el plásmido de la isopreno sintasa pMTL 85146-ispS y un cultivo de control sin el plásmido, se desarrollaron en frascos de suero de 50 ml y medio PETC (tabla 1) con 2,11 kg/cm<sup>2</sup> (30 psi) de gas residual de acería (recogido del sitio de Nueva Zelanda en Glenbrook, NZ; composición: 44% de CO, 32% de N<sub>2</sub>, 22% de CO<sub>2</sub>, 2% de H<sub>2</sub>) como la única fuente de carbono y energía. Se tomaron muestras de 0,8 ml durante la fase de crecimiento



logarítmico a una  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 0,5 y se mezclaron con 1,6 ml de reactivo de protección de ARN (Qiagen). La mezcla se centrifugó (6.000 x g, 5 min, 4°C), y el sedimento celular se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta la extracción del ARN. El ARN se aisló usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con el protocolo 5 del manual. La rotura de las células se llevó a cabo pasando la mezcla a través de una jeringa 10 veces, y se eluyó en 50 µl de agua exenta de RNasa/DNasa. Después de tratamiento con DNasa I usando el kit DNA-free™ (Ambion), se llevó a cabo entonces la etapa de transcripción inversa usando el kit de transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). El ARN se comprobó usando un dispositivo Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), fluorómetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y por electroforesis en gel. Se llevó a cabo un control no RT para cada par de oligonucleótidos. Todas las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo por duplicado usando un sistema de detección de color simple MyiQ™ (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, EE.UU.) en un volumen de reacción total de 15 µl con 25 ng de molde de ADNc, 67 nM de cada oligonucleótido (tabla 2), y 1x iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, EE.UU.). Las condiciones de reacción fueron 95°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 55°C durante 15 s y 72°C durante 30 s. Para la detección de la dimerización de oligonucleótidos u otros artefactos de amplificación, se llevó a cabo un análisis de curva de fusión inmediatamente después de completarse la qPCR (38 ciclos de 58°C a 95°C a 1°C/s). Se incluyeron dos genes de mantenimiento (guanilato quinasa y formiato tetrahidrofolato ligasa) para cada muestra de ADNc para la normalización. La determinación de la expresión relativa de genes se llevó a cabo usando la herramienta Relative Expression Software Tool (REST©) 2008 V2.0.7 (38). Se usaron diluciones seriadas de ADNc que abarcaban 4 unidades logarítmicas para generar curvas de referencia y las eficacias de amplificación relativas resultantes para calcular la concentración de ARNm.

Tabla 2: Oligonucleótidos para qRT-PCR

Diana	Nombre del oligonucleótido	Secuencia de ADN (de 5' a 3')	SEQ ID NO:
Guanilato quinasa ( <i>gnk</i> )	GnK-F	TCAGGACCTTCTGGAAGCTGG	108
	GnK-R	ACCTCCCCTTTTCTTGGAGA	109
Formiato tetrahidrofolato ligasa (FoT4L)	FoT4L-F	CAGGTTTCGGTGCTGACCTA	110
	FoT4L-R	AACTCCGCCGTTGTATTTC	111
	ispS-F	AGG CTG AAT TTC TTA CAC TTC TTG A	69
Isopreno sintasa	ispS-R	GTA ACT CCA TCA AAT CCT CCA CTA C	70

Aunque no se observó amplificación con la cepa de tipo natural usando la pareja de oligonucleótidos de *ispS*, se midió una señal con la pareja de oligonucleótidos de *ispS* para la cepa que llevaba el plásmido pMTL 85146-*ispS*, confirmando la expresión satisfactoria del gen *ispS*.

Ejemplo 2 - Expresión de la Isopentenil-difosfato delta-isomerasa para la conversión entre los precursores de terpenos clave DMAPP (difosfato de dimetilalilo) y IPP (difosfato de isopentenilo)

La disponibilidad y el equilibrio de los precursores DMAPP (difosfato de dimetilalilo) y IPP (difosfato de isopentenilo) es crucial para la producción de terpenos. Mientras que la ruta de la DXS sintetiza tanto el IPP como el DMAPP por igual, en la ruta del mevalonato el único producto es el IPP. La producción de isopreno solo requiere que esté presente el precursor DMAPP junto con una isopreno sintasa, mientras que para la producción de terpenos superiores y terpenoides, se requiere tener cantidades iguales de IPP y DMAPP disponibles para producir geranilo-PP por una geraniltransferasa.

Construcción del plásmido de expresión de la isopentenil-difosfato delta-isomerasa:

Un gen de la isopentenil-difosfato delta-isomerasa *idi* de *C. beijerinckii* (Gene ID:5294264), que codifica la isopentenil-difosfato delta-isomerasa (YP\_001310174.1), se clonó en la dirección 3' de *ispS*. El gen se amplificó usando el oligonucleótido *Idi-Cbei-SacI-F* (SEQ ID NO: 26: GTGAGCTCGAAAGGGGAAATTAATG) y *Idi-Cbei-KpnI-R* (SEQ ID NO: 27: ATGGTACCCCAAATCTTTATTTAGACG) a partir del ADN genómico de *C. beijerinckii* NCIMB8052, obtenido usando el mismo método descrito antes para *C. autoethanogenum*. El producto de la PCR se clonó en el vector pMTL 85146-*ispS* usando los sitios de restricción *SacI* y *KpnI* para dar el plásmido pMTL85146-*ispS-idi* (SEQ ID NO: 28). El marcador de resistencia a antibiótico se intercambió de *catP* a *ermB* (liberado del vector

pMTL82254 (FJ797646.1; Nigel Minton, University of Nottingham; Heap et al., 2009) usando las enzimas de restricción *PmeI* y *FseI* para formar el plásmido pMTL85246-ispS-idi (Fig. 3).

La transformación y expresión en *C. autoethanogenum* se llevó a cabo como se ha descrito para el plásmido pMTL 85146-ispS. Después de transformación satisfactoria, se llevó a cabo el experimento de crecimiento en 50 ml en frascos de suero de 50 ml y medio PETC (tabla 1) con 2,11 kg/cm<sup>2</sup> (30 psi) de gas residual de acería (recogido de la acería en Nueva Zelanda, en Glenbrook, NZ; composición: 44% de CO, 32% de N<sub>2</sub>, 22% de CO<sub>2</sub>, 2% de H<sub>2</sub>) como la única fuente de carbono y energía. Para confirmar que el plásmido se había introducido de forma satisfactoria, se llevó a cabo la miniprep del plásmido de ADN de transformantes como se ha descrito previamente. La PCR frente al plásmido aislado usando parejas de oligonucleótidos que se dirigen a *colE1* (*colE1*-F: SEQ ID NO: 65: CGTCAGACCCCGTAGAAA y *colE1*-R: SEQ ID NO: 66: CTCTCCTGTTCCGACCCT), *ermB* (*ermB*-F: SEQ ID NO: 106: TTTGTAATTAAGAAGGAG y *ermB*-R: SEQ ID NO: 107: GTAGAATCCTTCTTCAAC) e *idi* (*Idi*-Cbei-SacI-F: SEQ ID NO: 26: GTGAGCTCGAAAGGGGAAATTAATG y *Idi*-Cbei-KpnI-R: SEQ ID NO: 27: ATGGTACCCCAAATCTTTATTAGACG) confirmaron el éxito de la transformación (figura 8). De forma similar, se extrajo el ADN genómico de estos transformantes, y al amplicón de ARNr 16S resultante usando los oligonucleótidos *fD1* y *rP2* (véase antes) confirmaron 99,9% de identidad frente al gen de ARNr 16S de *C. autoethanogenum* (Y18178, GI:7271109).

La confirmación de la expresión del gen satisfactoria se llevó a cabo como se ha descrito antes usando una pareja de oligonucleótidos frente al gen de la isopentenil-difosfato delta isomerasa *idi* (*idi*-F, SEQ ID NO: 71: ATA CGT GCT GTA GTC ATC CAA GAT A e *idi*-R, SEQ ID NO: 72: TCT TCA AGT TCA CAT GTA AAA CCC A) y una muestra de un frasco de suero del experimento de crecimiento con *C. autoethanogenum* que lleva el plásmido pMTL 85146-ispS-idi. También se observó una señal para el gen de la isopreno sintasa *ispS* (Fig. 14).

### Ejemplo 3 - Sobreexpresión de la ruta de la DXS

Para mejorar el flujo a través de la ruta de la DXS, se sobreexpresaron los genes de la ruta. La etapa inicial de la ruta, que convierte la piruvato D-gliceraldehido-3-fosfato (G3P) en desoxixilulosa 5-fosfato (DXP/DXPS/DOXP), es catalizada por una desoxixilulosa 5-fosfato sintasa (DXS).

Construcción del plásmido de expresión para la sobreexpresión de DXS:

El gen *dxs* de *C. autoethanogenum* se amplificó a partir del ADN genómico con los oligonucleótidos *Dxs*-Sall-F (SEQ ID NO: 29: GCAGTCGACTTTATTAAGGGATAGATAA) y *Dxs*-XhoI-R (SEQ ID NO: 30: TGCTCGAGTTAAAATATGACTTACCTCTG) como se ha descrito para otros genes anteriormente. Después el gen amplificado se clonó en el plásmido pMTL85246-ispS-idi con *Sall* y *XhoI* para producir el plásmido pMTL85246-ispS-idi-dxs (SEQ ID NO: 31 y Fig. 4). La secuenciación del ADN usando los oligonucleótidos dados en la tabla 3 confirmó la clonación satisfactoria de *ispS*, *idi*, y *dxs* sin mutaciones (Fig. 5). Los genes *ispS* y *idi* son como se describen en el ejemplo 1 y 2 respectivamente.

Tabla 3: Oligonucleótidos para la secuenciación

Nombre del oligonucleótido	Secuencia de ADN (de 5' a 3')	SEQ ID NO:
M13r	CAGGAAACAGCTATGAC	32
isopreno-seq1	GTTATTCAAGCTACACCTTT	33
isopreno-seq2	GATTGGTAAAGAATTAGCTG	34
isopreno-seq3	TCAAGAAGCTAAGTGGCT	35
isopreno-seq4	CTCACCGTAAAGGAACA	36
isopreno-seq5	GCTAGCTAGAGAAATTAGAA	37
isopreno-seq6	GGAATGGCAAATATCTTGA	38
isopreno-seq7	GAAACACATCAGGGAATATT	39

### Transformación y expresión en *C. autoethanogenum*

La transformación y expresión en *C. autoethanogenum* se llevó a cabo como se ha descrito para el plásmido pMTL 85146-ispS. Después de transformación satisfactoria, se llevó a cabo un experimento de crecimiento en 50 ml en frascos de suero de 50 ml y medio PETC (tabla 1) con 2,11 kg/cm<sup>2</sup> (30 psi) de gas residual de acería (recogido de la acería en Nueva Zelanda, en Glenbrook, NZ; composición: 44% de CO, 32% de N<sub>2</sub>, 22% de CO<sub>2</sub>, 2% de H<sub>2</sub>) como la única fuente de carbono y energía. La confirmación de la expresión de genes se llevó a cabo como se ha descrito

antes a partir de una muestra recogida a  $DO_{600nm} = 0,75$ . Se usó la pareja de oligonucleótidos dxs-F (SEQ ID NO: 73: ACAAAGTATCTAAGACAGGAGGTCA) y dxs-R (SEQ ID NO: 74: GATGTCCCACATCCCATATAAGTTT) para medir la expresión del gen *dxs* tanto en la cepa de tipo natural como en la cepa que lleva el plásmido pMTL 85146-ispS-idi-dxs. Los niveles de ARNm en la cepa que lleva el plásmido se encontró que eran más de 3 veces mayores comparados con el tipo natural (Fig. 15). Se normalizó la biomasa antes de la extracción de ARN.

#### Ejemplo 4 - Introducción y expresión de la ruta del mevalonato

La primera etapa de la ruta del mevalonato (Fig. 7) es catalizada por una tiolasa que convierte dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA (y HS-CoA). Esta enzima se ha expresado satisfactoriamente en los acetógenos carboxidotróficos *Clostridium autoethanogenum* y *C. ljungdahlii* por los mismos autores de la invención (patente de EE.UU. 2011/0236941). Se han diseñado construcciones para los demás genes de la ruta del mevalonato.

#### Construcción del plásmido de expresión del mevalonato:

Se usaron ADN recombinante y técnicas de clonación molecular convencionales (Sambrook, J., y Russell, D., Molecular cloning: A Laboratory Manual 3ª Ed., Cold Spring Harbour Lab Press, Cold Spring Harbour, NY, 2001). En los tres genes necesarios para la síntesis del mevalonato a través de la parte superior de la ruta del mevalonato, es decir, la tiolasa (*thlA/vraB*), HMG-CoA sintasa (HMGS) y HMG-CoA reductasa (HMGR), se realizó la optimización de codones como un operón ( $P_{ptaack}$ -*thlA/vraB*-HMGS- $P_{atp}$ -HMGR).

El promotor del operón de la fosfotransacetilasa/acetato quinasa ( $P_{pta-ack}$ ) de *C. autoethanogenum* (SEQ ID NO: 61) se usó para la expresión de la tiolasa y HMG-CoA mientras que se usó la región de promotor de la ATP sintasa ( $P_{atp}$ ) de *C. autoethanogenum* para la expresión de la HMG-CoA reductasa. Se sintetizaron dos variantes de tiolasa, *thlA* de *Clostridium acetobutylicum* y *vraB* de *Staphylococcus aureus*, y se flanquearon con los sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI* para la subclonación adicional. Tanto la HMG-CoA sintasa (HMGS) como la HMG-CoA reductasa (HMGR) se sintetizaron a partir de *Staphylococcus aureus* y se flanquearon por los sitios de restricción *EcoRI-SacI* y *KpnI-XbaI* respectivamente para la subclonación adicional. Todas las secuencias de ADN optimizadas usadas se dan en la tabla 4.

Tabla 4: Secuencias del plásmido de expresión del mevalonato:

Descripción	Fuente	SEQ ID NO:
Tiolasa ( <i>thlA</i> )	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824; NC_003030.1; GI: 1119056	40
Acetil-CoA c-acetiltransferasa ( <i>vraB</i> )	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50; NC_002758.2; región: 652965..654104; que incluye GI: 15923566	41
3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS)	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50; NC_002758.2; región: 2689180..2690346; que incluye GI: 15925536	42
Hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR)	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50; NC_002758.2; región: complemento (2687648..2688925); que incluye GI: 15925535	43
Operón de la fosfotransacetilasa-acetato quinasa ( $P_{pta-ack}$ )	<i>Clostridium autoethanogenum</i> DSM10061	44
Promotor de la ATP sintasa ( $P_{atp}$ )	<i>Clostridium autoethanogenum</i> DSM10061	45

El promotor de la ATP sintasa ( $P_{atp}$ ) junto con la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR) se amplificaron usando los oligonucleótidos pUC57-F (SEQ ID NO: 46: AGCAGATTGTACTGAGAGTGC) y pUC57-R (SEQ ID NO: 47: ACAGCTATGACCATGATTACG) y pUC57-Patp-HMGR como molde. El fragmento amplificado de 2033 pb se digirió con *SacI* y *XbaI* y se ligó en el vector lanzadera de *E. coli-Clostridium* pMTL 82151 (FJ7976; Nigel Minton, University of Nottingham, Reino Unido; Heap et al., 2009, *J Microbiol Methods*. 78: 79-85) dando como resultado el plásmido pMTL 82151-Patp-HMGR (SEQ ID NO: 76).

La 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS) se amplificó a partir del plásmido sintetizado de codones pGH-seq3.2 usando los oligonucleótidos *EcoRI*-HMGS\_F (SEQ ID NO: 77: AGCCGTGAATTCGAGGCTTTTACTAAAAACA) y *EcoRI*-HMGS\_R (SEQ ID NO: 78: AGGCGTCTAGATGTTTCGTCTCTACAAATAATT). El fragmento amplificado de 1391 pb se digirió con *SacI* y *EcoRI* y se ligó en el plásmido previamente creado pMTL 82151-Patp-HMGR para dar pMTL 82151-HMGS-Patp-HMGR (SEQ ID NO: 79). El plásmido creado pMTL 82151-HMGS-Patp-HMGR (SEQ ID NO: 79) y el operón de codones

optimizados de 1768 pb de P<sub>ptaack</sub>-thIA/vraB se cortaron ambos con *NotI* y *EcoRI*. Se llevó a cabo un ligado y posteriormente se transformó en XL1-Blue MRF' Kan de *E. coli* dando como resultado pMTL8215- P<sub>ptaack</sub>-thIA/vraB-HMGS-P<sub>atp</sub>-HMGR (SEQ ID NO: 50).

5 En los cinco genes necesarios para la síntesis de intermedios clave de terpenoides a partir del mevalonato por la ruta del mevalonato inferior, es decir, la mevalonato quinasa (MK), fosfomevalonato quinasa (PMK), mevalonato difosfato descarboxilasa (PMD), isopentenil-difosfato delta-isomerasa (*idi*) e isopreno sintasa (*ispS*) se realizó la optimización de codones por ATG: Biosynthetics GmbH (Merzhausen, Alemania). La mevalonato quinasa (MK), fosfomevalonato quinasa (PMK) y mevalonato difosfato descarboxilasa (PMD) se obtuvieron de *Staphylococcus aureus*.

10 La región de promotor del complejo RNF (P<sub>rnf</sub>) de *C. autoethanogenum* (SEQ ID NO: 62) se usó para la expresión de la mevalonato quinasa (MK), fosfomevalonato quinasa (PMK) y mevalonato difosfato descarboxilasa (PMD), mientras que la región de promotor de la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (P<sub>for</sub>) de *C. autoethanogenum* (SEQ ID NO: 22) se usó para la expresión de la isopentenil-difosfato delta-isomerasa (*idi*) e isopreno sintasa (*ispS*). Todas las secuencias de ADN usadas se dan en la tabla 5. El Prnf-MK de codones optimizados se amplificó a partir del plásmido sintetizado pGH- Prnf-MK-PMK-PMD con los oligonucleótidos NotI-XbaI-Prnf-MK\_F (SEQ ID NO: 80: ATGCGCGGCCGCTAGGTCTAGAATATCGATACAGATAAAAAAATATATAATACA G) y Sall-Prnf-MK\_R (SEQ ID NO: 81: TGGTTCTGTAACAGCGTATTCACCTGC). Después el gen amplificado se clonó en el plásmido pMTL83145 (SEQ ID NO: 49) con NotI y Sall para producir el plásmido pMTL8314-Prnf-MK (SEQ ID NO: 82). Este plásmido resultante y el fragmento de codones optimizados de 2165 pb PMK-PMD posteriormente se digirió con Sall y HindIII. Se llevó a cabo un ligado dando como resultado el plásmido pMTL 8314-Prnf-MK-PMK-PMD (SEQ ID NO: 83).

25 Se creó el plásmido de expresión de isopreno sin la ruta del mevalonato ligando la isopreno sintasa (*ispS*) flanqueada por los sitios de restricción AgeI y NheI al plásmido de farneseno previamente creado, pMTL 8314-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-*idi-ispA-FS* (SEQ ID NO:91) para dar como resultado el plásmido pMTL8314-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-*idi-ispS* (SEQ ID NO:84). El plásmido final de expresión de isopreno, pMTL 8314-Pptaack-thIA-HMGS-Patp-HMGR-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-*idi-ispS* (SEQ ID NO: 58, figura 10) se crea ligando un fragmento de 4630 pb de Pptaack-thIA-HMGS-Patp-HMGR de pMTL8215-Pptaack-thIA-HMGS-Patp-HMGR (SEQ ID NO: 50) con pMTL 8314-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-*idi-ispS* (SEQ ID NO: 84) usando los sitios de restricción NotI y XbaI.

Tabla 5: Secuencias del plásmido de expresión de isopreno de la ruta del mevalonato

Descripción	Fuente	SEQ ID NO:
Mevalonato quinasa (MK)	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50;	51
	NC_002758.2; región: 665080..665919; que incluye GI:15923580	
Fosfomevalonato quinasa (PMK)	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50;	52
	NC_002758.2; región: 666920..667996; que incluye GI:15923582	
Mevalonato difosfato descarboxilasa (PMD)	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50; NC_002758.2; región: 665924..666907; que incluye GI:15923581	53
Isopreno sintasa ( <i>ispS</i> )	isopreno sintasa de <i>Poplar tremuloides</i> (AAQ16588.1; GI:33358229)	21
Isopentenil-difosfato delta-isomerasa ( <i>idi</i> )	<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052; YP_001310174.1; región: complemento (3597793..3598308); que incluye GI:150017920	54
Promotor del complejo RNF (P <sub>rnf</sub> )	<i>Clostridium autoethanogenum</i> DSM10061	55

30 Ejemplo 5 - Introducción de la farneseno sintasa en *C. autoethanogenum* para la producción de farneseno a partir de CO por la ruta del mevalonato

35 En lugar de producir isopreno directamente a partir de los intermedios clave de terpenoides IPP o DMAPP y después usarlos para la síntesis de terpenos de cadenas más largas, también se pueden sintetizar terpenos de cadena más larga tales como monoterpenoides C10 o sesquiterpenoides C15, directamente a través de la geraniiltransferasa (véase la tabla 6). A partir de la unidad estructural sesquiterpenoide C15 farnesil-PP se puede producir farneseno, que de forma similar al etanol, se puede usar como combustible para el transporte.

Construcción del plásmido de expresión del farneseno:

En los dos genes necesarios para la síntesis del farneseno a partir de IPP y DMAPP por la ruta del mevalonato, es decir, la geraniltranstferasa (ispA) y alfa-farneseno sintasa (FS) se realizó la optimización de codones. La geraniltranstferasa (ispA) se obtuvo de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655 y la alfa-farneseno sintasa (FS) se obtuvo de *Malus x domestica*. Todas las secuencias de ADN usadas se dan en la tabla 6. Se amplificó idi de codones optimizados a partir del plásmido sintetizado pMTL83245-Pfor-FS-idi (SEQ ID NO: 85) por las rutas del mevalonato idi\_F (SEQ ID NO: 86: AGGCACTCGAGATGGCAGAGTATATAATAGCAGTAG) y idi\_R2 (SEQ ID NO:87: AGGCGCAAGCTTGGCGCACCGGTTTATTTAAATATCTTATTTTCAGC). El gen amplificado se clonó después en el plásmido pMTL83245-Pfor con XhoI y HindIII para producir el plásmido pMTL83245-Pfor-idi (SEQ ID NO: 88). Este plásmido resultante y el fragmento de codones optimizados de 1754 pb de la farneseno sintasa (FS) posteriormente se digirieron con HindIII y NheI. Se llevó a cabo un ligado dando como resultado el plásmido pMTL83245-Pfor-idi-FS (SEQ ID NO: 89). El fragmento de 946 pb de ispA y pMTL83245-Pfor-idi-FS después se digirieron con AgeI y HindIII y se ligaron para crear el plásmido resultante pMTL83245-Pfor-idi-ispA-FS (SEQ ID NO: 90). El plásmido de expresión de farneseno sin la ruta del mevalonato superior se creó ligando el fragmento de 2516 pb Pfor-idi-ispA-FS de pMTL83245-Pfor-idi-ispA-FS a pMTL 8314-Prnf-MK-PMK-PMD para dar el plásmido pMTL 8314-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS (SEQ ID NO: 91). El plásmido final de expresión de farneseno pMTL8314S-thIA-HMGS-Patp-HMGR-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS (SEQ ID NO: 59 y figura 18) se crea ligando el fragmento de 4630 pb de Pptaack-thIA-HMGS-Patp-HMGR de pMTL8215- Pptaack-thIA-HMGS-Patp-HMGR (SEQ ID NO: 50) con pMTL 8314-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS (SEQ ID NO: 91) usando los sitios de restricción NotI y XbaI.

Tabla 6: Secuencias del plásmido de expresión de farneseno de la ruta del mevalonato

Descripción	Fuente	SEQ ID NO:
Geraniltranstferasa (ispA)	<i>Escherichia coli</i> cepa K-12 subcepa MG1655; NC_000913.2; región: complemento (439426..440325); que incluye GI:16128406	56
Alfa-farneseno sintasa (FS)	<i>Malus x domestica</i> ; AY787633.1; GI:60418690	57

#### Transformación en *C. autoethanogenum*

La transformación y expresión en *C. autoethanogenum* se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1.

#### 25 Confirmación de la transformación satisfactoria

La presencia de pMTL8314-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS (SEQ ID NO: 59) se confirmó por PCR de colonia usando los oligonucleótidos repHF (SEQ ID NO: 92:AAGAAGGGCGTATATGAAAACCTTGT) y catR (SEQ ID NO: 93: TTCGTTTACAAAACGGCAAATGTGA) que amplifican selectivamente una parte del replicón garm positivo y la mayor parte del gen *cat* en los plásmidos de la serie pMTL831xxx. Dando una banda de 1584 pb (figura 16).

#### 30 Expresión de la ruta del mevalonato inferior en *C. autoethanogenum*

35 Confirmación de la expresión de los genes de la ruta del mevalonato inferior de la mevalonato quinasa (MK SEQ ID NO: 51), fosfomevalonato quinasa (PMK SEQ ID NO: 52), mevalonato difosfato descarboxilasa (PMD SEQ ID NO: 53), Isopentil-difosfato delta-isomerasa (idi; SEQ ID NO: 54), geraniltranstferasa (ispA; SEQ ID NO: 56) y farneseno sintasa (FS SEQ ID NO: 57) se hizo como se ha descrito antes en el ejemplo 1. Usando los oligonucleótidos citados en la tabla 7.

Tabla 7: Lista de oligonucleótidos usados para la detección de la expresión de los genes en la ruta del mevalonato inferior portados en el plásmido pMTL8314Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS (SEQ ID NO: 91)

Diana	Nombre del oligonucleótido	Secuencia de ADN (de 5' a 3')	SEQ ID NO:
Mevalonato quinasa	MK-RTPCR-F	GTGCTGGTAGAGGTGGTTCA	94
	MK-RTPCR-R	CCAAGTATGTGCTGCACCAG	95
Fosfomevalonato quinasa	PMK-RTPCR-F	ATATCAGACCCACACGCAGC	96
	PMK-RTPCR-R	AATGCTTCATTGCTATGTCACATG	97

Mevalonato difosfato descarboxilasa	PMD-RTPCR-F	GCAGAAGCAAAGGCAGCAAT	98
	PMD-RTPCR-R	TTGATCCAAGATTTGTAGCATGC	99
Isopentil-difosfato delta-isomerasa	idi-RTPCR-F	GGACAAACACTTGTGTAGTCACC	100
	idi-RTPCR-R	TCAAGTTCGCAAGTAAATCCCA	101
Geraniltranstransferasa	ispA-RTPCR-F	ACCAGCAATGGATGACGATG	102
	ispA-RTPCR-R	AGTTTGTAAAGCGTCACCTGC	103
Farneseno sintasa	FS-RTPCR-F	AAGCTAGTAGATGGTGGGCT	104
	FS-RTPCR-R	AATGCTACACCTACTGCGCA	105

Los datos de la Rt-PCR que confirman la expresión de todos los genes en la ruta del mevalonato inferior se muestra en la figura 18, estos datos también se resumen en la tabla 8.

- 5 Tabla 8: Valores de CT medios para los genes de la mevalonato quinasa (MK SEQ ID NO: 51), fosfomevalonato quinasa (PMK SEQ ID NO: 52), mevalonato difosfato descarboxilasa (PMD SEQ ID NO: 53), isopentil-difosfato delta-isomerasa (idi SEQ ID NO: 54), geraniltranstransferasa (ispA SEQ ID NO: 56) y farneseno sintasa (FS SEQ ID NO: 57). para dos muestras independientes tomadas de los dos cultivos iniciadores para el experimento de alimentación de mevalonato (véase a continuación).

Gen	Muestra 1 (Ct medio)	Muestra 2 (Ct medio)
MK	21,9	20,82
PMK	23,64	22,81
PMD	24	22,83
Idi	24,23	27,54
ispA	23,92	23,22
FS	21,28 (Ct único)	21,95 (Ct único)
HK (rho)	31,5	28,88

## 10 Producción del alfa-farneseno a partir del mevalonato

Después de confirmación de la transformación satisfactoria del plásmido pMTL8314-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS, se llevó a cabo un experimento de crecimiento en 50 ml de medio PETC (tabla 1) en frascos de suero de 250 ml con 2,11 kg/cm<sup>2</sup> (30 psi) de gas de producción (recogido de la acería de Nueva Zelanda en Glenbrook, NZ; composición: 44% de CO, 32% de N<sub>2</sub>, 22% de CO<sub>2</sub>, 2% de H<sub>2</sub>) como la única fuente de carbono y energía. Todos los cultivos se incubaron a 37°C en un agitador orbital adaptado para soportar frascos de suero. Los transformantes primero se desarrollaron hasta una DO600 de ~0,4 antes de subcultivarlos en medio de nueva aportación complementado con ácido mevalónico 1 mM. Se establecieron controles sin ácido mevalónico al mismo tiempo a partir del mismo cultivo. Se tomaron muestras para GC-MS (cromatografía de gases - espectrometría de masas) en cada tiempo de medición. La figura 17 muestra una curva de crecimiento representativa para 2 cultivos de control y dos cultivos alimentados con mevalonato 1 mM. Se detectó farneseno en las muestras tomadas a las 66 h y 90 h después de iniciar el experimento (figura 19-21).

### Detección de alfa-farneseno por cromatografía de gases - espectrometría de masas

Para la detección por GC-MS del alfa-farneseno se llevó a cabo la extracción en hexano en 5 ml de cultivo añadiendo 2 ml de hexano y agitando energicamente para mezclar en un tubo de tipo Balch de vidrio cerrado. Después los tubos se incubaron en un baño de agua con ultrasonidos durante 5 min para propiciar la separación de fases. Se transfirieron 400 µl de extracto de hexano a un vial de GC y se cargó en el cargador automático. Las muestras se analizaron en un GC/MS con trampa iónica VARIAN GC3800 MS4000 (Varian Inc, CA, EE.UU. Now Agilent Technologies) con una columna EC-1000 de 0,25 µm de espesor de película (Grace Davidson, OR, EE.UU.) estación de trabajo de MS Varian (Varian Inc, Ca. Now Agilent Technologies, CA, EE.UU.) y NIST MS Search 2.0 (Agilent Technologies, CA, EE.UU.). Volumen de inyección de 1 µl con caudal del gas portador helio de 1 ml por min.

5 La invención se ha descrito en la presente memoria con referencia a determinadas realizaciones preferidas, con el fin de permitir que el lector lleve a la práctica la invención sin excesiva experimentación. Sin embargo, una persona experta en la técnica reconocerá fácilmente que muchos de los componentes y parámetros se pueden derivar o modificar en cierta medida o sustituir por equivalentes conocidos. Los títulos, encabezamientos o similares se proporcionan para aumentar la comprensión del lector de este documento, y no deben leerse como limitantes del alcance de la presente invención.

La referencia a cualesquiera solicitudes, patentes y publicaciones en esta memoria descriptiva no es ni debe ser tomada como un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que constituyen una técnica anterior válida o forman parte del conocimiento común general en cualquier país del mundo.

10 A lo largo de esta memoria descriptiva y cualquiera de las siguientes reivindicaciones, salvo que el contexto requiera otra cosa, las palabras "comprende", "que comprende" y similares, deben considerarse en un sentido inclusivo en contraposición a un sentido exclusivo, es decir, en el sentido de "que incluye, pero no limitado a".

**Lista de secuencias**

<110> LANZATECH NEW ZEALAND

15 <120> Microorganismos recombinantes y sus usos

<130> LT79

<160> 111

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 1875

<212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 674 984 T3

<400> 1  
atgagtaatt tattagataa ttataaagat ataaatgacg taaagaagat gtcgtaaataat 60  
gataaaaaaa agctagctag agaaattaga aaatttttaa tagacaaagt atctaagaca 120  
ggaggtcatt tggcgtctaa cttaggggtt gtggagctca ctttgagttt atttagtgta 180  
tttgatctaa attatgataa acttatatgg gatgtgggac atcaggctta tgtgcataaa 240  
atcctcacgg gaagaaagga taaatttgat actttaaggc aatttgaggg attaagtgga 300  
tttcctaaaa ggtgcgaaag tatatatgat ttttcgaaa cagggcatag tagtacttca 360  
atatctgcag cacttggaat ggctagggct agagatttaa agcatgagaa atataatggt 420  
gttgcagtta taggagatgg agcacttact ggaggtatgg cactagaggc cctaaatgat 480  
gtaggttata gaaaaactaa gcttataata atattaaatg ataatacaat gtctatagga 540  
aaaaatgtag gtggagtatc taaatattta aataaactta gagtggaccc taagtataat 600  
aaatttaaag cggatgtaga agctaaatta aaaaagatac ctaatatagg aaaaggaatg 660  
gcaaaatatac ttgaaaaggt aaaaaatgga ataaaacaaa tggtagttcc tggaatgttt 720  
tttgaagata tgggaattaa atatttagga ccaatagatg gtcataatat aaaagaactt 780  
acagacgtac tcgcttctgc aaaagacata caaggtccag ttattataca tataataact 840  
aagaaaggaa aaggatatga atttgcagaa aaaaatccag gtaaattcca tggaataggg 900  
ccttttaatt gcgccaatgg tgaactggat gctggatcct caaatactta ttccaaggcc 960  
tttggaaatg aaatggtaaa gctagcagaa aaagacgata gaatagtggc tataactgca 1020  
gccatgaggg atggaacagg tcttaaaagt ttttctcaa agtttctga aaggttttt 1080  
gatgtgggaa tagcagaaca gcatgctgta accctggcag ctggaatggc acaggcaaat 1140  
ttaaaccctg tatttgcagt ttacttact ttttctcaa gagcttatga tcaacttatt 1200  
catgatgtat gtatgcaaaa acttccagta gtttttgctg tagatagggc cggcattgta 1260  
ggagaagatg gtgaaacaca tcagggaaata tttgatattt cttacttaac ggaaatgcca 1320  
catatgacgc ttatgtctcc taaatgtata gatgaacttc catatatggt aaaatgggca 1380  
ttaggccaga gttttcctgt agctataagg tatccaaggg gaggagatag tgtatgtctc 1440  
aatcccgtag aaaattttaa acttggaag tgggactgta tttcaaatga aggcagtgta 1500  
gcaataattg ctcagggtaa aatggtacaa aatgcagtgt tagcaggaaa aaaacttaaa 1560  
gaaaagggta tagatgtaag gattataagt gcatgtttta ttaagccgct ggacaaggaa 1620  
atgttaaaca ggtagttga agaaagtga actatcgta ctgttgaaga caatgtaata 1680  
agaggaggat taggatccta tatattagaa tatgtaaata aattaaataa aaaagtaaaa 1740  
ataataaact tagggtttga tgataagttt gtacagcatg gaaaatccga tttttgtat 1800  
aagctgtatg gtttggatcc taaaggtatc gtaaatagtg tacttgaagc agcagagga 1860  
agtcatatat tttaa 1875

- 5 <210> 2  
<211> 627  
<212> PRT  
<213> Clostridium autoethanogenum



ES 2 674 984 T3

<400> 2

Met Ser Asn Leu Leu Asp Asn Tyr Lys Asp Ile Asn Asp Val Lys Lys  
 1 5 10 15

Met Ser Leu Asn Asp Lys Lys Lys Leu Ala Arg Glu Ile Arg Lys Phe  
 20 25 30

Leu Ile Asp Lys Val Ser Lys Thr Gly Gly His Leu Ala Ser Asn Leu  
 35 40 45

Gly Val Val Glu Leu Thr Leu Ser Leu Phe Ser Val Phe Asp Leu Asn  
 50 55 60

Tyr Asp Lys Leu Ile Trp Asp Val Gly His Gln Ala Tyr Val His Lys  
 65 70 75 80

Ile Leu Thr Gly Arg Lys Asp Lys Phe Asp Thr Leu Arg Gln Phe Gly  
 85 90 95

Gly Leu Ser Gly Phe Pro Lys Arg Cys Glu Ser Ile Tyr Asp Phe Phe  
 100 105 110

Glu Thr Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala Ala Leu Gly Met Ala  
 115 120 125

Arg Ala Arg Asp Leu Lys His Glu Lys Tyr Asn Val Val Ala Val Ile  
 130 135 140

Gly Asp Gly Ala Leu Thr Gly Gly Met Ala Leu Glu Ala Leu Asn Asp  
 145 150 155 160

Val Gly Tyr Arg Lys Thr Lys Leu Ile Ile Ile Leu Asn Asp Asn Gln  
 165 170 175

Met Ser Ile Gly Lys Asn Val Gly Gly Val Ser Lys Tyr Leu Asn Lys  
 180 185 190

ES 2 674 984 T3

Leu Arg Val Asp Pro Lys Tyr Asn Lys Phe Lys Ala Asp Val Glu Ala  
 195 200 205  
 Lys Leu Lys Lys Ile Pro Asn Ile Gly Lys Gly Met Ala Lys Tyr Leu  
 210 215 220  
 Glu Lys Val Lys Asn Gly Ile Lys Gln Met Val Val Pro Gly Met Phe  
 225 230 235 240  
 Phe Glu Asp Met Gly Ile Lys Tyr Leu Gly Pro Ile Asp Gly His Asn  
 245 250 255  
 Ile Lys Glu Leu Thr Asp Val Leu Ala Ser Ala Lys Asp Ile Gln Gly  
 260 265 270  
 Pro Val Ile Ile His Ile Ile Thr Lys Lys Gly Lys Gly Tyr Glu Phe  
 275 280 285  
 Ala Glu Lys Asn Pro Gly Lys Phe His Gly Ile Gly Pro Phe Asn Cys  
 290 295 300  
 Ala Asn Gly Glu Leu Asp Ala Gly Ser Ser Asn Thr Tyr Ser Lys Ala  
 305 310 315 320  
 Phe Gly Asn Glu Met Val Lys Leu Ala Glu Lys Asp Asp Arg Ile Val  
 325 330 335  
 Ala Ile Thr Ala Ala Met Arg Asp Gly Thr Gly Leu Lys Ser Phe Ser  
 340 345 350  
 Gln Lys Phe Pro Glu Arg Phe Phe Asp Val Gly Ile Ala Glu Gln His  
 355 360 365  
 Ala Val Thr Leu Ala Ala Gly Met Ala Gln Ala Asn Leu Lys Pro Val  
 370 375 380  
 Phe Ala Val Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr Asp Gln Leu Ile  
 385 390 395 400  
 His Asp Val Cys Met Gln Lys Leu Pro Val Val Phe Ala Val Asp Arg  
 405 410 415  
 Ala Gly Ile Val Gly Glu Asp Gly Glu Thr His Gln Gly Ile Phe Asp  
 420 425 430  
 Leu Ser Tyr Leu Thr Glu Met Pro His Met Thr Leu Met Ser Pro Lys  
 435 440 445  
 Cys Ile Asp Glu Leu Pro Tyr Met Leu Lys Trp Ala Leu Gly Gln Ser  
 450 455 460

ES 2 674 984 T3

Phe Pro Val Ala Ile Arg Tyr Pro Arg Gly Gly Asp Ser Val Cys Leu  
 465 470 475 480  
 Asn Pro Val Glu Asn Phe Lys Leu Gly Lys Trp Asp Cys Ile Ser Asn  
 485 490 495  
 Glu Gly Ser Val Ala Ile Ile Ala Gln Gly Lys Met Val Gln Asn Ala  
 500 505 510  
 Val Leu Ala Gly Lys Lys Leu Lys Glu Lys Gly Ile Asp Val Arg Ile  
 515 520 525  
 Ile Ser Ala Cys Phe Ile Lys Pro Leu Asp Lys Glu Met Leu Asn Arg  
 530 535 540  
 Leu Val Glu Glu Ser Val Thr Ile Val Thr Val Glu Asp Asn Val Ile  
 545 550 555 560  
 Arg Gly Gly Leu Gly Ser Tyr Ile Leu Glu Tyr Val Asn Lys Leu Asn  
 565 570 575  
 Lys Lys Val Lys Ile Ile Asn Leu Gly Phe Asp Asp Lys Phe Val Gln  
 580 585 590  
 His Gly Lys Ser Asp Ile Leu Tyr Lys Leu Tyr Gly Leu Asp Pro Lys  
 595 600 605  
 Gly Ile Val Asn Ser Val Leu Glu Ala Ala Glu Val Ser His Ile Phe  
 610 615 620

Arg Glu Phe  
 625

<210> 3

<211> 1158

<212> ADN

5 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 3

atgaagagaa tttcaataat tggagccaca ggttctatag gaacccaaac tcttgatgta 60  
 cttagaaaac aaaaaggaga ttttcagcctt ataggtgtat ctgcaaatag tagtgtagat 120  
 aaacttttac atataataga tgaatttaac cccaaatatg cgggtgctaac cgaaaagaa 180  
 tcttatttaa agataaaaga tatttttagt aataaaaaat caaatacaaa aatattattt 240  
 ggagtagatg gattaaatac tatagctagt cttcctgaag ttgatatggt tgtaacatct 300  
 gtagtggaa tgatagggct tgtaccaact ataaaagcaa ttaaagcgaa gaaagacata 360  
 gctttagcta ataaggagac attagttgta ggaggagaac tggttacaaa attatcgaaa 420  
 gaaaataata taaaaatatt tcctgtagat tcagagcata gtgctgtttt tcaatgcctt 480

ES 2 674 984 T3

cagggaaata attttgacga agttgcta atgattttaa ccgcttcagg tggacctttt 540  
 aggggaaaaa caaaagatca actctcaaaa gtaactgtaa aagaggcggt gaatcatcca 600  
 aattggagta tgggaaaaaa gctcacaata gattctgcta ctcttatgaa taagggactt 660  
 gaagttatag aagctcactt cttatttaac ttaccttatg aaaatataaa ggttgtagtt 720  
 catccacaaa gtatagtaca ttctatggtg gaatataggg atggaagtgt tatggcacag 780  
 cttgccactg cagatatgag attacctata caatatgcac tgaattatcc gaaaagaaag 840  
 gaagctgtaa tagataaatt ggacttctat agcgtaggaa atttaagttt tgaaaagcct 900  
 gatacagata cattcagacc acttaaatta gcttatgaag cagggaggat aggaggcaca 960  
 atgccagcta tactaaattg tgcaaatgag gaagcagtaa gtttattcct tgctaataaa 1020  
 ataaattttt tggatatagg caacatatta gaagagtgta tgaataaatt tacttcacaa 1080  
 agtacgtata ctctggatga ttacttgac ctagaataaa aagttaagaa atatgtaaaa 1140  
 gataaattta tcaaataa 1158

<210> 4

<211> 385

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 4

Met Lys Arg Ile Ser Ile Ile Gly Ala Thr Gly Ser Ile Gly Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Asp Val Leu Arg Lys Gln Lys Gly Asp Phe Gln Leu Ile Gly  
 20 25 30  
 Val Ser Ala Asn Ser Ser Val Asp Lys Leu Leu His Ile Ile Asp Glu  
 35 40 45  
 Phe Asn Pro Lys Tyr Ala Val Leu Thr Glu Lys Glu Ser Tyr Leu Lys  
 50 55 60  
 Ile Lys Asp Ile Phe Ser Asn Lys Lys Ser Asn Thr Lys Ile Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Gly Val Asp Gly Leu Asn Thr Ile Ala Ser Leu Pro Glu Val Asp Met  
 85 90 95  
 Val Val Thr Ser Val Val Gly Met Ile Gly Leu Val Pro Thr Ile Lys  
 100 105 110  
 Ala Ile Lys Ala Lys Lys Asp Ile Ala Leu Ala Asn Lys Glu Thr Leu  
 115 120 125  
 Val Val Gly Gly Glu Leu Val Thr Lys Leu Ser Lys Glu Asn Asn Ile  
 130 135 140

ES 2 674 984 T3

Lys Ile Phe Pro Val Asp Ser Glu His Ser Ala Val Phe Gln Cys Leu  
 145 150 155 160

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

Gly Gly Pro Phe Arg Gly Lys Thr Lys Asp Gln Leu Ser Lys Val Thr  
 180 185 190

Val Lys Glu Ala Leu Asn His Pro Asn Trp Ser Met Gly Lys Lys Leu  
 195 200 205

Thr Ile Asp Ser Ala Thr Leu Met Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu  
 210 215 220

Ala His Phe Leu Phe Asn Leu Pro Tyr Glu Asn Ile Lys Val Val Val  
 225 230 235 240

His Pro Gln Ser Ile Val His Ser Met Val Glu Tyr Arg Asp Gly Ser  
 245 250 255

Val Met Ala Gln Leu Ala Thr Ala Asp Met Arg Leu Pro Ile Gln Tyr  
 260 265 270

Ala Leu Asn Tyr Pro Lys Arg Lys Glu Ala Val Ile Asp Lys Leu Asp  
 275 280 285

Phe Tyr Ser Val Gly Asn Leu Ser Phe Glu Lys Pro Asp Thr Asp Thr  
 290 295 300

Phe Arg Pro Leu Lys Leu Ala Tyr Glu Ala Gly Arg Ile Gly Gly Thr  
 305 310 315 320

Met Pro Ala Ile Leu Asn Cys Ala Asn Glu Glu Ala Val Ser Leu Phe  
 325 330 335

Leu Ala Asn Lys Ile Asn Phe Leu Asp Ile Gly Asn Ile Leu Glu Glu  
 340 345 350

Cys Met Asn Lys Phe Thr Ser Gln Ser Thr Tyr Thr Leu Asp Asp Leu  
 355 360 365

Leu Asp Leu Glu Ile Lys Val Lys Lys Tyr Val Lys Asp Lys Phe Ile  
 370 375 380

Lys  
 385

<210> 5

<211> 693

<212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

5

ES 2 674 984 T3

<400> 5  
atgaatggta attatgctat tattgtagct gccggcaagg gaaaaagaat gggactact 60  
attaataagc aatttattaa aattaagggt aagcctatat tatattattc cataagggca 120  
ttttccataa atcctcttat agatggaatt atactgggtat gtgcagaaac tgagatagaa 180  
tattgtaaaa gagaagtagt agataaatat gggcttcaga aggtaattaa attagttgct 240  
gggggtaaag aacgtcagga ttcgggtattt aatggactag gagttttaga aaaagaaaac 300  
tgtagtgttg ttctaattca cgatggggct agaccttttg tcactagtaa aattattgat 360  
gatggaataa aatattctaa taggtatggg gcttgtgctt gtggagttag gcctaaggat 420  
acactaaaag ttagggaaga aagtggattt tcttcttcta cattagagag aaaaagttta 480  
tttgagttc aaactccgca gtgttttaaa tatgatthaa tttatgactg tcataaaaaa 540  
ttaatgaatg aaaaaatgtg tgttactgat gatactatgg tagtagagcg ttatggaat 600  
aaggtttatt tgtatgaagg taactatgaa aacataaaag tgaccacacc agaagattta 660  
aatatagctg aaagtatagt tgaaaaatat taa 693

<210> 6

<211> 230

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 6

Met Asn Gly Asn Tyr Ala Ile Ile Val Ala Ala Gly Lys Gly Lys Arg  
1 5 10 15

Met Gly Thr Thr Ile Asn Lys Gln Phe Ile Lys Ile Lys Gly Lys Pro  
20 25 30

Ile Leu Tyr Tyr Ser Ile Arg Ala Phe Ser Ile Asn Pro Leu Ile Asp  
35 40 45

Gly Ile Ile Leu Val Cys Ala Glu Thr Glu Ile Glu Tyr Cys Lys Arg  
50 55 60

Glu Val Val Asp Lys Tyr Gly Leu Gln Lys Val Ile Lys Leu Val Ala  
65 70 75 80

Gly Gly Lys Glu Arg Gln Asp Ser Val Phe Asn Gly Leu Gly Val Leu  
85 90 95

Glu Lys Glu Asn Cys Ser Val Val Leu Ile His Asp Gly Ala Arg Pro  
100 105 110

Phe Val Thr Ser Lys Ile Ile Asp Asp Gly Ile Lys Tyr Ser Asn Arg  
115 120 125

Tyr Gly Ala Cys Ala Cys Gly Val Arg Pro Lys Asp Thr Leu Lys Val  
130 135 140

ES 2 674 984 T3

Arg Glu Glu Ser Gly Phe Ser Ser Ser Thr Leu Glu Arg Lys Ser Leu  
145 150 155 160

Phe Ala Val Gln Thr Pro Gln Cys Phe Lys Tyr Asp Leu Ile Tyr Asp  
165 170 175

Cys His Lys Lys Leu Met Asn Glu Lys Met Cys Val Thr Asp Asp Thr  
180 185 190

Met Val Val Glu Arg Tyr Gly Asn Lys Val Tyr Leu Tyr Glu Gly Asn  
195 200 205

Tyr Glu Asn Ile Lys Val Thr Thr Pro Glu Asp Leu Asn Ile Ala Glu  
210 215 220

Ser Ile Val Glu Lys Tyr  
225 230

<210> 7

<211> 798

5 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 7

gtgggaaaaa gaaaagatgg gtatcatctt ttgaaaatga taatgcagaa tatagactta	60
tatgatgttt taaaaataga tgagatcaaa actggaatac agatatgctc taataataga	120
tatattccct gtgacaggag aaatttggtt tacagagcag caaaattatt tattgataaa	180
tataatataa agaatggaat tagtataaac ataggtaaaa atatacctgt atcagctgga	240
cttgctggtg gaagtgcgga tgctgcagct aactaaaga ctatgagaaa tatttatact	300
cctgaagtaa gtgataaaga attgagcga ttaggcctaa atataggggc agatgttcct	360
tattgtataa taggaggtag agccttgctg gaggggatag gagagaagg tagaccactc	420
atgccgttta gaaaccatat actcatatta attaaaccac cttttggagt gagcacagca	480
gaggtatata agagttaga cataagtaa ataaaaaggc atcctaatac agaaatttta	540
atagatgctg ttaatgaatc aaaattggag atgctgagta aaaacatgaa aaatgtttg	600
gaaaatgtaa ctttaaaaaa atatcccgtg cttagaaaaa taaaactga tttgatagat	660
tttgagcag ttggttact tatgagtgga agcgggtcaa gcatttttgc ttttttgat	720
gatatgctaa aagcacagaa atgttatgat aatatgaaaa ctaggtatag agagggttt	780
attacaagaa ccatttaa	798

<210> 8

10 <211> 265

<212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 674 984 T3

<400> 8

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

<210> 9

<211> 480

<212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

5



ES 2 674 984 T3

<400> 9  
 gtgaaaatcg ggcttgggta tgatgtccat aaattagttt ataatagacc tcttatttta 60  
 ggaggcgtaa atatcccttt tgaaaaagggt cttatgggac attcagatgc agatgtactt 120  
 cttcatgcaa taatggatag tctccttggg gccttgtgtc taggtgatat cggcaagcat 180  
 ttccctgata atgataataa atataagaac atatgtagtc ttaaattgct gtcacatgta 240  
 tcagctttga ttaatgaaaa aggatatact ataggggaaca tagattctat tataatagcc 300  
 gaaaagccta aactttcttc atacatacaa gatatgaggg taaatatagc taaaactcta 360  
 aatgtaacta cagccgtaat aagtgtaaaa gccactacag aggaagggtct tggctttacc 420  
 ggcaaaggag aaggcatagc cgctcaaagc atctgtttgt taacagctaa ttcaaaataa 480

<210> 10  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium autoethanogenum

5

<400> 10  
 Met Lys Ile Gly Leu Gly Tyr Asp Val His Lys Leu Val Tyr Asn Arg  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Ile Leu Gly Gly Val Asn Ile Pro Phe Glu Lys Gly Leu Met  
 20 25 30  
 Gly His Ser Asp Ala Asp Val Leu Leu His Ala Ile Met Asp Ser Leu  
 35 40 45  
 Leu Gly Ala Leu Cys Leu Gly Asp Ile Gly Lys His Phe Pro Asp Asn  
 50 55 60  
 Asp Asn Lys Tyr Lys Asn Ile Cys Ser Leu Lys Leu Leu Ser His Val  
 65 70 75 80  
 Ser Ala Leu Ile Asn Glu Lys Gly Tyr Thr Ile Gly Asn Ile Asp Ser  
 85 90 95  
 Ile Ile Ile Ala Glu Lys Pro Lys Leu Ser Ser Tyr Ile Gln Asp Met  
 100 105 110  
 Arg Val Asn Ile Ala Lys Thr Leu Asn Val Thr Thr Ala Val Ile Ser  
 115 120 125  
 Val Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gly Leu Gly Phe Thr Gly Lys Gly Glu  
 130 135 140  
 Gly Ile Ala Ala Gln Ser Ile Cys Leu Leu Thr Ala Asn Ser Lys  
 145 150 155

<210> 11  
 <211> 1051  
 <212> ADN  
 <213> Clostridium autoethanogenum

10

ES 2 674 984 T3

<400> 11  
 ttgaatagag taaaaaagaa aacagtaaag gtaggcaata tatttttagg tggagatfff 60  
 ccagtagccg tacaatctat gacaaatacg gatactaggg atgtagaagc cactacagct 120  
 cagatatttc agctaaaaga agcaggttgt gatatcgta gatgtgcggt gcctgatgat 180  
 atagcttgca attccatgaa aaaaatcata gaaagagtag atattccact tgtagcagat 240  
 atacattttg attataagtt ggcgcttaaa tctatagaaa atgggatatc tgcacttaga 300  
 ataaatcctg gaaatattgg aagcatagaa agagtacgag aagtggcaag agcagcaaaa 360  
 gaagctaata ttccaattag aataggggta aactctggat cattaaaaaa agatatttta 420  
 aataaatatg gtagagtttg ttcggatgca ctagtagaga gtgctctaga acatgtaaaa 480  
 attttgaaa acgtaggatt ttatgatata gttatatcca taaaatcttc aaatgtaaat 540  
 cagatgatag aaagttatag aaaaatatct gaaattgtag attatccact tcaccttggg 600  
 gtaacagaag caggaactat ttggcgagga actataaaat caagcatagg cataggtact 660  
 cttttgatgg aaggtatagg agacactata agagtatctc ttacaggaaa tccagtggaa 720  
 gaagtaagag tgggaaaaga aatattaaaa tcctgtggaa ttataaaaga aggtgtggaa 780  
 tttatatcat gtcccactg tggtagaact gaaattgatt taattaaaat agctgagcaa 840  
 gtggaaaaaa gacttttaaa tatgcataaa aacataaagg ttgctgttat gggatgtgta 900  
 gtaaatggac caggtgaggc tcgggaagca gatattggta tagcaggcgg caaaggtgaa 960  
 ggcattatat ttaaaaaagg aaaaatagta aaaaaggtaa gtgaagaaag tttagtagaa 1020  
 tcacttatag aagaaataga aacatttga r 1051

<210> 12

<211> 349

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 12

Met Asn Arg Val Lys Lys Lys Thr Val Lys Val Gly Asn Ile Phe Leu  
 1 5 10 15

Gly Gly Asp Phe Pro Val Ala Val Gln Ser Met Thr Asn Thr Asp Thr  
 20 25 30

Arg Asp Val Glu Ala Thr Thr Ala Gln Ile Phe Gln Leu Lys Glu Ala  
 35 40 45

Gly Cys Asp Ile Val Arg Cys Ala Val Pro Asp Asp Ile Ala Cys Asn  
 50 55 60

ES 2 674 984 T3

Ser Met Lys Lys Ile Ile Glu Arg Val Asp Ile Pro Leu Val Ala Asp  
65 70 75 80

Ile His Phe Asp Tyr Lys Leu Ala Leu Lys Ser Ile Glu Asn Gly Ile  
85 90 95

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

Arg Glu Val Ala Arg Ala Ala Lys Glu Ala Asn Ile Pro Ile Arg Ile  
115 120 125

Gly Val Asn Ser Gly Ser Leu Lys Lys Asp Ile Leu Asn Lys Tyr Gly  
130 135 140

Arg Val Cys Ser Asp Ala Leu Val Glu Ser Ala Leu Glu His Val Lys  
145 150 155 160

Ile Leu Glu Asn Val Gly Phe Tyr Asp Ile Val Ile Ser Ile Lys Ser  
165 170 175

Ser Asn Val Asn Gln Met Ile Glu Ser Tyr Arg Lys Ile Ser Glu Ile  
180 185 190

Val Asp Tyr Pro Leu His Leu Gly Val Thr Glu Ala Gly Thr Ile Trp  
195 200 205

Arg Gly Thr Ile Lys Ser Ser Ile Gly Ile Gly Thr Leu Leu Met Glu  
210 215 220

Gly Ile Gly Asp Thr Ile Arg Val Ser Leu Thr Gly Asn Pro Val Glu  
225 230 235 240

Glu Val Arg Val Gly Lys Glu Ile Leu Lys Ser Cys Gly Ile Ile Lys  
245 250 255

Glu Gly Val Glu Phe Ile Ser Cys Pro Thr Cys Gly Arg Thr Glu Ile  
260 265 270

Asp Leu Ile Lys Ile Ala Glu Gln Val Glu Lys Arg Leu Leu Asn Met  
275 280 285

His Lys Asn Ile Lys Val Ala Val Met Gly Cys Val Val Asn Gly Pro  
290 295 300

Gly Glu Ala Arg Glu Ala Asp Ile Gly Ile Ala Gly Gly Lys Gly Glu  
305 310 315 320

Gly Ile Ile Phe Lys Lys Gly Lys Ile Val Lys Lys Val Ser Glu Glu  
325 330 335

Ser Leu Val Glu Ser Leu Ile Glu Glu Ile Glu Asn Ile  
340 345

<210> 13

5 <211> 1923

<212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 674 984 T3

<400> 13  
 gtgataaaat tgaacattat tttagcagac aaatccggat tttgctttgg agtaaaaaga 60  
 gctgtagacg aatcttttaa ggttcaaaaa aaatttaata aaaaaatata tacttttaggt 120  
 cctttgattc ataatagtga tgtagtaaat aaattaaagg aaaaaggat atatcctata 180  
 gaaatagata atatagataa tctaagggaa gatgatgtgg ttataatagc ttctcatggt 240  
 gttcccgaag aaatattttt tacttttaaaa aataaaaaaa taaacatagt aaatgcaact 300  
 tgcccatatg ttttaaatat acaaagaaaa gtacaagaat attataaatt agggatttct 360  
 atattaatag taggagataa aaatcatcct gaagtaattg gaataaatgg atgggtgtaa 420  
 aataaagctt taatatctaa agatggcacc aatthagaaa agttaccatc aaaactgtgt 480  
 atagtttctc aaactacaga aaaacaatct aactgggaaa aagtgcttag tatagtggtc 540  
 aaaaattgta aagaatttat tgcttttaat actatatgca gtgccacaga atttcgtcag 600  
 aaggcagcag cagatatttc taaagaagta gatatgatgg tagtaatagg tggtaaaaac 660  
 agctctaata ctactaaact ttatgaaata tgtaaagata actgcaataa tactatttat 720  
 gttgaaaatt caggagaaat acctgatgat ataagtaatt gtaataaaat taaaactata 780  
 ggtgttacag caggagcttc aaccaccagat tggataataa aggaggcaat tttaaaaatg 840  
 agttagtaca aaaatttaga actaaatgag caactatcct atatggacaa aaatgatacc 900  
 caaataatat taggtgaaaa aattaagggt acagtaatat ctgtaaatcc aaaagaggtt 960  
 tttttaaata taggatataa atcagaagggt gtactttcaa aacgtgaaat aacaaaaaat 1020  
 gaaagtgaca acttagaaga attaattcat tgtggagatg aattatatgt taaagtaata 1080  
 agaagacaaa atgaagatgg atatgtggta ttatctaaga tagaattaga aagagaaaat 1140  
 gcttataaag aattaaagga agctaatgga aatagtcagg tattaagggt tattgtaaaa 1200  
 gaagctgtaa atggaggctc tgttgccaat tacaaagggt ctagggattt tatacctgct 1260  
 tctcatgtag aattatatca tgtagatgat ctttcacaat atgtagataa agagcttgat 1320  
 gtaactataa ttgaatttaa agaagaaaag aaaggtagca gaatagtagc ttcaagaaga 1380  
 gaccttttga gaatggaaag agaaaaatg gaagaacaga cttggaatgt gcttgaaaaa 1440  
 gatactgtag tagatgggtga agttagaaga ttgactgatt ttggcgcat tgttgatgta 1500  
 caaggagttg acgggcttct acatgtatct gaactttcct ggggaagagt tggaaaacca 1560  
 agttagtgtt taaaaatcgg agatacgatt aaggtttata tcttagacat tgataaagaa 1620  
 aaaaagaagt tatctttatc tttaaaaaag ctcatggaag atccatggat caacgtagac 1680  
 ataaaatc ctgttgccaa tgtagttctt ggtaaagtag ttaggtttgc aaatittggt 1740  
 gcatttggtg aattagagcc aggtgtagat gcattagttc atatatcaca aataagccat 1800  
 aagagaatag ataaaccaga agatgtactt aaaataggtc aggaataaaa ggctaagatc 1860  
 cttgaagtaa acaaagatag cgaaaaaata gctttaagta taaaagaagt agatgaaatc 1920  
 taa 1923

- 5 <210> 14
- <211> 640
- <212> PRT
- <213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 674 984 T3

<400> 14

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

ES 2 674 984 T3

Glu Val Asp Met Met Val Val Ile Gly Gly Lys Asn Ser Ser Asn Thr  
 210 215 220  
 Thr Lys Leu Tyr Glu Ile Cys Lys Asp Asn Cys Asn Asn Thr Ile Tyr  
 225 230 235  
 Val Glu Asn Ser Gly Glu Ile Pro Asp Asp Ile Ser Asn Cys Asn Lys  
 245 250 255  
 Ile Lys Thr Ile Gly Val Thr Ala Gly Ala Ser Thr Pro Asp Trp Ile  
 260 265 270  
 Ile Lys Glu Ala Ile Leu Lys Met Ser Asp Asp Lys Asn Leu Glu Leu  
 275 280 285  
 Asn Glu Gln Leu Ser Tyr Met Asp Lys Asn Asp Thr Gln Ile Ile Leu  
 290 295 300  
 Gly Glu Lys Ile Lys Gly Thr Val Ile Ser Val Asn Pro Lys Glu Val  
 305 310 315 320  
 Phe Leu Asn Ile Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Val Leu Pro Lys Arg Glu  
 325 330 335  
 Ile Thr Lys Asn Glu Ser Asp Asn Leu Glu Glu Leu Ile His Cys Gly  
 340 345 350  
 Asp Glu Leu Tyr Val Lys Val Ile Arg Arg Gln Asn Glu Asp Gly Tyr  
 355 360 365  
 Val Val Leu Ser Lys Ile Glu Leu Glu Arg Glu Asn Ala Tyr Lys Glu  
 370 375 380  
 Leu Lys Glu Ala Asn Gly Asn Ser Gln Val Leu Lys Val Ile Val Lys  
 385 390 395 400  
 Glu Ala Val Asn Gly Gly Leu Val Ala Asn Tyr Lys Gly Ala Arg Val  
 405 410 415  
 Phe Ile Pro Ala Ser His Val Glu Leu Tyr His Val Asp Asp Leu Ser  
 420 425 430  
 Gln Tyr Val Asp Lys Glu Leu Asp Val Thr Ile Ile Glu Phe Lys Glu  
 435 440 445  
 Glu Lys Lys Gly Thr Arg Ile Val Ala Ser Arg Arg Asp Leu Leu Arg  
 450 455 460  
 Met Glu Arg Glu Lys Met Glu Glu Gln Thr Trp Asn Val Leu Glu Lys  
 465 470 475 480

ES 2 674 984 T3

Asp Thr Val Val Asp Gly Glu Val Arg Arg Leu Thr Asp Phe Gly Ala  
 485 490 495  
 Phe Val Asp Val Gln Gly Val Asp Gly Leu Leu His Val Ser Glu Leu  
 500 505 510  
 Ser Trp Gly Arg Val Gly Lys Pro Ser Asp Val Leu Lys Ile Gly Asp  
 515 520 525  
 Thr Ile Lys Val Tyr Ile Leu Asp Ile Asp Lys Glu Lys Lys Lys Leu  
 530 535 540  
 Ser Leu Ser Leu Lys Lys Leu Met Glu Asp Pro Trp Ile Asn Val Asp  
 545 550 555 560  
 Ile Lys Tyr Pro Val Gly Asn Val Val Leu Gly Lys Val Val Arg Phe  
 565 570 575  
 Ala Asn Phe Gly Ala Phe Val Glu Leu Glu Pro Gly Val Asp Ala Leu  
 580 585 590  
 Val His Ile Ser Gln Ile Ser His Lys Arg Ile Asp Lys Pro Glu Asp  
 595 600 605  
 Val Leu Lys Ile Gly Gln Glu Ile Lys Ala Lys Ile Leu Glu Val Asn  
 610 615 620  
 Lys Asp Ser Glu Lys Ile Ala Leu Ser Ile Lys Glu Val Asp Glu Ile  
 625 630 635 640

<210> 15

<211> 882

<212> ADN

5 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 15

atggaatta aaggtgtaat tgaacatta agagaggaat tgaataaata cctctatgac	60
tatatggagg gaaaaggatc ttataataag agagtatatg aagctatgca gtatagctta	120
gatgcaggag gaaagagaat aagacctcta ctatttcttt tgacatataa actttataag	180
acagattgca atgaggttat ggatatagca gcagctatag aaatgatata cacttattcc	240
ttaattcatg atgatttacc tgctatggac aatgatgatt taagaagggg caaacctaca	300
aatcataagg tatttgagaga agctattgct gtacttgccg gagatggact tttaaatgaa	360
gcaatgagtc tgatgtttag aactgtatt gggaaaaagg ataacgctat aagggttgt	420
agcattatct ctgaaagtgc aggagctgat gggatggttg gcggacagac agtggatatt	480
ttaagtgaac aactaagat acctatagat cagctctatt acatgcacag taaaaaacg	540
ggagcgtca taaaaggatc tataatatct gcagcagtat atgcgggagc aagtaaagct	600
gaaatagata aattaagcta ttatggagaa aagtaggat tggcatttca aataaggat	660
gatatattgg atttaacagg agatactgct ctttaggta aaaagataaa aagtgatcta	720
aataataaca aaactacatt tataagtact tatggaataa ataatgcaa agaaatgtgc	780
aattcaatta caagtgaatg tataggagta ctgaatggga tgagtgtaga tacttcttat	840
ctaaaagatt taacatcatt tttattaaat agagaaaagt ga	882

10 <210> 16

<211> 293

<212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 674 984 T3

<400> 16

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

Page 17

Gly Glu Lys Leu Gly Leu Ala Phe Gln Ile Lys Asp Asp Ile Leu Asp  
 210 215 220  
 Leu Thr Gly Asp Thr Ala Leu Leu Gly Lys Lys Ile Lys Ser Asp Leu  
 225 230 235 240  
 Asn Asn Asn Lys Thr Thr Phe Ile Ser Thr Tyr Gly Ile Asn Lys Cys  
 245 250 255  
 Lys Glu Met Cys Asn Ser Ile Thr Ser Glu Cys Ile Gly Val Leu Asn  
 260 265 270  
 Gly Met Ser Val Asp Thr Ser Tyr Leu Lys Asp Leu Thr Ser Phe Leu  
 275 280 285  
 Leu Asn Arg Glu Lys  
 290

- 5 <210> 17
- <211> 519
- <212> ADN
- <213> Clostridium autoethanogenum



ES 2 674 984 T3

<400> 17  
atgaataaaa caaggaaaat ggTTTTTTta agcttttctaa caagtatggc tttagtcata 60  
tacataatag aaactcaagt tccggTTTTta tttcccgaa taaaattagg acttgcaaat 120  
acaatttccc tagctgcaact tatacttata ggatggaaag aagccttact aattatgttt 180  
ttaaggagcg ttctaggatc tatgtttggg gggacaatgt ctacctttat gttcagcata 240  
gccggaggaa ttttaagtaa cattgttatg atccttctat acaaatattt taaaaattcc 300  
ttaagtctat ggactataag catatgcggg gcaatatttc acaacatagg ccaactttta 360  
gtagcttcta tagtaattca agattttagg atatacatat atctaccggt gcttttaatc 420  
tctgctataa tcacaggata ctttataggt tggTgcgtga aattcctaac taataactta 480  
tataaaattc ctatgtttta agaattaaaa aataagtaa 519

<210> 18

<211> 172

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 18

Met Asn Lys Thr Arg Lys Met Val Phe Leu Ser Phe Leu Thr Ser Met  
1 5 10 15

Ala Leu Val Ile Tyr Ile Ile Glu Thr Gln Val Pro Val Leu Phe Pro  
20 25 30

Gly Ile Lys Leu Gly Leu Ala Asn Thr Ile Ser Leu Ala Ala Leu Ile  
35 40 45

Leu Ile Gly Trp Lys Glu Ala Leu Leu Ile Met Phe Leu Arg Thr Leu  
50 55 60

Leu Gly Ser Met Phe Gly Gly Thr Met Ser Thr Phe Met Phe Ser Ile  
65 70 75 80

Ala Gly Gly Ile Leu Ser Asn Ile Val Met Ile Leu Leu Tyr Lys Tyr  
85 90 95

Phe Lys Asn Ser Leu Ser Leu Trp Thr Ile Ser Ile Cys Gly Ala Ile  
100 105 110

Phe His Asn Ile Gly Gln Leu Leu Val Ala Ser Ile Val Ile Gln Asp  
115 120 125

Phe Arg Ile Tyr Ile Tyr Leu Pro Val Leu Leu Ile Ser Ala Ile Ile  
130 135 140

Thr Gly Tyr Phe Ile Gly Trp Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Asn Leu  
145 150 155 160

10 Tyr Lys Ile Pro Met Phe Lys Glu Leu Lys Asn Lys  
165 170

<210> 19

<211> 825

<212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 674 984 T3

<400> 19  
atgaacttcg atggaatttc aattccaata ataaaagaac ttaatcaact tgagttagag 60  
ttaaaaaata ttgcatcaaa attagattct actgttacac aagatatttt tacctacttt 120  
ttttcaattc caggtaaaag actaagacct acattaacat ttttatctgc aggtgctatt 180  
agtagcgagc ttacttcata tgcaaaacac aacttaattc agttgtcaat aagcttagag 240  
cttattcaca gcgctagtct aattcatgat gatatcatag atggtgactt actaagacgt 300  
ggtcagaaaa ccttaataa gacctttgga aataaaatag cagtacttgc cggatgatgct 360  
ttgtactcaa gggcctttac tttttctca gatactctgc caagagaatt tgcgcaggta 420  
atgggcagag ttactgaatc aatgtctgta gctgaaatat taaatgctaa caatccctct 480  
cccgatcgtg aaacctatct taaaatcctc ttaggaaaaa cagcatcttt catgagcgct 540  
tgttgtaggc ttggtggcag catagcttat gccccttacg aagagtctaa tatgctttct 600  
aaatacgggtg aaaaccttgg tatggcatat caaatactgg atgattatat cgatgaggat 660  
cccgttgcaa tgaaaaatgt aactattgaa gagggatttg aatttgcata taatgccaaa 720  
gcttctattg aaaatttaaa agactcagca tacaacaaa gcttaataat gttagtagac 780  
tatgttttag atttttatag tcctaaggta gagaatacat tatag 825

<210> 20

<211> 274

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 674 984 T3

<400> 20

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

Thr Leu

- 5 <210> 21
- <211> 1797
- <212> ADN
- <213> Populus tremuloides

ES 2 674 984 T3

<400> 21  
 catatggcaa cagaattatt atgtttacac agacctatat cacttactca caaacttttt 60  
 aggaatccat tacctaaagt tattcaagct acacctttaa cattaact taggtgtagt 120  
 gtttctacag aaaatgtatc atttagtgag acagaaactg aaacaagaag atcagcaaat 180  
 tatgaaccaa attcttggga ttatgattat cttctttctt ctgatactga tgagtcaata 240  
 gaagtacata aagataaggc taagaaatta gaagctgaag ttaggagaga aataaataat 300  
 gagaaggctg aatttcttac acttcttgaa cttattgata atgtacaaag acttggatta 360  
 ggatatagat ttgagtctga tataagaaga gcattagata gatttgtaag tagtggagga 420  
 tttgatggag ttactaaaac ttcattacat ggaacagcat tatcatttag gttattaagg 480  
 caacatgggt ttgaagtatc tcaagaagct ttttagtggat ttaaagatca gaatggaac 540  
 tttcttgaga atttaaagga agacataaaa gcaattcttt ctctttatga agcatcattt 600  
 ttagcattag aaggtagaaa tatattagat gaggctaaag tatttgcaat atctcatctt 660  
 aaagaactta gtgaagaaaa gattggtaaa gaattagctg aacaagtctt acatgcttta 720  
 gaattacat tacatagaag aacacaaaga ttagaagcag tttggtcaat agaagcatat 780  
 agaaagaaag aagacgcaa tcaagtactt ttagaacttg caatacttga ctacaatatg 840  
 attcaaagtg tatatcagag ggatttaaga gaaacatcaa gatggtggag aagagtagga 900  
 ttagcaacta aattacattt tgctagagat aggttattg aaagttttta tgggctgtt 960  
 ggagttgctt ttgaaccaca atattctgat tgcagaaata gtgtagcaaa gatgttttca 1020  
 tttgttacta taattgacga tatttacgat gtatatggaa ctttagatga acttgaactt 1080  
 tttactgatg cagttgaaag atgggatgta aatgctatta atgatcttcc tgattatag 1140  
 aagttatggt ttcttgcact ttacaatact attaacgaga tagcttacga taacttaaaa 1200  
 gataaagggt agaacatact tccttattta acaaaagcat gggcagattt atgtaatgca 1260  
 tttcttcaag aagctaagtg gctttataat aaatcaacac ctacatttga tgattatttt 1320  
 ggaaatgcat ggaaaagttc tagtggacct ttacagctta tttttgctta ttttgctgta 1380  
 gtacagaaca ttaaaaagga agagattgag aatcttcaga aatatcatga cataatatca 1440  
 agacctagtc acatttttag gctttgtaat gatttagcat ctgcttcagc agaaatagca 1500  
 agaggtgaaa ctgctaattc tgtaagttgt tatatgagaa caaaaggat atctgaagaa 1560  
 ttagctactg aaagtgttat gaatcttata gacgaaactt ggaagaaaat gaacaaagaa 1620  
 aaacttgggt gatctttatt tgcaaacct tttgttgaga ctgctataaa tttagctaga 1680  
 cagtctcatt gcacatatca taatggtgat gcacatacta gtccagatga attaactagg 1740  
 aaaagagtac ttagtgtaat aactgaacca atattacat ttgaagata agaattc 1797

- 5 <210> 22  
 <211> 617  
 <212> ADN  
 <213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 674 984 T3

```

<400> 22
ggttaatggt aaaaatttat agtataactt taaaaaactg tcttaaaaag ttgttatata      60
aaaaatggtg acaattaaac agctatntag tgcaaaacaa ccataaaaat ttaaaaaata      120
ccataaatta ctgaaaaat agttgataat aatgtagagt tataaacaaa ggtgaaaagc      180
attacttgta ttcittttta tatattatta taaattaaaa tgaagctgta ttagaaaaaa      240
tacacacctg taatataaaa ttttaaatta atttttaatt ttttcaaat gtattttaca      300
tgtttagaat ttgtagtat attaaaatag tagaatacat aagatactta atttaattaa      360
agatagttaa gtacttttca atgtgctttt ttagatgttt aatacaaatc ttaattgta      420
aaagaaatgc tgtactatnt actgtactag tgacgggatt aaactgtatt aattataaat      480
aaaaaataag tacagttggt taaaattata ttttgatta aatctaatag tacgatgtaa      540
gttattttat actattgcta gtttaataaa aagatttaat tatatacttg aaaaggagag      600
gaatttttat gcgtaaa      617

<210> 23
<211> 30
5 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido Ppfor-NotI-F

<400> 23
10 aagcggccgc aaaatagtg ataataatgc      30

<210> 24
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
   <223> oligonucleótido Ppfor-NdeI-R

<400> 24
   tacgcatatg aattcctctc ctttcaagc      30

20 <210> 25
   <211> 5345
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> plásmido pMTL 85146-ispS

```

ES 2 674 984 T3

<400> 25  
aattcgagct cggtagcccg ggatcctcta gagtcgacgt cacgcgtcca tggagatctc 60  
gaggcctgca gacatgcaag cttggcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa 120  
aaccttggcg ttaccaact taatcgccct gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt 180  
aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa 240  
tggcgctagc ataaaaataa gaagcctgca tttgcaggct tcttattttt atggcgcgcc 300  
gcattcactt cttttctata taaatatgag cgaagcgaat aagcgtcgga aaagcagcaa 360  
aaagtttctt ttttgctggt ggagcatggg ggttcagggg gtgcagtatc tgacgtcaat 420  
gccgagcgaa agcgagccga agggtagcat ttacgttaga taacccctg atatgctccg 480  
acgctttata tagaaaagaa gattcaacta ggtaaatct taatataggt tgagatgata 540  
aggtttataa ggaatttggt tgttctaatt tttcactcat tttgttctaa tttcttttaa 600  
caaatgttct tttttttta gaacagttat gatatagtta gaatagtta aaataaggag 660  
tgagaaaaag atgaaagaaa gatatggaac agtctataaa ggctctcaga ggctcataga 720  
cgaagaaagt ggagaagtca tagaggtaga caagttatac cgtaaacaaa cgtctggtaa 780  
cttcgtaaag gcatatatag tgcaattaat aagtatgtta gatatgattg gcggaaaaaa 840  
acttaaaatc gttaactata tcctagataa tgtccactta agtaacaata caatgatagc 900  
tacaacaaga gaaatagcaa aagctacagg aacaagtcta caaacagtaa taacaacact 960  
taaaatctta gaagaaggaa atattataaa aagaaaaact ggagtattaa tgttaaacc 1020  
tgaactacta atgagaggcg acgacaaaa acaaaaatac ctcttactcg aatttgggaa 1080  
ctttgagcaa gaggcaaatg aatagattg acctcccaat aacaccacgt agttattggg 1140  
aggccaatct atgaaatgcg attaagggcc ggccagtggg caagttgaaa aattcaciaa 1200  
aatgtggtat aatatctttg ttcattagag cgataaactt gaatttgaga gggaaacttag 1260  
atggtatttg aaaaaattga taaaaatagt tggaaacagaa aagagtattt tgaccactac 1320  
tttgcaagtg taccttgtag ctacagcatg accgttaaag tggatatcac acaataaag 1380  
gaaaagggaa tgaaactata tcctgcaatg ctttattata ttgcaatgat tgtaaaccgc 1440  
cattcagagt ttaggacggc aatcaatcaa gatggtgaat tggggatata tgatgagatg 1500  
ataccaagct atacaatatt tcacaatgat actgaaacat tttccagcct ttggactgag 1560  
tgtaagtctg actttaaatc atttttagca gattatgaaa gtgatacgca acggtatgga 1620  
aacaatcata gaatggaagg aaagccaat gctccgaaa acatttttaa tgtatctatg 1680  
ataccgtggt caaccttca tggctttaat ctgaatttgc agaaaggata tgattatttg 1740  
attcctattt ttactatggg gaaatattat aaagaagata acaaaattat acttccttg 1800  
gcaattcaag ttcacacgc agtatgtgac ggatttcaca tttgccgttt tgtaaacgaa 1860  
ttgcaggaat tgataaatag ttaacttcag gtttgtctgt aactaaaaac aagtatttaa 1920  
gcaaaaacat cgtagaaata cgggtgtttt tgttacccta agtttaaact cctttttgat 1980

ES 2 674 984 T3

aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 2040  
gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 2100  
acaaaaaaaa caccgctacc agcgggtggt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 2160  
tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag 2220  
ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 2280  
atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 2340  
agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag 2400  
cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 2460  
agcggccacg ttccccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcggg 2520  
acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 2580  
gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc 2640  
ctatgaaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 2700  
gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgat taccgccttt 2760  
gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcagtc agtgagcgag 2820  
gaagcggag agcgcaccaat acgcagggcc ccctgcagga taaaaaatt gtagataaat 2880  
tttataaaat agttttatct acaatTTTTT taccagaaa cagctatgac cgcggccgcg 2940  
gttaatgtta aaaatttata gtataacttt aaaaaactgt cttaaaaagt tgttatataa 3000  
aaaatgttga caattaaca gctatttagt gcaaaacaac cataaaaatt taaaaaatac 3060  
cataaattac ttgaaaaata gttgataata atgtagagtt ataaacaaag gtgaaaagca 3120  
ttacttgtat tcttttttat atattattat aaattaaaat gaagctgtat tagaaaaaat 3180  
acacacctgt aatataaaat tttaaattaa ttttaattt tttcaaatg tattttacat 3240  
gtttagaatt ttgatgtata ttaaatagt agaatacata agatacttaa ttaattaa 3300  
gatagttaag tacttttcaa tgtgcttttt tagatgttta atacaaatct ttaattgtaa 3360  
aagaaatgct gtactattta ctgtactagt gacgggatta aactgtatta attataaata 3420  
aaaaataagt acagttgttt aaaattatat tttgtattaa atctaatagt acgatgtaag 3480  
ttattttata ctattgctag ttttaataaaa agatttaatt atatacttga aaaggagagg 3540  
aatttttatg cgtcatatgg caacagaatt attatgttta cacagacctt taccacttac 3600  
tcacaaactt tttaggaatc cattacctaa agttattcaa gctacacctt taacattaa 3660  
acttaggtgt agtgtttcta cagaaaatgt atcatttagt gagacagaaa ctgaaacaag 3720  
aagatcagca aattatgaac caaattcttg ggattatgat tatcttcttt cttctgatac 3780  
tgatgagtca atagaagtac ataaagataa ggctaagaaa ttagaagctg aagttaggag 3840  
agaaataaat aatgagaagg ctgaatttct tacacttctt gaacttattg ataatgtaca 3900  
aagacttgga ttaggatata gatttgagtc tgatataaga agagcattag atagatttgt 3960  
aagtagtggg ggatttgatg gagttactaa aacttcatta catggaacag cattatcatt 4020

ES 2 674 984 T3

taggttatta aggcaacatg gttttgaagt atctcaagaa gcttttagtg gatttaaaga 4080  
 tcagaatgga aactttcttg agaatttaa ggaagacata aaagcaattc tttctcttta 4140  
 tgaagcatca tttttagcat tagaagggtga gaatatatta gatgaggcta aagtatttgc 4200  
 aatatctcat cttaaagaac ttagtgaaga aaagattggt aaagaattag ctgaacaagt 4260  
 ttcacatgct ttagaattac cattacatag aagaacacaa agattagaag cagtttggtc 4320  
 aatagaagca tatagaaaga aagaagacgc aatcaagta cttttagaac ttgcaatact 4380  
 tgactacaat atgattcaaa gtgtatatca gagggattta agagaacat caagatggtg 4440  
 gagaagagta ggattagcaa ctaaattaca ttttgctaga gataggctta ttgaaagttt 4500  
 ttattgggct gttggagtgt cttttgaacc acaatattct gattgcagaa atagtgtagc 4560  
 aaagatgttt tcatttggtta ctataattga cgatatttac gatgtatatg gaactttaga 4620  
 tgaacttgaa ctttttactg atgcagttga aagatgggat gtaaagtcta ttaatgatct 4680  
 tcctgattat atgaagttat gttttcttgc actttacaat actattaacg agatagctta 4740  
 cgataactta aaagataaag gtgagaacat acttccttat ttaacaaaag catgggcaga 4800  
 tttatgtaat gcatttcttc aagaagctaa gtggctttat aataaatcaa cacctacatt 4860  
 tgatgattat tttggaatg catggaaaag ttctagtgga cctttacagc ttatttttgc 4920  
 ttattttgct gtagtacaga acattaaaaa ggaagagatt gagaatcttc agaaatatca 4980  
 tgacataata tcaagaccta gtcacatttt taggctttgt aatgatttag catctgcttc 5040  
 agcagaaata gcaagaggtg aaactgctaa ttctgtaagt tgttatatga gaacaaaagg 5100  
 tatatctgaa gaattagcta ctgaaagtgt tatgaatctt atagacgaaa cttggaagaa 5160  
 aatgaacaaa gaaaaacttg gtggatcttt atttgcaaaa ccttttgttg agactgctat 5220  
 aaatttagct agacagtctc attgcacata tcataatggt gatgcacata ctagtccaga 5280  
 tgaattaact aggaaaagag tacttagtgt aataactgaa ccaatattac catttgaaag 5340  
 ataag 5345

<210> 26  
 <211> 26  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido Idi-Cbei-SacI-F

<400> 26  
 gtgagctcga aaggggaaat taaatg 26

10 <210> 27  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> oligonucleótido Idi-Cbei-Kpnl-R

<400> 27  
 atggtacccc aaatctttat ttagacg 27

20 <210> 28  
 <211> 5905  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> plásmido pMTL85246-ispS-idi



ES 2 674 984 T3

<400> 28  
 ccggggatcc tctagagtcg acgtcacgcg tccatggaga tctcgaggcc tgcagacatg 60  
 caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc 120  
 aacttaatcg ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc 180  
 gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc tagcataaaa 240  
 ataagaagcc tgcatttgca ggcttcttat ttttatggcg cgccgcattc acttcttttc 300  
 tatataaata tgagcgaagc gaataagcgt cggaaaagca gcaaaaagtt tcctttttgc 360  
 tgttggagca tgggggttca gggggtgcag tatctgacgt caatgccgag cgaaagcgag 420  
 ccgaagggta gcatttacgt tagataacc cctgatatgc tccgacgctt tatatagaaa 480  
 agaagattca actaggtaaa atcttaatat aggttgagat gataaggttt ataaggaatt 540  
 tgtttgttct aatttttcac tcattttgtt ctaatttctt ttaacaaatg ttcttttttt 600  
 tttagaacag ttatgatata gttagaatag tttaaaataa ggagtggagaa aaagatgaaa 660  
 gaaagatatg gaacagtcta taaaggctct cagaggctca tagacgaaga aagtggagaa 720  
 gtcatagagg tagacaagtt ataccgtaaa caaacgtctg gtaacttcgt aaaggcatat 780  
 atagtgcaat taataagtat gttagatatg attggcggaa aaaaacttaa aatcgttaac 840  
 tatatcctag ataatgtcca cttagtaac aatacaatga tagctacaac aagagaaata 900  
 gcaaaaagcta caggaacaag tctacaaaca gtaataacaa cacttaaaat cttagaagaa 960  
 ggaaatatta taaaaagaaa aactggagta ttaatgttaa accctgaact actaatgaga 1020  
 ggcgacgacc aaaaacaaaa atacctctta ctcgaatttg ggaactttga gcaagaggca 1080  
 aatgaaatag attgacctc caataacacc acgtagtatt tgggagggtca atctatgaaa 1140  
 tgcgattaag ggccggccag tgggcaagtt gaaaaattca caaaaatgtg gtataatatac 1200  
 tttgttcatt agagcgataa acttgaattt gagagggaaac ttagatggta tttgaaaaaa 1260  
 ttgataaaaa tagttggaac agaaaagagt attttgacca ctactttgca agtgtacctt 1320  
 gtacctacag catgaccggt aaagtggata tcacacaaat aaaggaaaag ggaatgaaac 1380  
 tatatcctgc aatgctttat tatattgcaa tgattgtaaa ccgccattca gagtttagga 1440  
 cggcaatcaa tcaagatggt gaattgggga tatatgatga gatgatacca agctatacaa 1500  
 tatttcacaa tgatactgaa acattttcca gcctttggac tgagtgtgtaag tctgacttta 1560  
 aatcattttt agcagattat gaaagtgata cgcaacggta tggaaacaat catagaatgg 1620  
 aaggaaagcc aaatgctccg gaaaacattt ttaatgtatc tatgataccg tggccaacct 1680

ES 2 674 984 T3

tcgatggctt taatctgaat ttgcagaaa gatatgatta tttgattcct atttttacta	1740
tggggaaata ttataaagaa gataacaaaa ttatacttcc tttggcaatt caagttcatc	1800
acgcagtatg tgacggattt cacatttgcc gttttgtaaa cgaattgcag gaattgataa	1860
atagttaact tcaggtttgt ctgtaactaa aaacaagtat ttaagcaaaa acatcgtaga	1920
aatacgggtg tttttgttac cctaagttta aactcctttt tgataatctc atgaccaaaa	1980
tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagacct cgtagaaaag atcaaaggat	2040
cttcttgaga tccttttttt ctgctgctaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc	2100
taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg	2160
gcttcagcag agcgcagata ccaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc	2220
acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgtctt gctaactctg ttaccagtgg	2280
ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgg	2340
ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa	2400
cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttcccg	2460
aaggagaaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga	2520
gggagcttcc agggggaaac gcctggatc tttatagtcc tgctcgggtt cgccacctct	2580
gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca	2640
gcaacgggc ctttttacgg ttcttgccct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc	2700
ctgcttattc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg	2760
ctcgcgcgag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagttag cgaggaagcg gaagagcgc	2820
caatacgcag ggcctctgc aggataaaaa aattgtagat aaattttata aaatagtttt	2880
atctacaatt tttttatcag gaaacagcta tgaccgggc cgcggttaat gttaaaaatt	2940
tatagtataa ctttaaaaa ctgtcttaaa aagtgtttat ataaaaaatg ttgacaatta	3000
aacagctatt tagtgcaaaa caaccataaa aatttaaaaa ataccataaa ttacttgaaa	3060
aatagttgat aataatgtag agttataaac aaaggtgaaa agcattactt gtattctttt	3120
ttatatatta ttataaatta aaatgaagct gtattagaaa aaatacacac ctgtaatata	3180
aaattttaaa ttaattttta attttttcaa aatgtatttt acatgttttag aattttgatg	3240
tatattaaaa tagtagaata cataagatac ttaatttaat taaagatagt taagtacttt	3300
tcaatgtgct tttttagatg tttaatacaa atctttaatt gtaaaagaaa tgctgtacta	3360
tttactgtac tagtgacggg attaaactgt attaattata aataaaaaat aagtacagtt	3420
gtttaaaatt atattttgta ttaaacttaa tagtacgatg taagttattt tatactattg	3480
ctagtttaat aaaaagattt aattatatac ttgaaaagga gaggaatttt tatgcgcat	3540
atggcaacag aattattatg tttacacaga cctatatcac ttactcaca acttttttagg	3600
aatccattac ctaaagttat tcaagctaca cctttaacat taaaacttag gtgtagtgtt	3660
tctacagaaa atgtatcatt tagtgagaca gaaactgaaa caagaagatc agcaaattat	3720

ES 2 674 984 T3

gaaccaaatt cttgggatta tgattatctt ctttcttctg atactgatga gtcaatagaa 3780  
 gtacataaag ataaggctaa gaaattagaa gctgaagtta ggagagaaat aaataatgag 3840  
 aaggctgaat ttcttacct tcttgaactt attgataatg tacaaagact tggattagga 3900  
 tatagatttg agtctgatat aagaagagca ttagatagat ttgtaagtag tggaggattt 3960  
 gatggagtta ctaaaacttc attacatgga acagcattat catttaggtt attaaggcaa 4020  
 catggttttg aagtatctca agaagctttt agtggattta aagatcagaa tggaaacttt 4080  
 cttgagaatt taaaggaaga cataaaagca attctttctc tttatgaagc atcattttta 4140  
 gcattagaag gtgagaatat attagatgag gctaaagtat ttgcaatata tcatcttaaa 4200  
 gaacttagtg aagaaaagat tggtaaagaa ttagctgaac aagtttcaca tgctttagaa 4260  
 ttaccattac atagaagaac acaaagatta gaagcagttt ggtcaataga agcatataga 4320  
 aagaaagaag acgcaaatca agtactttta gaacttgcaa tacttgacta caatatgatt 4380  
 caaagtgtat atcagagggg ttaagagaa acatcaagat ggtggagaag agtaggatta 4440  
 gcaactaaat tacattttgc tagagatagg cttattgaaa gtttttattg ggctgttga 4500  
 gttgcttttg aaccacaata ttctgattgc agaaatagtg tagcaaagat gttttcattt 4560  
 gttactataa ttgacgatat ttacgatgta tatggaactt tagatgaact tgaacttttt 4620  
 actgatgcag ttgaaagatg ggatgtaaat gctattaatg atcttcctga ttatatgaag 4680  
 ttatgttttc ttgcacttta caatactatt aacgagatag cttacgataa cttaaaagat 4740  
 aaaggtgaga acatacttcc ttatttaaca aaagcatggg cagatttatg taatgcattt 4800  
 cttcaagaag ctaagtggct ttataataaa tcaacaccta catttgatga ttattttgga 4860  
 aatgcatgga aaagttctag tggaccctta cagcttattt ttgcttattt tgctgtagta 4920  
 cagaacatta aaaaggaaga gattgagaat cttcagaaat atcatgacat aatatcaaga 4980  
 cctagtcaca tttttaggct ttgtaatgat ttagcatctg cttcagcaga aatagcaaga 5040  
 ggtgaaactg ctaattctgt aagttgttat atgagaacaa aaggatatatc tgaagaatta 5100  
 gctactgaaa gtgttatgaa tcttatagac gaaacttggg agaaaatgaa caaagaaaaa 5160  
 cttggtggat ctttatttgc aaaacctttt gttgagactg ctataaattt agctagacag 5220  
 tctcattgca catatcataa tggatgatgca catactagtc cagatgaatt aactaggaaa 5280  
 agagtactta gtgtaataac tgaaccaata ttaccatttg aaagataaga attcgagctc 5340  
 gaaaggggaa attaaatggc agaatatata atagctgtag atgaatttga taacgaaata 5400  
 ggttcaattg aaaaaatgga ggctcaccgt aaaggaacat tacatagagc tttttctata 5460  
 ttagtattta attctaaaaa tcaattgtta ttacagaaaa gaaatgtaa aaaatatcat 5520  
 tcgctggctc tctggacaaa tacgtgctgt agtcatccaa gatacggtga aagtttacat 5580  
 gatgcgattt atagaaggct taaggaagaa atgggtttta catgtgaact tgaagaagta 5640  
 tttagtttta tttataaagt aaaacttgaa gataatcttt ttgaaaatga atatgatcat 5700  
 gtattcattg ggaaatatga tggagaaata attgtaaaca aagatgaagt agatgatttt 5760  
 aagtggttga atattaatga ggtaagaag gatattatag aaaggccaga agcatacact 5820  
 tattggttca agtatttagt taataaggca gaaaacaaaa ttttaataa agtaagaatt 5880  
 tcgtctaaat aaagatttgg ggtac 5905

<210> 29  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

ES 2 674 984 T3

<220>  
 <223> oligonucleótido Dxs-Sall-F

<400> 29  
 gcagtcgact ttattaaagg gatagataa 29

5 <210> 30  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> oligonucleótido Dxs-XhoI-R

<400> 30  
 tgctcgagtt aaaatatatg acttacctct g 31

<210> 31  
 <211> 7784  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> plásmido pMTL85246-ispS-idi-dxs

<400> 31  
 tcgaggcctg cagacatgca agcttggcac tggccgctgt tttacaacgt cgtgactggg 60  
 aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc 120  
 gtaatagcga agaggccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg 180  
 aatggcgcta gcataaaaat aagaagcctg catttgcagg cttcttattt ttatggcgcg 240  
 ccgcattcac ttcttttcta tataaatatg agcgaagcga ataagcgtcg gaaaagcagc 300  
 aaaaagtttc ctttttgctg ttggagcatg ggggttcagg gggtcagta tctgacgtca 360  
 atgccgagcg aaagcgagcc gaagggtagc atttacgtta gataaccccc tgatatgctc 420  
 cgacgcttta tatagaaaag aagattcaac taggtaaaat cttaatatag gttgagatga 480  
 taaggtttat aaggaatttg tttgttctaa tttttcactc atttgttct aatttctttt 540  
 aacaaatggt cttttttttt tagaacagtt atgatatagt tagaatagtt taaaataagg 600  
 agtgagaaaa agatgaaaga aagatatgga acagtctata aaggctctca gaggctcata 660  
 gacgaagaaa gtggagaagt catagagga gacaagttat accgtaaaca aacgtctggt 720  
 aacttcgtaa aggcataatat agtgcaatta ataagtatgt tagatatgat tggcggaaaa 780  
 20 aaacttaaaa tcgttaacta taccctagat aatgtccact taagtaacaa tacaatgata 840

ES 2 674 984 T3

gctacaacaa gagaaatagc aaaagctaca ggaacaagtc tacaacacgt aataacaaca 900  
cttaaaatct tagaagaagg aatattata aaaagaaaa ctggagtatt aatgttaaac 960  
cctgaactac taatgagagg cgacgaccaa aaacaaaaat acctcttact cgaatttggg 1020  
aactttgagc aagaggcaaa tgaaatagat tgacctccca ataacaccac gtagttattg 1080  
ggaggtcaat ctatgaaatg cgattaaggg ccggccagtg ggcaagttga aaaattcaca 1140  
aaaatgtggt ataatatctt tgttcattag agcgataaac ttgaatttga gagggaactt 1200  
agatggtatt tgaaaaaatt gataaaaata gttggaacag aaaagagtat ttgaccact 1260  
actttgcaag tgtaccttgt acctacagca tgaccgttaa agtggatata acacaaataa 1320  
aggaaaaggg aatgaaacta tatcctgcaa tgctttatta tattgcaatg attgtaaacc 1380  
gccattcaga gtttaggacg gcaatcaatc aagatggtga attggggata tatgatgaga 1440  
tgataccaag ctatacaata tttcacaatg atactgaaac atttccagc ctttgactg 1500  
agtgtaagtc tgactttaaa tcatttttag cagattatga aagtgatacg caacggtatg 1560  
gaaacaatca tagaatggaa ggaaagccaa atgctccgga aaacattttt aatgtatcta 1620  
tgataccgtg gtcaacctc gatggcttta atctgaatth gcagaaagga tatgattatt 1680  
tgattcctat ttttactatg gggaaatatt ataaagaaga taacaaaatt atacttcctt 1740  
tggcaattca agttcatcac gcagtatgtg acggatttca catttgccgt tttgtaaacc 1800  
aattgcagga attgataaat agttaactc aggtttgtct gtaactaaaa acaagtattt 1860  
aagcaaaaac atcgtagaaa tacggtgttt tttgttacc taagttaaaa ctcctttttg 1920  
ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt cactgagcg tcagaccccg 1980  
tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgctaatac tgctgcttgc 2040  
aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 2100  
ttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactggt cttctagtgt 2160  
agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 2220  
taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 2280  
caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac 2340  
agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 2400  
aaagcggcac gcttccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggaagc ggcagggtcg 2460  
gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 2520  
tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttgtg atgctcgtca gggggcgga 2580  
gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctgcctt 2640  
ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt 2700  
ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 2760  
aggaagcggg agagcgccca atacgcaggg cccctgag gataaaaaaa ttgtagataa 2820  
atttataaa atagttttat ctacaattht tttatcagga aacagctatg accgcggccg 2880

ES 2 674 984 T3

cggttaatgt taaaaattta tagtataact ttaaaaaact gtcttaaaaa gttgttatat 2940  
 aaaaaatggt gacaattaaa cagctattta gtgcaaaaca accataaaaa tttaaaaaat 3000  
 accataaatt acttgaaaaa tagttgataa taatgtagag ttataaacia aggtgaaaaa 3060  
 cactacttgt attctttttt atatattatt ataaattaaa atgaagctgt attagaaaaa 3120  
 atacacacct gtaatataaa attttaaat aatttttaat tttttcaaaa tgtattttac 3180  
 atgtttagaa ttttgatgta tattaataa gtagaataca taagataact aatttaatta 3240  
 aagatagtta agtacttttc aatgtgcttt ttttagatgt taatacaaat cttaattgt 3300  
 aaaagaaatg ctgtactatt tactgtacta gtgacgggat taaactgtat taattataaa 3360  
 taaaaataa gtacagttgt ttaaaattat attttgatt aaatctaata gtacgatgta 3420  
 agttatttta tactattgct agtttaataa aaagatttaa ttatatactt gaaaaggaga 3480  
 ggaattttta tgcgcatat ggcaacagaa ttattatggt tacacagacc tatatcactt 3540  
 actcacaac ttttaggaa tccattacct aaagtattc aagctacacc tttaacatta 3600  
 aaacttaggt gtagtgttc tacagaaaat gtatcattta gtgagacaga aactgaaaca 3660  
 agaagatcag caaattatga accaaattct tgggattatg attatcttct ttcttctgat 3720  
 actgatgagt caatagaagt acataaagat aaggctaaga aattagaagc tgaagttagg 3780  
 agagaaataa ataatgagaa ggctgaattt cttacacttc ttgaacttat tgataatgta 3840  
 caaagacttg gattaggata tagatttgag tctgatataa gaagagcatt agatagattt 3900  
 gtaagtagtg gaggattga tggagttact aaaacttcat tacatggaac agcattatca 3960  
 tttaggttat taaggcaaca tggttttgaa gtatctcaag aagcttttag tggatttaaa 4020  
 gatcagaatg gaaacttct tgagaattta aaggaagaca taaaagcaat tctttctctt 4080  
 tatgaagcat ctttttagc attagaaggt gagaatata tagatgaggc taaagtattt 4140  
 gcaatatctc atcttaaga acttagtgaa gaaagattg gtaaagaatt agctgaacia 4200  
 gtttcacatg ctttagaatt accattacat agaagaacac aaagattaga agcagtttg 4260  
 tcaatagaag catatagaaa gaaagaagac gcaaatcaag tacttttaga acttgcaata 4320  
 cttgactaca atatgattca aagtgtatat cagagggatt taagagaaac atcaagatgg 4380  
 tggagaagag taggattagc aactaaatta cttttgcta gagataggct tattgaaagt 4440  
 ttttattggg ctgttggagt tgcttttgaa ccacaatatt ctgattgcag aaatagtgta 4500  
 gcaaagatgt tttcatttgt tactataatt gacgatattt acgatgtata tggacttta 4560  
 gatgaacttg aactttttac tgatgcagtt gaaagatggg atgtaaagc tattaatgat 4620  
 cttctgatt atatgaagtt atgttttctt gcactttaca atactattaa cgagatagct 4680  
 tacgataact taaaagataa aggtgagaac atacttctt atttaaaaa agcatgggca 4740  
 gatttatgta atgcatttct tcaagaagct aagtggcttt ataataaatc aacacctaca 4800  
 tttgatgatt attttgaaa tgcatgaaa agtctagtg gaccttaca gcttattttt 4860  
 gcttattttg ctgtagtaca gaacattaaa aaggaagaga ttgagaatct tcagaaatat 4920

ES 2 674 984 T3

catgacataa tatcaagacc tagtcacatt tttagccttt gtaatgattt agcatctgct 4980  
 tcagcagaaa tagcaagagg tgaactgct aattctgtaa gttgttatat gagaacaaaa 5040  
 ggtatatctg aagaattagc tactgaaagt gttatgaatc ttatagacga aacttggaag 5100  
 aaaatgaaca aagaaaaact tggaggatct ttatttgcaa aaccttttgt tgagactgct 5160  
 ataaatttag ctagacagtc tcattgcaca tatcataatg gtgatgcaca tactagtcca 5220  
 gatgaattaa ctaggaaaag agtacttagt gtaataactg aaccaatatt accatttgaa 5280  
 agataagaat tcgagctcga aaggggaaat taaatggcag aatatataat agctgtagat 5340  
 gaatttgata acgaaatagg ttcaattgaa aaaatggagg ctcaccgtaa aggaacatta 5400  
 catagagctt tttctatatt agtatttaat tctaaaaatc aattgttatt acagaaaaga 5460  
 aatgtaaaaa aatatcattc gcctggctc tggacaaata cgtgctgtag tcatccaaga 5520  
 tacggtgaaa gtttcatga tgcgatttat agaaggctta aggaagaaat gggttttaca 5580  
 tgtgaacttg aagaagtatt tagttttatt tataaagtaa aacttgaaga taatcttttt 5640  
 gaaaatgaat atgatcatgt attcattggg aaatatgatg gagaaataat tgtaacaaa 5700  
 gatgaagtag atgattttaa gtgggttgat attaatgagg ttaagaagga tattatagaa 5760  
 aggccagaag catacactta ttggttcaag tatttagtta ataaggcaga aaacaaaata 5820  
 tttaaataag taagaatttc gtctaaataa agatttgggg taccgggga tcctctagag 5880  
 tcgactttat taaagggata gataaggatg agtaatttat tagataatta taaagatata 5940  
 aatgacgtaa agaagatgtc gttaaatgat aaaaaaagc tagctagaga aattagaaaa 6000  
 ttttaatag acaaagtatc taagacagga ggtcatttgg cgtctaactt aggggttgtg 6060  
 gagctcactt tgagtttatt tagtgtattt gatctaaatt atgataaact tatatgggat 6120  
 gtgggacatc aggccttatgt gcataaaatc ctcacgggaa gaaaggataa atttgatact 6180  
 ttaaggcaat ttggaggatt aagtggattt cctaaaaggt gcgaaagtat atatgatttt 6240  
 ttcgaaacag ggcatagtag tacttcaata tctgcagcac ttggaatggc tagggctaga 6300  
 gatttaaagc atgagaaata taatgttgtt gcagttatag gagatggagc acttactgga 6360  
 ggtatggcac tagaggcctt aatgatgta ggttatagaa aaactaagct tataataata 6420  
 ttaaataata atcaaatgtc tataggaaaa aatgtaggtg gagtatctaa atatttaaat 6480  
 aaacttagag tggaccctaa gtataataaa tttaaagcgg atgtagaagc taaattaaaa 6540  
 aagataccta atataggaaa aggaatggca aaatatcttg aaaaggtaaa aatggaata 6600  
 aaacaaatgg tagttcctgg aatgtttttt gaagatatgg gaattaaata tttaggacca 6660  
 atagatggtc ataataataa agaacttaca gacgtactcg cttctgcaaa agacatacaa 6720  
 ggtccagtta ttatacatat aataactaag aaaggaaaag gatatgaatt tgcaagaaaa 6780  
 aaatccaggt aaattccatg gaatagggcc ttttaattgc gccaatgggtg aactggatgc 6840  
 tggatcttca aatacttatt ccaaggcctt tggaaatgaa atggtaaagc tagcagaaaa 6900  
 agacgataga atagtggcta taactgcagc catgagggat ggaacaggtc ttaaaagttt 6960

ES 2 674 984 T3

	ttctcaaaag tttcctgaaa ggTTTTTTga tgtgggaata gcagaacagc atgctgtaac	7020
	cctggcagct ggaatggcac aggcaaattt aaaacctgta tttgcagttt actctacttt	7080
	tcttcaaaga gcttatgata aacttattca tgatgtatgt atgcaaaaac ttccagtagt	7140
	TTTTGCTgta gatagggccg gcattgtagg agaagatggt gaaacacatc agggaatatt	7200
	tgatttatct tacttaacgg aaatgccaca tatgacgctt atgtctccta aatgtataga	7260
	tgaacttcca tatatgtaa aatgggcatt aggccagagt tttcctgtag ctataaggta	7320
	tccaagggga ggagatagtg tatgtctcaa tcccgtagaa aattttaaac ttggaagtg	7380
	ggactgtatt tcaaatgaag gcagtgtagc aataattgct cagggtaaaa tggtaaaaa	7440
	tgcagtgtta gcaggaaaa aacttaaga aaagggtata gatgtaagga ttataagtgc	7500
	atgttttatt aagccgctgg acaaggaaat gttaaacagg ttagttgaag aaagtgtaac	7560
	tatcgttact gttgaagaca atgtaataag aggaggatta ggatcctata tattagaata	7620
	tgtaataaa ttaaataaaa aagtaaaaat aataaactta gggtttgatg ataagttgt	7680
	acagcatgga aaatccgata ttttgataa gctgtatggt ttggatccta aaggatcgt	7740
	aaatagtgta cttgaagcag cagaggtaa gtcatatatt taac	7784
	<210> 32	
	<211> 17	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido M13R	
	<400> 32	
	caggaaacag ctatgac	17
10	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> oligonucleótidos isopreno-seq1	
	<400> 33	
	gttattcaag ctacacctt	20
	<210> 34	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido isopreno-seq2	
	<400> 34	
25	gattgtaaa gaattagctg	20
	<210> 35	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> oligonucleótido isopreno-seq3	
	<400> 35	
	tcaagaagct aagtggt	18
	<210> 36	
35	<211> 17	



<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido isopreno-seq4  
  
 5 <400> 36  
 ctcaccgtaa aggaaca 17  
  
 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido isopreno-seq5  
  
 <400> 37  
 gctagctaga gaaattagaa 20  
  
 15 <210> 38  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> oligonucleótido isopreno-seq6  
  
 <400> 38  
 ggaatggcaa aatatctga 20  
  
 <210> 39  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido isopreno-seq7  
  
 <400> 39  
 30 gaaacacatc agggaatatt 20  
  
 <210> 40  
 <211> 1179  
 <212> ADN  
 <213> Clostridium acetobutylicum  
  
 35 <400> 40  
 atgaaagagg ttgttattgc atcagctggt agaactgcaa taggatctta tggaaaaagt 60  
 cttaaagatg taccagcagt agacttaggt gcaactgcaa taaaggaagc agtaaagaaa 120

ES 2 674 984 T3

gcaggataa aacctgaaga tgtaaatgaa gttatTTTTag gaaācgtatt acaagctgga 180  
 cttggacaga atccagctag acaggcatca ttcaaagcag gattaccagt agagatacct 240  
 gctatgacta ttaataaagt ttgtggttca ggattaagaa cagtttcttt agctgctcaa 300  
 attataaaag ctggtgacgc agatgtaata atagcaggtg gtatggaaaa tatgtcaaga 360  
 gcaccatacc ttgctaataa tgctagatgg ggttatagaa tgggaaacgc taaatttgta 420  
 gacgaaatga taactgatgg actttgggat gcatttaacg attatcacat ggggaattact 480  
 gctgaaaata tagctgagag atggaatata agtagagaag aacaagatga gtttgcactt 540  
 gcatctcaga aaaaggcaga agaagctatt aaatcaggac aatttaaaga tgaaattggt 600  
 ccagtagtaa ttaaaggtag aaaaggtgaa acagttgtag aactgatga acatcctaga 660  
 tttggatcta caatagaagg tttagctaaa ttaaagcctg cttttaagaa agacggaaca 720  
 gtaactgctg gaaacgcatc aggtttaaat gattgtgcag ctgttttagt tattatgtct 780  
 gctgaaaagg caaaggaatt aggtgttaaa ccacttgcta agatagttag ttatggttca 840  
 gcagggtgtag atcctgctat tatgggatat ggaccTTTT atgctacaaa ggcagctatt 900  
 gaaaaggctg gttggacagt tgatgaactt gatcttatag agtcaaatga ggcatttgca 960  
 gcacaaagtc ttgctgttgc taaggatctt aaattcgata tgaataaagt aatgtaaac 1020  
 ggtggtgcta tagcacttgg tcatccaata ggtgctagtg gtgctagaat tttagttaca 1080  
 ttagtcatg caatgcaaaa gagagacgct aaaaggacgac ttgcaacttt atgcataggt 1140  
 ggtggtcaag gaacagcaat acttcttgaa aatgttaa 1179

<210> 41

<211> 1140

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

<400> 41

atgaatcagg ctgttatagt tgctgcaaag agaactgcat ttggaaaata tgggtgtact 60  
 ttaaaacacc ttgaaccaga acaattactt aagccattat ttcagcactt taaagaaaaa 120  
 tatcctgaag ttatatctaa aatagatgat gtagttttag gaaacgtagt tggaaatggt 180  
 ggtaaatattg ctagaaaagc acttcttgaa gcaggattaa aagatagtat accagggtga 240  
 actatagaca gacaatgcyg atctggatta gaatcagtac aatcgcagtg tagaatgata 300  
 caagcaggtg ctggaaaagt ttatattgca ggtggtgttg aatctacatc aagagcacct 360  
 tggaaaataa agagaccaca ttctgtttat gaaactgcat taccagagtt ctatgaaaga 420  
 gcatcattcg cacctgaaat gtcagatcca agtatgatac aagggtgctga gaatgtagct 480  
 aaaatgtatg atgttagtag agaacttcaa gatgagtttg catacagatc acatcaactt 540  
 acagctgaaa atgtaaagaa tggaaatatt tcacaagaaa ttcttccaat aacagtaaag 600  
 ggtgaaatat tcaatactga tgaaagtta aaatctcata ttccaaaaga taatttcggt 660  
 agatttaaac ctgtaataaa aggtgtgtact gtaacagctg ctaatagttg tatgaagaac 720  
 gatggtgcag tattattact tattatggaa aaggatatgg cttatgaact tggatttgag 780  
 catggattat tatttaaaga cgggtgtaact gtaggtgtag atagtaactt tccaggaata 840  
 ggacctgttc ctgctatadc aaatcttta aagagaaacc aacttacaat agaaaatatt 900  
 gaagtaattg agataaatga agcattttct gctcaggtag ttgcttgca gcaagctctt 960  
 aatataagta atactcagtt aaacatttgg ggtggtgcat tagcaagtgg tcatccttat 1020  
 ggtgcatcag gtgcacagtt agttacaaga ttattttata tgttcgataa agagacaatg 1080  
 attgcttcta tgggaatagg tgggtgttta gaaatgcag ctctttttac tagattttaa 1140

5

10

ES 2 674 984 T3

<210> 42  
 <211> 1167  
 <212> ADN  
 <213> Staphylococcus aureus subsp. aureus

5 <400> 42  
 atgactatag gaattgacaa aataaacttt tacgtaccaa aatattatgt agatatggca 60  
 aaattagcag aagcaagaca agtagacca aataaatttc ttattggaat aggacagact 120  
 gaaatggcag ttagtccagt aaaccaagat atagtatcaa tgggtgctaa tgctgctaaa 180  
 gatataataa ctgatgaaga caaaaagaaa ataggaatgg taatagtagc aactgagtca 240  
 gcagtagatg cagcaaaggc agcagcagta cagattcata atttattagg tattcaacca 300  
 tttgcaagat gtttcgaaat gaaagaagca tgttatgctg ctactcctgc aattcagtta 360  
 gctaaggatt atttagctac aagaccaa at gagaaagttt tagttatagc tacagataca 420  
 gctagatatg gacttaattc aggtggtgaa cctactcaag gtgctgggtgc tgttgctatg 480  
 gttatagctc ataactctag tatacttgca ttaaatgaag acgctgttgc ttatacagaa 540  
 gatgtttatg atttctggag accaacagga cataagtatc cattagtaga tggtgcttta 600  
 tcaaaagacg catatattag atcttttcaa caatcttgga atgaatatgc taagagacaa 660  
 ggaaagagtt tagctgattt tgctagtctt tgctttcatg ttccttttac taaaatgggt 720  
 aaaaaggctt tagaatctat aatagataac gcagatgaaa caactcaaga gagattaaga 780  
 tctggatatg aagatgcagt tgattacaat agatatgttg gaaatatata cacaggaagt 840  
 ctttatcttt ctcttataag tcttcttgaa aatagagatt tacaggctgg tgaaactatt 900  
 ggattatctt catacggatc aggttctggt ggtgaatttt attcagctac actttagtaa 960  
 ggatataaag atcaccttga tcaggcagca cacaaagcac ttttaacaa tagaactgaa 1020  
 gtatcagtag atgcatacga aacatttttc aagagatttg atgatgtaga atttgatgaa 1080  
 gagcaggatg cagttcatga agatagacat atattctatc tttcaaacat agagaataat 1140  
 gtaagagaat atcatagacc tgaataa 1167

<210> 43  
 <211> 1278  
 <212> ADN  
 <213> Staphylococcus aureus subsp. aureus

10 <400> 43  
 atgcaatcat tagacaaaaa tttcagacat ttatcaagac aacaaaagtt acaacaatta 60

ES 2 674 984 T3

gttgataaac agtggccttc agaagatcag tttgatattt tacttaatca tcctcttata 120  
gatgaagaag ttgctaatag tcttatagaa aatgtaattg cacagggtgc attaccagtt 180  
ggacttcttc ctaatataat agttgatgat aaggcctatg ttgtaccaat gatggttgaa 240  
gaacctagtg ttgttgacgc tgcacttat ggtgctaaat tagtaaatca gacagggtgga 300  
tftaaaactg tatcatcaga aagaataatg attggacaga tagtatttga tgggtgtagat 360  
gacactgaaa aattaagtgc agatattaaa gcattagaaa aacaaataca taagattgca 420  
gatgaagcat atcctagtat aaaagcaaga ggtggtggtt atcaaagaat agcaatagat 480  
acatttccag agcaacaact tftaagtctt aaggattttg tagatacaaa agatgctatg 540  
ggtgctaata tgcttaatac tatacttgag gcaataactg cattccttaa aatgaatct 600  
cctcaatcag atatattaat gtctatactt tcaaaccatg caactgctag tgtagtaaaa 660  
gtacaagggtg agatagatgt aaaagatctt gctagagggtg aaagaacagg tgaagaagta 720  
gctaagagaa tggaaagagc ttctgtatta gctcagggtg atattcatag agctgcaaca 780  
catacaaaag gtgttatgaa tggaaatcat gctgttgttt tagctacagg aatgatact 840  
agagggtgctg aagcatctgc acatgcatac gcatcaagag acggacaata tagagggtata 900  
gcaacttgga gatatgatca gaagagacaa agacttattg gaactattga agttccaatg 960  
acacttgcta tagtaggtgg tggactaaa gtattacca tagctaaggc atcattagag 1020  
ttattaaatg ttgattctgc acaagaactt ggacacgtag ttgctgctgt tggattagca 1080  
caaaactttg ctgctttag agcacttgtt tctgaaggta ttcaacaagg acacatgtca 1140  
ttacaatata aaagtttagc aatagtagta ggtgcaaaag gtgacgagat agcacaagta 1200  
gcagaagctc ttaaacagga accaagagct aatacacagg ttgctgaaag aattttacag 1260  
gaaattagac agcaataa 1278

<210> 44

<211> 552

5 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 44

agatagtcac aatagttcca gaatagttca atttagaaat tagactaaac ttcaaatgt 60  
ttgttaaata tataccaatc tagtatagat attttttaa tactggactt aaacagtagt 120  
aatttgccta aaaaatfttt tcaatftttt ttaaaaaatc cttttcaagt tgtacattgt 180  
tatggtaata tgtaattgaa gaagttatgt agtaaatattg taaacgtttc ttgattfttt 240  
tacatccatg tagtgcttaa aaaacaaaa tatgtcacat gcacttgtat atttcaata 300  
acaatattta ttttctcgtt aaattcacia ataatttatt aataatatca ataaccaaga 360  
ttatacttaa atggatgttt attttttaac acttttatag taaatatatt tattttatgt 420  
agtaaaaagg ttataattat aattgtattt attacaatta attaaaataa aaaatagggt 480  
tttaggtaaa attaagttat tftaagaagt aattacaata aaaattgaag ttatttcttt 540

10 aaggaggaaa tt 552

<210> 45

<211> 386

<212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 674 984 T3

<400> 45  
 gttataatTT tcaattttca ttctttttaa aggagattag catacatttt atcataatta 60  
 tacagacaat atagtaatat atgatgtaa aatatcaata tatggttaaa aatctgtata 120  
 ttttttccca ttttaattat ttgtactata atattacact gagtgtattg catatttaaa 180  
 aatattttgg tacaattagt tagttaaata aattctaaat tgtaaattat cagaatcctt 240  
 attaaggaaa tacatagatt taaggagaaa tcataaaaag gtgtaataa aactggctaa 300  
 aattgagcaa aaattgagca attaagactt tttgattgta tctttttata tatttaaggt 360  
 atataatcctt atttatattg ggggaa 386

5 <210> 46  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido pUC57-F

10 <400> 46  
 agcagattgt actgagagtg c 21

<210> 47  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> oligonucleótido pUC57-R

<400> 47  
 acagctatga ccatgattac g 21

20 <210> 48  
 <211> 3552  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> plásmido pMTL 85245

25 <400> 48  
 aaactccttt ttgataatct catgacaaa atccctaac gtgagttttc gttccactga 60  
 gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 120  
 atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 180  
 gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
 gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
 tacctcgctc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 360

ES 2 674 984 T3

accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	420
ggttcgtgca	cacagcccag	cttggagcga	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	480
cgtgagctat	gagaaagcgc	cacgcttccc	gaaggagaa	aggcggacag	gtatccggta	540
agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggaaa	cgccctggtat	600
ctttatagtc	ctgtcggggt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	660
tcaggggggc	ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	cctttttacg	gttcctggcc	720
ttttgctggc	cttttgctca	catgttcttt	cctgcgttat	cccctgattc	tgtggataac	780
cgtattaccg	cctttgagtg	agctgatacc	gctcgcgcga	gccgaacgac	cgagcgcagc	840
gagtcagtga	gcgaggaagc	ggaagagcgc	ccaatacgca	gggccccctg	caggataaaa	900
aaattgtaga	taaattttat	aaaatagttt	tatctacaat	ttttttatca	ggaaacagct	960
atgaccgcgg	ccgcaatatg	atattttatg	ccattgtgaa	agggattata	ttcaactatt	1020
attccagtta	cgttcataga	aattttcctt	tctaaaatat	tttattccat	gtcaagaact	1080
ctgtttattt	cattaaagaa	ctataagtac	aaagtataag	gcatttgaaa	aaataggcta	1140
gtatattgat	tgattattta	ttttaaaatg	cctaagtgaa	atatatacat	attataacaa	1200
taaaataagt	attagtgtag	gattttttaa	tagagtatct	attttcagat	taaatttttg	1260
attatttgat	ttacattata	taatattgag	taaagtattg	actagcaaaa	ttttttgata	1320
ctttaatttg	tgaaatttct	tatcaaaaag	tatatTTTTG	aataattttt	attgaaaaat	1380
acaactaaaa	aggattatag	tataagtgtg	tgtaattttg	tgtaaaattt	aaagggagga	1440
aatgaacatg	aaacatatgg	tgaccatgat	tacgaattcg	agctcggtag	ccggggatcc	1500
tctagagtcg	acgtcacgcg	tccatggaga	tctcgaggcc	tgacagacatg	caagcttggc	1560
actggccgtc	gttttacaac	gtcgtgactg	ggaaaaccct	ggcgttacc	aacttaatcg	1620
ccttgacgca	catccccctt	tcgccagctg	gcgtaatagc	gaagaggccc	gcaccgatcg	1680
cccttcccaa	cagttgcgca	gcctgaatgg	cgaatggcgc	tagcataaaa	ataagaagcc	1740
tgcatTTGca	ggcttcttat	ttttatggcg	cgccgcattc	acttcttttc	tatataaata	1800
tgagcgaagc	gaataagcgt	cggaaaagca	gcaaaaagtt	tcctttttgc	tgttggagca	1860
tgggggttca	gggggtgcag	tatctgacgt	caatgccgag	cgaaagcgag	ccgaagggta	1920
gcatttacgt	tagataaccc	cctgatatgc	tccgacgctt	tatatagaaa	agaagattca	1980
actaggtaaa	atcttaatat	aggttgagat	gataaggttt	ataaggaatt	tgtttgttct	2040
aatttttcac	tcattttggt	ctaatttctt	ttaacaaatg	ttcttttttt	tttagaacag	2100
ttatgatata	gttagaatag	tttaaaataa	ggagtggaaa	aaagatgaaa	gaaagatatg	2160
gaacagtcta	taaaggctct	cagaggctca	tagacgaaga	aagtggagaa	gtcatagagg	2220
tagacaagtt	ataccgtaaa	caaacgtctg	gtaacttctg	aaaggcatat	atagtgcaat	2280
taataagtat	gttagatatg	attggcggaa	aaaaacttaa	aatcgTTAAC	tatatcctag	2340
ataatgtcca	cttaagtaac	aatacaatga	tagctacaac	aagagaaata	gcaaaagcta	2400

ES 2 674 984 T3

caggaacaag tctacaaaca gtaataacaa cacttaaaat cttagaagaa ggaaatatta 2460  
 taaaaagaaa aactggagta ttaatgttaa accctgaact actaatgaga ggcgacgacc 2520  
 aaaaacaaaa atacctctta ctcgaatttg ggaactttga gcaagaggca aatgaaatag 2580  
 attgacctcc caataacacc acgtagttat tgggagggtca atctatgaaa tgcgattaag 2640  
 ggccggccga agcaaacctta agagtgtgtt gatagtgcag tatcttaaaa ttttgtataa 2700  
 taggaattga agttaaatta gatgctaaaa atttgtaatt aagaaggagt gattacatga 2760  
 acaaaaatat aaaatattct caaaactttt taacgagtga aaaagtactc aaccaataa 2820  
 taaaacaatt gaatttaaaa gaaaccgata ccgtttacga aattggaaca ggtaaagggc 2880  
 atttaacgac gaaactggct aaaataagta aacaggtaac gtctattgaa ttagacagtc 2940  
 atctattcaa cttatcgta gaaaaattaa aactgaatac tcgtgtcact ttaattcacc 3000  
 aagatattct acagtttcaa ttccttaaca aacagaggta taaaattggt gggagtattc 3060  
 cttaccattt aagcacacaa attattaataa aagtggtttt tgaaagccat gcgtctgaca 3120  
 tctatctgat tgttgaagaa ggattctaca agcgtacctt ggatattcac cgaacactag 3180  
 ggttgctctt gcacactcaa gtctcgattc agcaattgct taagctgcca gcggaatgct 3240  
 ttcactctaa accaaaagta aacagtgctt taataaaaact tacccgccat accacagatg 3300  
 ttccagataa atattggaag ctatatacgt actttgtttc aaaatgggtc aatcgagaat 3360  
 atcgtcaact gtttactaaa aatcagtttc atcaagcaat gaaacacgcc aaagtaaaaa 3420  
 atttaagtac cgttacttat gagcaagtat tgtctatttt taatagttat ctattattta 3480  
 acggggaggaa ataattctat gagtcgcttt tgtaaatttg gaaagtaca cgttactaaa 3540  
 gggaaatgtgt tt 3552

<210> 49

<211> 4186

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> plásmido pMTL 83145

<400> 49

aaactccttt ttgataatct catgacaaaa atcccctaac gtgagttttc gttccactga 60  
 gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 120  
 atctgctgct tgcaacaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 180  
 gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
 gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
 tacctcgctc tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 360  
 accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480  
 cgtgagctat gagaaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggtg 540

10

ES 2 674 984 T3

agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat	600
ctttatagtc ctgtcggggt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg	660
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc	720
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac	780
cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc	840
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca gggccccctg caggataaaa	900
aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat ttttttatca ggaaacagct	960
atgaccgcgg ccgcaatatg atattttatgt ccattgtgaa agggattata ttcaactatt	1020
attccagtta cgttcataga aattttcctt tctaaaatat tttattccat gtcaagaact	1080
ctgtttatth cattaaagaa ctataagtac aaagtataag gcatttgaaa aaataggcta	1140
gtatattgat tgattattta ttttaaaatg cctaagttaa atatatacat attataacaa	1200
taaaataagt attagtgtag gattttttaa tagagtatct attttcagat taaatttttg	1260
attatttgat ttacattata taatattgag taaagtattg actagcaaaa ttttttgata	1320
ctttaatttg tgaaatttct tatcaaaagt tatatttttg aataattttt attgaaaaat	1380
acaactaaaa aggattatag tataagtgtg tgtaattttg tgttaaattt aaaggaggga	1440
aatgaacatg aaacatatgg tgaccatgat tacgaattcg agctcggtag ccggggatcc	1500
tctagagtcg acgtcacgcg tccatggaga tctcagggcc tgcagacatg caagcttggc	1560
actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc aacttaatcg	1620
ccttgagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg	1680
cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc tagcataaaa ataagaagcc	1740
tgcatthgca ggcttcttat ttttatggcg cgccgccatt attttttga acaattgaca	1800
attcatttct tattttttat taagtgatag tcaaaaggca taacagtgct gaatagaag	1860
aaatttacag aaaagaaaat tatagaattt agtatgatta attatactca tttatgaatg	1920
tttaattgaa tacaaaaaaaa aatacttgtt atgtattcaa ttacggggtta aaatatagac	1980
aagttgaaaa atttaataaa aaaataagtc ctcagctctt atatattaag ctaccaactt	2040
agtatataag ccaaaactta aatgtgctac caacacatca agccgttaga gaactctatc	2100
tatagcaata tttcaaatgt accgacatac aagagaaaca ttaactatat atattcaatt	2160
tatgagatta tcttaacaga tataaatgta aattgcaata agtaagattt agaagtttat	2220
agcctttgtg tattggaagc agtacgcaa ggctttttta tttgataaaa attagaagta	2280
tatttatttt ttcataatta atttatgaaa atgaaagggg gtgagcaaag tgacagagga	2340
aagcagtatc ttatcaaata acaaggattt agcaatatca ttattgactt tagcagtaaa	2400
cattatgact tttatagtg c ttgtagctaa gtagtacgaa agggggagct ttaaaaagct	2460
ccttggaaata catagaattc ataaattaat ttatgaaaag aagggcgtat atgaaaactt	2520
gtaaaaattg caaagagttt attaaagata ctgaaatatg caaaatacat tcgttgatga	2580



ES 2 674 984 T3

ttcattgataa aacagtagca acctattgca gtaaatacaa tgagtcaaga tgtttacata 2640  
 aagggaaagt ccaatgtatt aattgttcaa agatgaaccg atatggatgg tgtgccataa 2700  
 aatgagatg ttttacagag gaagaacaga aaaaagaacg tacatgcatt aaatattatg 2760  
 caaggagctt taaaaaagct catgtaaaga agagtaaaaa gaaaaataa tttatttatt 2820  
 aatttaatat tgagagtgcc gacacagtat gcactaaaaa atatatctgt ggtgtagtga 2880  
 gccgatacaa aaggatagtc actcgcattt tcataataca tcttatgtta tgattatgtg 2940  
 tcggtgggac ttcacgacga aaaccacaa taaaaaaga gttcggggta gggtaagca 3000  
 tagttgaggc aactaaacaa tcaagctagg atatgcagta gcagaccgta aggtcgttgt 3060  
 ttaggtgtgt tgtaatacat acgctattaa gatgtaaaaa tacggatacc aatgaagggg 3120  
 aaagtataat ttttgatgt agtttgtttg ttcattctat ggcaaaactac gtccaaagcc 3180  
 gtttcctaat ctgctaaaaa gtatatcctt tctaaatca aagtcaagta tgaatcata 3240  
 aataaagttt aattttgaag ttattatgat attatgtttt tctattaaaa taaattaagt 3300  
 atatagaata gtttaataat agtatatact taatgtgata agtgtctgac agtgtcacag 3360  
 aaaggatgat tgttatggat tataagcggc cggccagtgg gcaagttgaa aaattcacia 3420  
 aatgtggta taatatcttt gttcattaga gcgataaaact tgaatttgag agggaactta 3480  
 gatggtattt gaaaaaattg ataaaaatag ttggaacaga aaagagtatt ttgaccacta 3540  
 ctttgcaagt gtaccttga cctacagcat gaccgttaaa gtggatatca cacaaataaa 3600  
 ggaaaagggg atgaaactat atcctgcaat gctttattat attgcaatga ttgtaaaccg 3660  
 ccattcagag tttaggacgg caatcaatca agatgggtgaa ttggggatat atgatgagat 3720  
 gataccaagc tatacaatat ttcacaatga tactgaaaca ttttccagcc tttggactga 3780  
 gtgtaagtct gactttaaat catttttagc agattatgaa agtgatcgc aacgggatgg 3840  
 aaacaatcat agaatggaag gaaagccaaa tgctccggaa aacattttta atgtatctat 3900  
 gataccgtgg tcaaccttcg atggctttaa tctgaatttg cagaaaggat atgattatit 3960  
 gattcctatt tttactatgg ggaaatatta taaagaagat aacaaaatta tacttccttt 4020  
 ggcaattcaa gttcatcagc cagtatgtga cggatttcac atttgccgtt ttgtaaacga 4080  
 attgcaggaa ttgataaata gtttaactca ggtttgtctg taactaaaaa caagtattta 4140  
 agcaaaaaca tcgtagaaat acggtgtttt ttgttacct aagttt 4186

<210> 50

<211> 9827

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> plásmido pMTL8215-Pptaack-thIA-HMGS-Patp-HMGR

<400> 50

cctgcaggat aaaaaaattg tagataaatt ttataaata gttttatcta caattttttt 60

atcaggaaac agctatgacc gcggccgcag atagtcataa tagttccaga atagttcaat 120

10

ES 2 674 984 T3

ttagaaatta gactaaactt caaaatgttt gttaaatata taccaatcta gtatagatat	180
tttttaaata ctggacttaa acagtagtaa tttgcctaaa aaattttttc aatttttttt	240
aaaaaatcct tttcaagtig tacattgtta tggaatatg taattgaaga agttatgtag	300
taatattgta aacgtttctt gatTTTTTTa catccatgta gtgcttaaaa aaccaaata	360
tgtcacatgc acttgtatat ttcaaataac aatatttatt ttctcgtaa attcacaat	420
aatttattaa taatatcaat aaccaagatt atacttaa at ggatgtttat tttttaacac	480
ttttatagta aatatattta ttttatgtag taaaaaggtt ataattataa ttgtatttat	540
tacaattaat taaaataaaa aatagggttt taggtaaaat taagttattt taagaagtaa	600
ttacaataaa aattgaagtt atttctttaa ggaggaaatt catatgaaag aggttgttat	660
tgcacagct gttagaactg caataggatc ttatggaaaa agtcttaaag atgtaccagc	720
agtagactta ggtgcaactg caataaagga agcagtaaag aaagcaggta taaaacctga	780
agatgttaat gaagttattt taggaaacgt attacaagct ggacttggac agaatccagc	840
tagacaggca tcattcaaag caggattacc agtagagata cctgctatga ctattaataa	900
agtttgtggt tcaggattaa gaacagtTtc tttagctgct caaattataa aagctggtga	960
cgcatgta ataatagcag gtggtatgga aaatatgtca agagcaccat accttgctaa	1020
taatgctaga tggggttata gaatgggaaa cgctaaattt gtagacgaaa tgataactga	1080
tggactttgg gatgcattta acgattatca catgggaatt actgctgaaa atatagctga	1140
gagatggaat ataagtagag aagaacaaga tgagtttgca cttgcatctc agaaaaaggc	1200
agaagaagct attaaatcag gacaatttaa agatgaaatt gttccagtag taattaaagg	1260
tagaaaagggt gaaacagttg tagacactga tgaacatcct agatttggat ctacaataga	1320
aggtttagct aaattaaagc ctgcttttaa gaaagacgga acagtaactg ctggaaacgc	1380
atcaggttta aatgattgtg cagctgtttt agttattatg tctgctgaaa aggcaaagga	1440
attaggtggt aaaccacttg ctaagatagt tagttatggt tcagcagggtg tagatcctgc	1500
tattatggga tatggacctt tttatgctac aaaggcagct attgaaaagg ctggttggac	1560
agttgatgaa cttgatctta tagagtcaaa tgaggcattt gcagcacaaa gtcttgctgt	1620
tgctaaggat cttaaattcg atatgaataa agtaaatgta aacggtggtg ctatagcact	1680
tggcatcca ataggtgcta gtggtgctag aattttagtt acattagttc atgcaatgca	1740
aaagagagac gctaaaaagg gacttgcaac tttatgcata ggtggtggtc aaggaacagc	1800
aatacttctt gaaaaatggt aagaattcga ggcttttact aaaaacaata aaaacaggag	1860
gaaataatat gactatagga attgacaaaa taaactttta cgtaccacaaa tattatgtag	1920
atatggcaaa attagcagaa gcaagacaag tagaccacaaa taaatttctt attggaatag	1980
gacagactga aatggcagtt agtccagtaa accaagatat agtatcaatg ggtgctaata	2040
ctgctaaaga tataataact gatgaagaca aaaagaaaat aggaatggta atagtagcaa	2100
ctgagtcagc agtagatgca gcaaaggcag cagcagtaca gattcataat ttattaggt	2160

ES 2 674 984 T3

ttcaaccatt tgcaagatgt ttcgaaatga aagaagcatg ttatgctgct actcctgcaa	2220
ttcagttagc taaggattat ttagctacaa gaccaaata gaaagtitta gttatagcta	2280
cagatacagc tagatatgga ctttaattcag gtggtgaacc tactcaaggt gctggtgctg	2340
ttgctatggt tatagctcat aatcctagta tacttgcatt aaatgaagac gctggtgctt	2400
atacagaaga tgtttatgat ttctggagac caacaggaca taagtatcca ttagtagatg	2460
gtgctttatc aaaagacgca tatattagat cttttcaaca atcttggaaat gaatatgcta	2520
agagacaagg aaagagttha gctgattttg ctagtctttg ctttcatggt cttttacta	2580
aatgggtaa aaaggcttha gaatctataa tagataacgc agatgaaaca actcaagaga	2640
gattaagatc tggatatgaa gatgcagttg attacaatag atatgttggg aatatataca	2700
caggaagtct ttatctttct cttataagtc ttcttgaana tagagattta caggctggtg	2760
aaactattgg attatthtca tacggatcag gttctgttgg tgaattttat tcagctacac	2820
ttgtagaagg atataaagat caccttgatc aggcagcaca caaagcactt ttaaacaata	2880
gaactgaagt atcagtagat gcatacgaana ctttttcaaa gagatttgat gatgtagaat	2940
ttgatgaaga gcaggatgca gttcatgaag atagacatat attctatctt tcaaacatag	3000
agaataatgt aagagaatat catagacctg aataagagct cgttataatt ttcaattttc	3060
attcttttta aaggagatta gcatacattt tatcataatt atacagacaa tatagtaata	3120
tatgatgtha aaatatcaat atatgthtaa aaatctgtat attttttccc atthtaatta	3180
tttgactat aatattacac tgagtgtatt gcatathtaa aaaatatttg gtacaattag	3240
ttagthaaat aaattctaaa ttgthaaatta tcagaatcct tattaaggaa atacatagat	3300
ttaaggagaa atcataaaaa ggtgtaatat aaactggcta aaattgagca aaaattgagc	3360
aattaagact ttttgattgt atctttttat atatttaagg tatataatct tttttatatt	3420
gggggaaggt accatgcaat cattagacaa aaatttcaga catttatcaa gacaacaaaa	3480
gttacaacaa ttagttgata aacagtggct ttcagaagat cagtttgata ttttacttaa	3540
tcatcctctt atagatgaag aagttgctaa tagtcttata gaaaatgtaa ttgcacaggg	3600
tgcattacca gttggacttc ttcctaatat aatagttgat gataaggctt atgthgtacc	3660
aatgatggtt gaagaacctt gtgthgttgc agctgcactt tatggtgcta aattagtaaa	3720
tcagacaggt ggattthaaaa ctgtatcatc agaaagaata atgattggac agatagtatt	3780
tgatggtgta gatgacactg aaaaattaag tgcagatatt aaagcattag aaaaacaat	3840
acataagatt gcagatgaag catatcctag tataaaagca agaggtggtg gttatcaaag	3900
aatagcaata gatacatttc cagagcaaca actthtaagt ctttaaggat ttgtagatac	3960
aaaagatgct atgggtgcta atatgcttaa tactatactt gaggcaataa ctgcattcct	4020
taaaaatgaa tctcctcaat cagatatatt aatgtctata ctttcaaacc atgcaactgc	4080
tagttagta aaagtacaag gtgagataga tgthaaagat cttgctagag gtgaaagaac	4140
aggtgaagaa gtagctaaga gaatgthaaag agcttctgta ttagctcagg ttgatattca	4200

ES 2 674 984 T3

tagagctgca	acacataaca	aagggtgttat	gaatggaata	catgctgttg	ttttagctac	4260
aggaaatgat	actagagggtg	ctgaagcatc	tgcacatgca	tacgcatcaa	gagacggaca	4320
atatagaggt	atagcaactt	ggagatatga	tcagaagaga	caaagactta	ttggaactat	4380
tgaagtcca	atgacacttg	ctatagtagg	tggtggtact	aaagtattac	caatagctaa	4440
ggcatcatta	gagttattaa	atggtgattc	tgcacaagaa	cttggacacg	tagttgctgc	4500
tgttgatta	gcacaaaact	ttgctgcttg	tagagcactt	gtttctgaag	gtattcaaca	4560
aggacacatg	tcattacaat	ataaaagttt	agcaatagta	gtaggtgcaa	aaggtgacga	4620
gatagcacia	gtagcagaag	ctcttaaca	ggaaccaaga	gctaatacac	aggttgctga	4680
aagaatttta	caggaaatta	gacagcaata	atctagagtc	gacgtcacgc	gtccatggag	4740
atctcgaggc	ctgcagacat	gcaagcttgg	cactggccgt	cgttttaca	cgctgtgact	4800
gggaaaacc	tggcgttacc	caacttaatc	gccttgacgc	acatccccct	ttcgccagct	4860
ggcgtaaatg	cgaagaggcc	cgcacggatc	gcccttccca	acagttgctc	agcctgaatg	4920
gcgaatggcg	ctagcataaa	aataagaagc	ctgcatttgc	aggcttctta	tttttatggc	4980
gcgccgttct	gaatccttag	ctaattggtc	aacaggtaac	tatgacgaag	atagaccctt	5040
ggataagtct	gtaatggatt	ctaaggcatt	taatgaagac	gtgtatataa	aatgtgctaa	5100
tgaaaagaa	aatgcgttaa	aagagcctaa	aatgagttca	aatggttttg	aaattgattg	5160
gtagtttaat	ttaatatatt	ttttctattg	gctatctcga	tacctataga	atcttctggt	5220
cacttttggt	tttgaaatat	aaaaaggggc	tttttagccc	cttttttta	aaactccgga	5280
ggagtttctt	cattcttgat	actatacgt	actattttcg	atttgacttc	attgtcaatt	5340
aagctagtaa	aatcaatggt	taaaaaaca	aaaacttgca	ttttctacc	tagtaattta	5400
taattttaag	tgtcgagttt	aaaagtataa	tttaccagga	aaggagcaag	tttttaata	5460
aggaaaaatt	tttccttta	aaattctatt	tcgttatatg	actaattata	atcaaaaaa	5520
tgaaaataaa	caagaggtaa	aaactgcttt	agagaaatgt	actgataaaa	aaagaaaaa	5580
tcctagattt	acgtcataca	tagcaccttt	aactactaag	aaaaatattg	aaaggacttc	5640
cacttggtga	gattatttgt	ttatggtgag	tgatgcagac	ttagaacatt	ttaaattaca	5700
taaaggtaat	ttttgcggta	atagattttg	tccaatgtgt	agttggcgac	ttgcttgtaa	5760
ggatagttta	gaaatatcta	ttcttatgga	gcatttaaga	aaagaagaaa	ataaagagtt	5820
tatatTTTTA	actcttaca	ctccaaatgt	aaaaagttat	gatcttaatt	attctattaa	5880
acaatataat	aaatcttta	aaaaattaat	ggagcgtaag	gaagttaagg	atataactaa	5940
aggttatata	agaaaattag	aagtaactta	ccaaaaggaa	aaatacataa	caaaggattt	6000
atggaaaata	aaaaaagatt	attatcaaaa	aaaaggactt	gaaattggtg	atttagaacc	6060
taattttgat	acttataatc	ctcattttca	tgtagttatt	gcagttaata	aaagttattt	6120
tacagataaa	aattattata	taaatcgaga	aagatggttg	gaattatgga	agtttgctac	6180
taaggatgat	tctataactc	aagttgatgt	tagaaaagca	aaaattaatg	attataaaga	6240

ES 2 674 984 T3

ggtttacgaa cttgcgaaat attcagctaa agacactgat tatttaatat cgaggccagt 6300  
 atttgaaatt ttttataaag cattaanaagg caagcaggta ttagttttta gtggattttt 6360  
 taaagatgca cacaaattgt acaagcaagg aaaacttgat gtttataaaa agaaagatga 6420  
 aattaatat gtctatatag tttattataa ttggtgcaaa aaacaatatg aaaaaactag 6480  
 aataagggaa cttacggaag atgaaaaaga agaattaaat caagatttaa tagatgaaat 6540  
 agaaatagat taaagtgtaa ctatacttta tataatatg attaaaaaaa taaaaaaca 6600  
 cagcctatta ggttggttgt tttattttc tttattaatt ttttaattt ttagttttta 6660  
 gttctttttt aaaataagtt tcagcctctt tttcaatatt ttttaagaa ggagtatttg 6720  
 catgaattgc cttttttcta acagacttag gaaatatttt aacagtatct tcttgcccg 6780  
 gtgattttgg aacttcataa cttactaatt tataattatt attttctttt ttaattgtaa 6840  
 cagttgcaaa agaagctgaa cctgttcctt caactagttt atcatcttca atataatatt 6900  
 cttgacctat atagtataaa tatattttta ttatattttt acttttttct gaatctatta 6960  
 ttttataatc ataaaaagtt ttaccaccaa aagaaggttg tactccttct ggtccaacat 7020  
 atttttttac tatattatct aaataatttt tgggaactgg tgttgaatt tgattaatcg 7080  
 aacaaccagt tatacttaaa ggaattataa ctataaaaat atataggatt atctttttaa 7140  
 atttcattat tggcctcctt tttattaaat ttatgttacc ataaaaagga cataacggga 7200  
 atatgtagaa tatttttaat gtagacaaaa tttacataa atataaagaa aggaagtgtt 7260  
 tgtttaaatt ttatagcaaa ctatcaaaaa ttaggggat aaaaatttat gaaaaaagg 7320  
 ttttcgatgt tatttttatg ttaacttta atagtttgtg gtttatttac aaattcggcc 7380  
 ggccagtgga caagttgaaa aattcacaaa aatgtggtat aatatctttg ttcattagag 7440  
 cgataaactt gaatttgaga gggaaacttag atggtatttg aaaaaattga taaaaatagt 7500  
 tggaacagaa aagagtattt tgaccactac tttgcaagt tacctgtac ctacagcatg 7560  
 accgttaag tggatcac acaataaag gaaaaggaa tgaaactata tcctgcaatg 7620  
 ctttattata ttgcaatgat tgtaaaccgc cattcagagt ttaggacggc aatcaatcaa 7680  
 gatgtgaat tgggatata tgatgagatg ataccaagct atacaatatt tcacaatgat 7740  
 actgaaacat tttccagcct ttggactgag tgaagtctg actttaaatc attttagca 7800  
 gattatgaaa gtgatacgca acggtatgga aacaatcata gaatggaagg aaagccaaat 7860  
 gctccgaaa acatttttaa tgtatctatg ataccgtggt caaccttga tggctttaa 7920  
 ctgaatttgc agaaaggata tgattatttg attcctattt ttactatggg gaaatattat 7980  
 aaagaagata acaaaattat acttccttg gcaattcaag ttcacacgc agtatgtgac 8040  
 ggatttcaca tttgccgtt tgtaaacgaa ttgcaggaat tgataaatag ttaacttcag 8100  
 gttgtctgt aactaaaaac aagtatttaa gcaaaaacat cgtagaaata cgggttttt 8160  
 tgttacccta agtttaaact ctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 8220  
 ttttcgttc actgagcgtc agacccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 8280

ES 2 674 984 T3

ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt 8340  
 tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 8400  
 cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 8460  
 gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 8520  
 gataagtcgt gtcttaccgg gttagactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg 8580  
 tcgggctgaa cggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 8640  
 ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcggccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 8700  
 gacaggatc cggtaagcgg cagggtcggg acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg 8760  
 ggaaacgcct ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 8820  
 tttttgtgat gctcgtcagg ggggaggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt 8880  
 ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct 8940  
 gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgtgctg ataccgctcg ccgcagccga 9000  
 acgaccgagc gcagcagtc agtgagcagc gaagcgggag agcgcccaat acgcagggcc 9060  
 cctgcttcg gggtcattat agcattttt tcggtatata catccttttt cgcacgatata 9120  
 acaggatttt gccaaagggt tcgtgtagac tttccttggg gtatccaacg gcgtcagccg 9180  
 ggcaggatag gtgaagtagg cccaccgcg agcgggtgtt ccttcttcac tgtcccttat 9240  
 tcgcacctgg cgggtgctca cgggaatcct gctctgagc gctggccggc taccgcccggc 9300  
 gtaacagatg agggcaagcg gatggctgat gaaaccaagc caaccaggaa gggcagccca 9360  
 cctatcaagg tgtactgcct tccagacgaa cgaagagcga ttgaggaaaa ggcggcggcg 9420  
 gccggcatga gcctgtcggc ctacctgtg gccgtcggcc agggctacaa aatcacgggc 9480  
 gtcgtggact atgagcacgt ccgcgagctg gcccgcacat atggcgacct gggccgcctg 9540  
 ggcggcctgc tgaaactctg gctcaccgac gaccgcgcga cggcgcggtt cgggtgatgcc 9600  
 acgatcctcg ccctgtctggc gaagatcga gagaagcagg acgagcttgg caaggatcatg 9660  
 atggcgctgg tccgcccgag ggcagagcca tgactttttt agccgctaaa acggccgggg 9720  
 ggtgcgcgtg attgccaagc acgtcccat gcgctccatc aagaagagcg acttcgcgga 9780  
 gctgggtaag tacatcaccg acgagcaagg caagaccgat cgggccc 9827

<210> 51

<211> 843

<212> ADN

5 <213> *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

<400> 51

atgatagctg ttccatttaa cgctggaaaa ataaaagttt taattgaggc attagaatct 60  
 ggaaattatt catcaataaa atcagatgta tatgacggaa tgttatatga tgcaccagat 120  
 caccttaaat cattagtaaa cagatttgta gaacttaata atataactga gccattagca 180  
 gtaactatac agacaaatct tcctccttca agaggctctg gatctagtgc agctgttgc 240

ES 2 674 984 T3

gttgcttttg taagagcaag ttatgatttc ttaggaaaaa gtttaactaa agaagagctt 300  
 atagaaaagg ctaattgggc tgaacaaata gctcatggaa agccatctgg aatagataca 360  
 caaacaatag tatctggaaa gcctgtttgg ttcaaaaagg gacatgcaga aacacttaaa 420  
 actctttcac ttgatggata catggtagta attgatacag gtgttaaagg aagtacaaga 480  
 caggctgtag aagatgttca taaactttgc gaagatcctc aatatatgag tcacgtaaaa 540  
 cacataggaa aacttgtact tagagcatct gatgttattg aacatcataa ctttgaagca 600  
 cttgctgata tattcaatga atgtcatgct gatttaaagg ctcttacagt aagtcatgac 660  
 aaaatagaac agttaatgaa gatagggaaa gaaaatgggtg ctatagctgg taaattaact 720  
 ggtgctggta gaggtgggtc aatgttatta cttgcaaaaag acttaccaac tgcaaagaat 780  
 atagttaaag cagtagagaa agctgggtgca gcacatactt ggattgaaaa tttaggtggt 840  
 taa 843

<210> 52

<211> 1077

5 <212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

<400> 52

atgatacaag taaaggcacc aggaaaatta tatatagcag gtgaatacgc tgttacagaa 60  
 ccaggatata aatctgttct tatagctctt gatagatttg ttacagctac tattgaggaa 120  
 gctgatcaat acaaaggaac aatacatca aaggcattac atcacaatcc agtaactttt 180  
 agtagagatg aagattctat tgttatatca gaccacacg cagcaaaaca acttaattat 240  
 gtagtaactg ctatagaaat atttgagcaa tatgcaaaat catgtgacat agcaatgaag 300  
 cattttcatt taactataga ttctaactta gatgatagta atggacataa gtatggactt 360  
 ggatcttctg ctgctgtttt agtttcagta attaaagtac ttaacgaatt ttatgatatg 420  
 aaactttcaa acctttatat atataagtta gcagtaattg ctaatatgaa attacagagt 480  
 ttatcttcat gcggtgatat agcagtaagt gtttattcag gttgggttagc ttattctaca 540  
 tttgaccatg aatgggtaaa acaccagata gaagatacaa cagttgaaga agtacttatt 600  
 aaaaattggc ctggattaca catagagcca cttcaagctc ctgaaaatat ggaagttcct 660  
 ataggttggg caggtagtcc agctagtagt cctcattttg tttctgaagt taaaagactt 720  
 aagtcagatc cttcatttta cgggtgattc ttagaagatt cacatagatg tgtagaaaaa 780  
 ttaattcatg cattcaaaac taataatatt aaggggtgtc agaaaatggt aagacagaat 840  
 agaactatta tacaagaat ggataaggaa gcaacagttg atatagagac tgagaagtta 900  
 aaatatttat gtgatattgc tgaaaaatat catgggtgcaa gtaaaacttc aggtgctggt 960  
 ggtggtgatt gcggaataac tataataaat aaggatgtag acaaagagaa aatatatgat 1020  
 gaatggacta aacatggaat aaagcctctt aagtttaata tttatcatgg acaataa 1077

<210> 53

<211> 984

10 <212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

ES 2 674 984 T3

<400> 53  
 atgataaaat ctggaaaagc aagagcacac actaatatag cacttataaa atattgggggt 60  
 aagaaagatg aggcattaat aataccaatg aataactcaa tatcagtaac tttagaaaag 120  
 ttttatactg aaacaaaagt tacatttaac gatcagctta ctcaagatca attttggtt 180  
 aatggtgaaa aagtttctg aaagaatta gaaaagattt caaagtatat ggatattgtt 240  
 agaaatagag ctggaataga ttggtatgct gagatagaat ctgataattt tgttcctaca 300  
 gctgctggtc ttgctagtgc tgctagtgc tatgcagcat tagctgctgc atgtaaccaa 360  
 gcacttgatt tacagttaag tgataaagac ttaagtagat tagctagaat tggatcagga 420  
 tcagcatcaa gatcaatata cgggtggttt gcagaatggg aaaaaggata taatgacgaa 480  
 acttcttatg ctgttccatt agaaagtaat cactttgaag atgatcttgc tatgattttt 540  
 gtagtaataa accaacattc taaaaagggt cttcaagat atggaatgct tcttacaaga 600  
 aatacaagta gattctatca atattgggta gaccatattg atgaagatct tgcagaagca 660  
 aaggcagcaa tacaagataa ggattttaag agattaggtg aagttattga agagaatgga 720  
 cttagaatgc atgctacaaa tcttgatca actccacctt ttacttactt agtacaagag 780  
 tcatacgatg taatggcatt agtacatgag ttagagaag caggatatcc atgctatttc 840  
 actatggatg ctggacctaa tgtaaaaata cttgtagaga agaaaaacaa acaacagata 900  
 atagataaac ttttaactca gttcgataat aatcagataa tagatagtga tattatagct 960  
 acaggtattg aaattataga ataa 984

<210> 54  
 <211> 516  
 5 <212> ADN  
 <213> Clostridium beijerinckii

<400> 54  
 atggcagagt atataatagc agtagatgag ttcgataacg aataggatc aatagaaaag 60  
 atggaagctc atagaaaagg aacacttcat agagcattca gtattttagt ttttaactca 120  
 aagaatcaac ttttattaca gaaaagaaat gtaaagaaat atcactctcc aggattatgg 180  
 acaaacactt gttgtagtca cccaagatat ggtgaatctc ttcattgatgc tatatacaga 240  
 agattaaaag aagagatggg atttacttgc gaacttgaag aagtattctc attcatatat 300  
 aaggtaaaac ttgaagataa tttatttgag aatgaatatg accatgtatt tattggtaaa 360  
 tatgatgggt agataattgt taataaagat gaagttgatg attttaaatg ggtagacatt 420  
 aatgaagtta aaaaggacat aatagaaga cctgaggcat atacttactg gtttaagtat 480  
 cttgtaataa aagctgaaaa taagatattt aataa 516

<210> 55  
 10 <211> 120  
 <212> ADN  
 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 55  
 atatcgatc agataaaaa atatataata cagaagaaaa aattataaat ttgtggtata 60  
 atataaagta tagtaattta agtttaaac tcgtgaaaac gctaacaat aataggaggt 120

<210> 56  
 15 <211> 900  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli



ES 2 674 984 T3

<400> 56  
atggatttcc cacaacaatt agaagcatgt gtaaacacagg ctaatcaggc acttagtaga 60  
tttattgctc ctcttccttt tcaaaataca ccagtagtag aactatgca atacggtgca 120  
cttttaggtg gtaaaagatt aagaccattc ttagtatatg ctacaggaca tatgtttggt 180  
gtatcaacta atactttaga cgctccagct gctgctgttg aatgtattca tgcattttct 240  
ttaatacatg atgacttacc agcaatggat gacgatgatt taagaagagg tttacctaca 300  
tgtcatgtta aatttgggtg agctaagca attttagcag gtgacgcttt acaaacttta 360  
gctttttcta tactttcaga tgcagacatg cctgaagttt cagatagaga tagaatttct 420  
atgatatcag agcttgcac tgcacagga atagctggaa tgtgcggtgg tcaagcactt 480  
gatttagatg cagaaggtaa acacgtacca cttgatgcat tagagagaat tcatagacat 540  
aaaacaggtg ctcttataag agcagcagta agattaggtg cttaagtgc tggtagacaag 600  
ggtagaagag cacttccagt acttgataag tatgcagaaa gtataggatt agcttttcaa 660  
gttcaagatg acatacttga cgttgttggg gatactgcta ctttaggaaa aagacagggg 720  
gcagatcagc aattaggaaa atctacatac cctgctttac ttggattaga acaggctaga 780  
aagaagcaa gagacttaat agatgacgca agacaaagtc ttaaacagtt agctgaacaa 840  
tcacttgaca caagtgcact tgaagcactt gcagattata ttatacagag aaacaagtaa 900

<210> 57  
<211> 975  
5 <212> ADN  
<213> Malus x domestica

<400> 57  
atggaattta gagtacatth acaggcagac aacgaacaga aatatttca aatcaaattg 60  
aaaccagagc cagaagcatt atattttata aatcaaagaa gaagtgctaa ttataaacca 120  
aacatttggg aaaacgattt tcttgatcag tctttaatat caaaatatga tggatgatgaa 180  
tatagaaaac tttcagaaaa gttaatagaa gaagtaaaga tatacatatc agcagagact 240  
atggatttag ttgctaaatt agaacttata gattctgtta gaaaacttgg acttgctaat 300  
ctttttgaga aagaaataaa ggaagcatta gacagtatag cagcaataga atcagataat 360  
ttaggaacta gagacgatct ttatggaaca gctcttcatt ttaagattct tagacagcat 420  
ggatataagg taagtcaaga tatatttggg agatttatgg atgagaaagg aacattagaa 480  
aatcatcact ttgcacactt aaaaggaatg ttagaattat ttgaggcaag taatcttggg 540  
tttgaaggtg aagacatatt agatgaagct aaagcatctc ttaacttgc tcttagagat 600  
tcaggacata tttgttatcc agactcaaac ttaagtagag atgtagtcca tagtttagaa 660  
ttacctagtc atagaagagt tcaatggttc gatgtaaaat ggcagattaa tgcatacgaa 720  
aaagatattt gtagagtaaa tgcaacttta ttagagttag caaagttaa ttttaattgt 780  
gttcaagctc agcttcagaa gaactttaga gaagctagta gatgggtggc taatcttggg 840  
ttcgcagata atttaaagtt tgctagagat agactttag agtgtttttc atgcgcagta 900  
gggttagcat ttgaaccaga gcattcatct tttagaatat gtttaactaa ggtaattaat 960  
10 cttgttctta ttata 975

<210> 58  
<211> 13817  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> pMTL8314-Pptaack-thIA-HMGS-Patp-HMGR-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-isp S

ES 2 674 984 T3

<400> 58  
aaactccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 60  
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 120  
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 180  
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
tacctcgctc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 360  
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
ggttcgtgca cacagcccag ctgggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480  
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggggagaa aggcggacag gtatccggtg 540  
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat 600  
ctttatagtc ctgtcggggt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 660  
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 720  
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac 780  
cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc 840  
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca gggccccctg caggataaaa 900  
aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat ttttttatca ggaaacagct 960  
atgaccgagg ccgcagatag tcataatagt tccagaatag ttcaatttag aaattagact 1020  
aaacttcaaa atgtttgtta aatataacc aatctagtat agatattttt taaatactgg 1080  
acttaaacag tagtaatttg cctaaaaaat tttttcaatt ttttttaaaa aatccttttc 1140  
aagttgtaca ttgttatggt aatatgtaat tgaagaagtt atgtagtaat attgtaaacg 1200  
tttcttgatt tttttacatc catgtagtgc ttaaaaaacc aaaatatgtc acatgcactt 1260

ES 2 674 984 T3

gtatatttca aataacaata tttatcttct cgttaaattc acaataaatt tattaataat 1320  
 atcaataacc aagattatac ttaaatggat gtttattttt taacactttt atagtaaata 1380  
 tttttatttt atgtagtaaa aaggttataa ttataattgt atttattaca attaattaaa 1440  
 ataaaaaata gggtttttagg taaaattaag ttattttaag aagtaattac aataaaaatt 1500  
 gaagttattt cttaaggag gaaattcata tgaagaggt tgttattgca tcagctgta 1560  
 gaactgcaat aggatcttat ggaaaaagtc ttaaagatgt accagcagta gacttaggtg 1620  
 caactgcaat aaaggaagca gtaaagaaag caggtataaa acctgaagat gttaatgaag 1680  
 ttatcttagg aaacgtatta caagctggac ttggacagaa tccagctaga caggcatcat 1740  
 tcaaagcagg attaccagta gagatactg ctatgactat taataaagtt tgtggttcag 1800  
 gattaagaac agtttcttta gctgctcaaa ttataaaagc tggtgacgca gatgtaataa 1860  
 tagcaggtgg tatggaaaat atgtcaagag caccatacct tgctaataat gctagatggg 1920  
 gttatagaat gggaaacgct aaattttag acgaaatgat aactgatgga ctttgggatg 1980  
 catttaacga ttatcacatg ggaattactg ctgaaaatat agctgagaga tggaataata 2040  
 gtagagaaga acaagatgag tttgcacttg catctcagaa aaaggcagaa gaagctatta 2100  
 aatcaggaca atttaagat gaaattgttc cagtagtaat taaaggtaga aaaggtgaaa 2160  
 cagttgtaga cactgatgaa catcctagat ttggatctac aatagaaggt ttagctaaat 2220  
 taaagcctgc ttttaagaaa gacggaacag taactgctgg aaacgcatca ggtttaaattg 2280  
 attgtgcagc tgtttttagtt attatgtctg ctgaaaaggc aaaggaatta ggtgttaaac 2340  
 cacttgctaa gatagttagt tatggttcag caggtgtaga tcctgctatt atgggatatg 2400  
 gaccttttta tgctacaaag gcagctattg aaaaggctgg ttggacagtt gatgaacttg 2460  
 atcttataga gtcaaatgag gcatttgca cacaagctt tgctgttgct aaggatctta 2520  
 aattcgatat gaataaagta aatgtaaacg gtggtgctat agcacttggc catccaatag 2580  
 gtgctagtgg tgctagaatt ttagttacat tagttcatgc aatgcaaaag agagacgcta 2640  
 aaaagggact tgcaacttta tgcataggtg gtggtcaagg aacagcaata cttcttgaaa 2700  
 aatgttaaga attcgaggct tttactaaaa acaataaaaa caggaggaaa taatatgact 2760  
 ataggaattg acaaaataaa cttttacgta ccaaaatatt atgtagatat ggcaaaatta 2820  
 gcagaagcaa gacaagtaga cccaaataaa tttcttattg gaataggaca gactgaaatg 2880  
 gcagttagtc cagtaacca agatatagta tcaatgggtg ctaatgctgc taaagatata 2940  
 ataactgatg aagacaaaaa gaaaatagga atggtaatag tagcaactga gtcagcagta 3000  
 gatgcagcaa aggcagcagc agtacagatt cataatttat taggtattca accatttgca 3060  
 agatgtttcg aaatgaaaga agcatgttat gctgctactc ctgcaattca gttagctaag 3120  
 gattatttag ctacaagacc aaatgagaaa gttttagtta tagctacaga tacagctaga 3180  
 tatggactta attcaggtgg tgaacctact caaggtgctg gtgctgttgc tatggttata 3240  
 gctcataatc ctagtatact tgcattaaat gaagacgctg ttgcttatac agaagatggt 3300

ES 2 674 984 T3

tatgatttct ggagaccaac aggacataag tatccattag tagatggtgc tttatcaaaa 3360  
gacgcatata ttagatcttt tcaacaatct tggaatgaat atgctaagag acaaggaaag 3420  
agtttagctg attttgctag tctttgcttt catgttcctt ttactaaaat gggtaaaaag 3480  
gctttagaat ctataataga taacgcagat gaaacaactc aagagagatt aagatctgga 3540  
tatgaagatg cagttgatta caatagatat gttggaaata tatacacagg aagtctttat 3600  
ctttctctta taagtcttct tgaaaataga gatttacagg ctggtgaaac tattggatta 3660  
ttttcatacg gatcaggttc tgttggtgaa ttttattcag ctacacttgt agaaggatat 3720  
aaagatcacc ttgatcaggc agcacacaaa gcacttttaa acaatagaac tgaagtatca 3780  
gtagatgcat acgaaacatt tttcaagaga tttgatgatg tagaatttga tgaagagcag 3840  
gatgcagttc atgaagatag acatatattc tatctttcaa acatagagaa taatgtaaga 3900  
gaatatcata gacctgaata agagctcgtt ataattttca attttcattc tttttaaagg 3960  
agattagcat acattttatc ataattatac agacaatata gtaatatatg atgttaaaat 4020  
atcaatataat ggttaaaaat ctgtatattt tttcccattt taattatttg tactataata 4080  
ttactctgag tgtattgcat atttaaaaa tatttggtac aattagttag ttaaataaat 4140  
tctaaattgt aaattatcag aatccttatt aaggaaatac atagatttaa ggagaaatca 4200  
taaaaagggtg taatataaac tggctaaaat tgagcaaaaa ttgagcaatt aagacttttt 4260  
gattgtatct ttttatatat ttaaggtata taatccttatt tatattgggg gaaggtacca 4320  
tgcaatcatt agacaaaaat ttcagacatt tatcaagaca acaaaagtta caacaattag 4380  
ttgataaaca gtggctttca gaagatcagt ttgatatttt acttaatcat cctcttatag 4440  
atgaagaagt tgctaatagt cttatagaaa atgtaattgc acagggtgca ttaccagttg 4500  
gacttcttcc taatataata gttgatgata aggcttatgt tgtaccaatg atggttgaag 4560  
aacctagtggt tgttcgagct gcatcttatg gtgctaaatt agtaaactag acaggtggat 4620  
ttaaaaactgt atcatcagaa agaataatga ttggacagat agtatttgat ggtgtagatg 4680  
aactgaaaa attaagtgca gatattaag cattagaaaa acaatacat aagattgcag 4740  
atgaagcata tcctagtata aaagcaagag gtggtggtta tcaaagaata gcaatagata 4800  
catttcaga gcaacaactt ttaagtctta aggtatttgt agatacaaaa gatgctatgg 4860  
gtgctaatat gcttaatact atacttgagg caataactgc attccttaa aatgaatctc 4920  
ctcaatcaga tatattaatg tctatacttt caaacatgc aactgctagt gtagtaaaag 4980  
tacaagggtga gatagatgta aaagatcttg ctagagggtga aagaacaggt gaagaagtag 5040  
ctaagagaat ggaaagagct tctgtattag ctcagggtga tattcataga gctgcaacac 5100  
ataacaaagg tgttatgaat ggaatacatg ctggtgtttt agctacagga aatgatacta 5160  
gaggtgctga agcatctgca catgcatacg catcaagaga cggacaatat agaggtatag 5220  
caacttgag atatgatcag aagagacaaa gacttattgg aactattgaa gttccaatga 5280  
cacttgctat agtaggtggt ggtactaaag tattaccaat agctaaggca tcattagagt 5340

ES 2 674 984 T3

tattaaatgt	tgattctgca	caagaacttg	gacacgtagt	tgctgctggt	ggattagcac	5400
aaaactttgc	tgctttaga	gcacttgttt	ctgaaggtat	tcaacaagga	cacatgtcat	5460
tacaataaa	aagtttagca	atagtagtag	gtgcaaaagg	tgacgagata	gcacaagtag	5520
cagaagctct	taaacaggaa	ccaagagcta	atacacaggt	tgctgaaaga	attttacagg	5580
aaattagaca	gcaataatct	agaatatcga	tacagataaa	aaaatatata	atacagaaga	5640
aaaaattata	aatttggtg	ataatataaa	gtatagtaat	ttaagttaa	acctcgtgaa	5700
aacgctaaca	aataatagga	ggtcaattga	tgatagctgt	tccatttaac	gctggaaaaa	5760
taaaagtfff	aattgaggca	ttagaatctg	gaaattattc	atcaataaaa	tcagatgtat	5820
atgacggaat	gttatatgat	gcaccagatc	accttaaate	attagtaaac	agattttag	5880
aacttaataa	tataactgag	ccattagcag	taactataca	gacaaatctt	cctccttcaa	5940
gaggtcttgg	atctagtgca	gctgttgctg	ttgcttttgt	aagagcaagt	tatgatttct	6000
taggaaaaag	ttaactaaa	gaagagctta	tagaaaaggc	taattgggct	gaacaaatag	6060
ctcatggaaa	gccatctgga	atagatacac	aaacaatagt	atctggaaag	cctgtttgg	6120
ttcaaaaggg	acatgcagaa	acacttaaaa	ctctttcact	tgatggatac	atggtagtaa	6180
ttgatacagg	tgtaaagga	agtacaagac	aggctgtaga	agatgttcat	aaactttgcg	6240
aagatcctca	atatatgagt	cacgtaaaac	acataggaaa	acttgactt	agagcatctg	6300
atgttattga	acatacaaac	tttgaagcac	ttgctgatat	attcaatgaa	tgcatgctg	6360
atftaaaggc	tcttacagta	agtcatgaca	aaatagaaca	gttaatgaag	ataggaaaag	6420
aaaatggtgc	tatagctggt	aaattaactg	gtgctggtag	agggtggtca	atgttattac	6480
ttgcaaaaga	cttaccaact	gcaaagaata	tagftaaagc	agtagagaaa	gctggtgca	6540
cacatacttg	gattgaaaat	ttaggtggtt	aagtcgacaa	agacactaaa	aaattataaa	6600
agtaaaggag	gacattaaat	gatacaagta	aaggcaccag	gaaaattata	tatagcaggt	6660
gaatacgctg	ttacagaacc	aggatataaa	tctgttctta	tagctcttga	tagatttgtt	6720
acagctacta	ttgaggaagc	tgatcaatac	aaaggaacaa	tacattcaaa	ggcattacat	6780
cacaatccag	taacttttag	tagagatgaa	gattctattg	ttatatcaga	cccacacgca	6840
gcaaaacaac	ttaattatgt	agtaactgct	atagaaatat	ttgagcaata	tgcaaaatca	6900
tgtgacatag	caatgaagca	ttttcattta	actatagatt	ctaacttaga	tgatagtaat	6960
ggacataagt	atggacttgg	atcttctgct	gctgttttag	tttcagtaat	taaagtactt	7020
aacgaatfff	atgatatgaa	actttcaaac	ctttatatat	ataagttagc	agtaattgct	7080
aatatgaaat	tacagagttt	atcttcatgc	ggtgatatag	cagtaagtgt	ttattcaggt	7140
tggttagctt	attctacatt	tgaccatgaa	tgggtaaaac	accagataga	agatacaaca	7200
gttgaagaag	tacttattaa	aaattggcct	ggattacaca	tagagccact	tcaagctcct	7260
gaaaaatg	aagttcttat	aggttggaca	ggtagtccag	ctagtagtcc	tcattttggt	7320
tctgaagtta	aaagacttaa	gtcagatcct	tcattttacg	gtgatttctt	agaagattca	7380

ES 2 674 984 T3

catagatgtg tagaaaaatt aattcatgca ttcaaaacta ataatattaa ggggtgttcag 7440  
 aaaatggtaa gacagaatag aactattata caaagaatgg ataaggaagc aacagttgat 7500  
 atagagactg agaagttaaa atattttatgt gatattgctg aaaaatatca tgggtcaagt 7560  
 aaaacttcag gtgctggtgg tggtgattgc ggaataacta taataaataa ggatgtagac 7620  
 aaagagaaaa tatatgatga atggactaaa catggaataa agcctcttaa gtttaattatt 7680  
 tatcatggac aataaccatg gtcaataatc ttacaataaa taaaagaaag gaggcaaaaa 7740  
 tatgataaaa tctgaaaaag caagagcaca cactaatata gcacttataa aatattgggg 7800  
 taagaagatg gaggcattaa taataccaat gaataactca atatcagtaa ctttagaaaa 7860  
 gttttatact gaaacaaaag ttacatttaa cgatcagctt actcaagatc aattttggct 7920  
 taatggtgaa aaagtttctg gaaaagaatt agaaaagatt tcaaagtata tggatattgt 7980  
 tagaaataga gctggaatag attggtatgc tgagatagaa tctgataatt ttgttcctac 8040  
 agctgctggt cttgctagtt ctgctagtgc ttatgcagca ttagctgctg catgtaacca 8100  
 agcacttgat ttacagttaa gtgataaaga cttaaagtaga ttagctagaa ttggatcagg 8160  
 atcagcatca agatcaatat acggtggttt tgcagaatgg gaaaaaggat ataatgacga 8220  
 aacttcttat gctgttccat tagaaagtaa tcactttgaa gatgatcttg ctatgatttt 8280  
 tgtagtaata aaccaacatt ctaaaaagggt tccttcaaga tatggaatgt ctcttacaag 8340  
 aaatacaagt agattctatc aatattggtt agaccatatt gatgaagatc ttgcagaagc 8400  
 aaaggcagca atacaagata aggattttaa gagattaggt gaagttattg aagagaatgg 8460  
 acttagaatg catgctacaa atccttgatc aactccacct tttacttact tagtacaaga 8520  
 gtcatacgat gtaatggcat tagtacctga gtgtagagaa gcaggatatac catgctattt 8580  
 cactatggat gctggaccta atgtaaaaat acttgtagag aagaaaaaca aacaacagat 8640  
 aatagataaa cttttaactc agttcgataa taatcagata atagatagtg atattatagc 8700  
 tacagggtatt gaaattatag aataaactag ttgtatatta aaatagtaga atacataaga 8760  
 tacttaattt aattaaagat agttaagtac ttttcaatgt gcttttttag atgtttaata 8820  
 caaatcttta attgtaaaag aaatgctgta ctatttactg ttctagtac gggattaaac 8880  
 tgtattaatt ataaataaaa aataagtaca gttgtttaaa attatatttt gtattaaatc 8940  
 taatagtagc atgtaagtta ttttatacta ttgctagttt aataaaaaga ttttaattata 9000  
 tacttgaaaa ggagaggaac tcgagatggc agagtatata atagcagtag atgagttcga 9060  
 taacgaaata ggatcaatag aaaagatgga agctcataga aaaggaacac ttcataagagc 9120  
 attcagatatt ttagttttta actcaaagaa tcaactttta ttacagaaaa gaaatgtaaa 9180  
 gaaatatcac tctccaggat tatggacaaa cacttgttgt agtcacccaa gatatgggtga 9240  
 atctcttcat gatgctatat acagaagatt aaaagaagag atgggattta cttgcgaact 9300  
 tgaagaagta ttctcattca tatataagggt aaaacttgaa gataatttat ttgagaatga 9360  
 atatgaccat gtatttattg gtaaatatga tggtgagata attgttaata aagatgaagt 9420

ES 2 674 984 T3

tgatgatttt	aaatgggtag	acattaatga	agttaaaaag	gacataatag	aaagacctga	9480
ggcatatact	tactggttta	agtatcttgt	aaataaagct	gaaaataaga	tatttaaata	9540
aaccggtggg	aggaaatgaa	catggcaaca	gaattattat	gtttacacag	acctatatca	9600
cttactcaca	aacttttttag	gaatccatta	cctaaagtta	ttcaagctac	acctttaaca	9660
ttaaaactta	gggtgtagtgt	ttctacagaa	aatgtatcat	ttagtgagac	agaaactgaa	9720
acaagaagat	cagcaaatta	tgaaccaa	tcttgggatt	atgattatct	tctttcttct	9780
gatactgatg	agtcaataga	agtacataaa	gataaggcta	agaaattaga	agctgaagtt	9840
aggagagaaa	taaataatga	gaaggctgaa	tttcttacac	ttcttgaact	tattgataat	9900
gtacaagac	ttggattagg	atatagattt	gagtctgata	taagaagagc	attagataga	9960
tttgtaagta	gtggaggatt	tgatggagtt	actaaaactt	cattacatgg	aacagcatta	10020
tcatttaggt	tattaaggca	acatggtttt	gaagtatctc	aagaagcttt	tagtggattt	10080
aaagatcaga	atggaaactt	tcttgagaat	ttaaaggaag	acataaaagc	aattctttct	10140
ctttatgaag	catcattttt	agcattagaa	ggtgagaata	tattagatga	ggctaaagta	10200
tttgcaatat	ctcatcttaa	agaacttagt	gaagaaaaga	ttggtaaaga	attagctgaa	10260
caagtttcac	atgctttaga	attaccatta	catagaagaa	cacaaagatt	agaagcagtt	10320
tggtcaatag	aagcatatag	aaagaaagaa	gacgcaaatc	aagtactttt	agaacttgca	10380
atacttgact	acaatatgat	tcaaagtgta	tatcagaggg	atttaagaga	aacatcaaga	10440
tggtggagaa	gagtaggatt	agcaactaaa	ttacattttg	ctagagatag	gcttattgaa	10500
agtttttatt	gggctgttgg	agttgctttt	gaaccacaat	attctgattg	cagaaatagt	10560
gtagcaaaga	tgttttcatt	tgttactata	attgacgata	tttacgatgt	atatggaact	10620
ttagatgaac	ttgaactttt	tactgargca	gttgaaagat	gggatgtaa	tgctattaat	10680
gatcttcctg	attatatgaa	gttatgtttt	cttgcacttt	acaatactat	taacgagata	10740
gcttacgata	acttaaaaga	taaaggtag	aacatacttc	cttatttaac	aaaagcatgg	10800
gcagatttat	gtaatgcatt	tcttcaagaa	gctaagtggc	tttataataa	atcaacacct	10860
acatttgatg	attatttttg	aaatgcatgg	aaaagttcta	gtggaccttt	acagcttatt	10920
tttgcttatt	ttgctgtagt	acagaacatt	aaaaggaag	agattgagaa	tcttcagaaa	10980
tatcatgaca	taatatcaag	acctagtcac	attttttaggc	tttgtaatga	tttagcatct	11040
gcttcagcag	aaatagcaag	agggtgaaact	gctaattctg	taagttgtta	tatgagaaca	11100
aaaggatatat	ctgaagaatt	agctactgaa	agtgttatga	atcttataga	cgaaacttgg	11160
aagaaaatga	acaagaaaa	acttgggtgga	tctttatttg	caaaaccttt	tgttgagact	11220
gctataaatt	tagctagaca	gtctcattgc	acatatcata	atggtgatgc	acatactagt	11280
ccagatgaat	taactaggaa	aagagtactt	agtgtaataa	ctgaaccaat	attaccattt	11340
gaaagataag	ctagcataaa	aataagaagc	ctgcatttgc	aggcttctta	tttttatggc	11400
gcccgcctat	tatttttttg	aacaattgac	aattcatttc	ttatttttta	ttaagtgata	11460

ES 2 674 984 T3

gtcaaaaggc ataacagtgc tgaatagaaa gaaatTTaca gaaaagaaaa ttatagaatt 11520  
 tagtatgatt aattatactc atttatgaat gTTtaattga atacaaaaaa aaatacttgt 11580  
 tatgtattca attacgggtt aaaatataga caagttgaaa aatttaataa aaaaataagt 11640  
 cctcagctct tatatattaa gctaccaact tagtatataa gccaaaactt aaatgtgcta 11700  
 ccaacacatc aagccgtag agaactctat ctatagcaat atttcaaatg taccgacata 11760  
 caagagaaac attaactata tatattcaat ttatgagatt atcttaacag atataaatgt 11820  
 aaattgcaat aagtaagatt tagaagTTta tagcctTTgt gtattggaag cagtacgcaa 11880  
 aggctTTTT atTTgataaa aattagaagt atatTTattt tttcataatt aatttatgaa 11940  
 aatgaaaggg ggtgagcaaa gtgacagagg aaagcagtat cttatcaaat aacaaggtat 12000  
 tagcaatatc attattgact ttagcagtaa acattatgac ttttatagtg cttgtagcta 12060  
 agtagtacga aagggggagc tttaaaaagc tccttggaat acatagaatt cataaattaa 12120  
 tttatgaaaa gaagggcgta tatgaaaact tgtaaaaatt gcaaagagtt tattaagat 12180  
 actgaaatat gcaaaaatac ttcgTTgatg atTcatgata aaacagtgc aacctattgc 12240  
 agtaaataca atgagtcaag atgTTTatc aaagggaaag tccaatgtat taattgttca 12300  
 aagatgaacc gatatggatg gtgtgccata aaaatgagat gTTTtacaga ggaagaacag 12360  
 aaaaaagaac gtacatgcat taaatattat gcaaggagct ttaaaaaagc tcatgtaaag 12420  
 aagagtaaaa agaaaaaata atTTatttat taatttaata ttgagagtgc cgacacagta 12480  
 tgcactaaaa aatatactg tggTtagtg agccgataca aaaggatagt cactcgatt 12540  
 ttcataatac atcttatgtt atgattatgt gtcggtggga cttcacgacg aaaaccaca 12600  
 ataaaaaag agttcggggT agggTTaagc atagTTgagg caactaaaca atcaagctag 12660  
 gatatgcagt agcagaccgt aaggtcgTTg tttaggtgtg ttgtaataca tacgctatta 12720  
 agatgtaaaa atacggatac caatgaaggg aaaagtataa tttttgatg tagtttgtt 12780  
 gttcatctat gggcaaaacta cgtccaaagc cgTTTccaa tctgctaaaa agtatatcct 12840  
 ttctaaaatc aaagtcaagt atgaaatcat aaataaagtt taattttgaa gttattatga 12900  
 tattatgttt ttctattaaa ataaattaag tatatagaat agTTtaataa tagtatatac 12960  
 ttaatgtgat aagtgtctga cagtgtcaca gaaaggatga ttgttatgga ttataagcgg 13020  
 ccggccagtg ggcaagttga aaaattcaca aaaatgtggt ataatatcct tgttcattag 13080  
 agcgataaac ttgaatttga gagggaaactt agatggtatt tgaaaaaatt gataaaaata 13140  
 gttggaacag aaaagagtat tttgaccact actTTgcaag tgtacctgt acctacagca 13200  
 tgaccgtaa agtggatatc acacaaataa aggaaaaggg aatgaaacta tatcctgcaa 13260  
 tgctttatta tattgcaatg attgtaaacc gccattcaga gtttaggacg gcaatcaatc 13320  
 aagatggtga attggggata tatgatgaga tgataccaag ctatacaata tttcaaatg 13380  
 atactgaaac atTTTccagc ctttgactg agtGtaagtc tgactTTaaa tcattTTtag 13440  
 cagattatga aagtgatacg caacggtatg gaaacaatca tagaatgaa ggaaagcaa 13500  
 atgctccgga aaacatTTTT aatgtatcta tgataccgtg gtcaacctc gatggcttta 13560  
 atctgaattt gcagaaagga tatgattatt tgattcctat tttactatg gggaaatatt 13620  
 ataaagaaga taacaaaatt atactTcctt tggcaattca agttcatcac gcagtatgtg 13680  
 acggatttca catttgccgt tttgtaaacc aattgcagga attgataaat agTTaacttc 13740  
 aggtttgtct gtaactaaaa acaagtattt aagcaaaaac atcgtagaaa tacgggtttt 13800  
 tttgttacc taagttt 13817

<210> 59  
<211> 14709



ES 2 674 984 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> plásmido pMTL8314-Pptaack-thIA-HMGS-Patp-HMGR-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-isp A-FS

5 <400> 59  
 aaactccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 60  
 gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 120  
 atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 180  
 gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
 gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
 tacctcgctc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcc gtggcgataa gtcgtgtctt 360  
 accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480  
 cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggtg 540  
 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat 600  
 ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 660  
 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 720  
 ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgggataac 780  
 cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc 840  
 gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacga gggccccctg caggataaaa 900  
 aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat tttttatca ggaaacagct 960  
 atgaccgcgg ccgcagatag tcataatagt tccagaatag ttcaatttag aaattagact 1020  
 aaacttcaaa atgtttgtta aatatatacc aatctagtat agatattttt taaatactgg 1080  
 acttaaacag tagtaatttg ctaaaaaat tttttcaatt ttttttaaaa aatccttttc 1140  
 aagttgtaca ttgttatggt aatatgtaat tgaagaagtt atgtagtaat attgtaaacg 1200  
 tttcttgatt tttttacatc catgtagtgc ttaaaaaacc aaaatatgtc acatgcactt 1260  
 gtatatttca aataacaata tttttttct cgtaaattc acaataatt tattaataat 1320

ES 2 674 984 T3

atcaataacc aagattatac ttaaatggat gtttattttt taacactttt atagtaaata	1380
tattttatttt atgtagtaaa aaggttataa ttataattgt atttattaca attaattaaa	1440
ataaaaaata gggtttttagg taaaattaag ttattttaag aagtaattac aataaaaatt	1500
gaagttatttt cttaaaggag gaaattcata tgaagagagg tgttattgca tcagctgta	1560
gaactgcaat aggatcttat ggaaaaagtc ttaaagatgt accagcagta gacttaggtg	1620
caactgcaat aaaggaagca gtaaagaaaag caggataaaa acctgaagat gttaatgaag	1680
ttatttttagg aaacgtatta caagctggac ttggacagaa tccagctaga caggcatcat	1740
tcaaagcagg attaccagta gagataacct ctatgactat taataaagtt tgtggttcag	1800
gattaagaac agtttcttta gctgctcaa ttataaaagc tggtagcga gatgtaataa	1860
tagcaggtgg tatggaaaat atgtcaagag caccatacct tgctaataat gctagatggg	1920
gttatagaat gggaaacgct aaattttag acgaaatgat aactgatgga ctttgggatg	1980
catttaacga ttatcacatg ggaattactg ctgaaaatat agctgagaga tggaatataa	2040
gtagagaaga acaagatgag ttgacctg catctcagaa aaaggcagaa gaagctatta	2100
aatcaggaca atttaagat gaaattgttc cagtagtaat taaaggtaga aaaggtgaaa	2160
cagttgtaga cactgatgaa catcctagat ttggatctac aatagaaggt ttagctaaat	2220
taaagcctgc ttttaagaaa gacggaacag taactgctgg aaacgcatca ggtttaatg	2280
attgtgcagc tgtttttagtt attatgtctg ctgaaaaggc aaaggaatta ggtgttaaac	2340
cacttgctaa gatagttagt tatggttcag caggtgtaga tcctgctatt atgggatatg	2400
gaccttttta tgctacaaag gcagctattg aaaaggctgg ttggacagtt gatgaacttg	2460
atcttataga gtcaaatgag gcatttgtag cacaaagtct tgctgttgct aaggatctta	2520
aattcgatat gaataaagta aatgtaaagc gtgggtgctat agcacttggg catccaatag	2580
gtgctagtagg tgctagaatt ttagttacat tagttcatgc aatgcaaaag agagacgcta	2640
aaaagggact tgcaacttta tgcatagggt gtgggtcaagg aacagcaata cttcttgaaa	2700
aatgttaaga attcgaggct tttactaaaa acaataaaaa caggaggaaa taatatgact	2760
ataggaattg acaaaataaa cttttacgta ccaaaatatt atgtagatat ggcaaaatta	2820
gcagaagcaa gacaagtaga cccaataaa tttcttattg gaataggaca gactgaaatg	2880
gcagttagtc cagtaaacca agatatagta tcaatgggtg ctaatgctgc taaagatata	2940
ataactgatg aagacaaaaa gaaaatagga atggtaatag tagcaactga gtcagcagta	3000
gatgcagcaa aggcagcagc agtacagatt cataatttat taggtattca accatttgca	3060
agatgtttcg aaatgaaaga agcatgttat gctgctactc ctgcaattca gtttagctaag	3120
gattattttag ctacaagacc aaatgagaaa gtttttagtta tagctacaga tacagctaga	3180
tatggactta attcaggtgg tgaacctact caaggtgctg gtgctgttgc tatggttata	3240
gctcataatc ctagtatact tgcattaaat gaagacgctg ttgcttatac agaagatggt	3300
tatgatttct ggagaccaac aggcataaag tatccattag tagatgggtgc tttatcaaaa	3360

ES 2 674 984 T3

gacgcatata ttagatcttt tcaacaatct tggaaatgaat atgctaagag acaaggaaag	3420
agtttagctg attttgctag tctttgcttt catgttcctt ttactaaaat gggtaaaaag	3480
gctttagaat ctataataga taacgcagat gaaacaactc aagagagatt aagatctgga	3540
tatgaagatg cagttgatta caatagatat gttggaaata tatacacagg aagtctttat	3600
ctttctctta taagtcttct tgaaaataga gatttacagg ctggtgaaac tattggatta	3660
ttttcatacg gatcaggttc tgttggtgaa ttttattcag ctacacttgt agaaggatat	3720
aaagatcacc ttgatcaggc agcacacaaa gcacttttaa acaatagaac tgaagtatca	3780
gtagatgcat acgaaacatt tttcaagaga tttgatgatg tagaatttga tgaagagcag	3840
gatgcagttc atgaagatag acatatattc tatctttcaa acatagagaa taatgtaaga	3900
gaatatcata gacctgaata agagctcgtt ataattttca attttcattc tttttaaagg	3960
agattagcat acattttatc ataattatac agacaatata gtaatatatg atgttaaaat	4020
atcaatatat ggtaaaaat ctgtatattt tttcccattt taattatttg tactataata	4080
ttacactgag tgtattgcat atttaaaaaa tatttggtag aattagttag ttaaataaat	4140
tctaaattgt aaattatcag aatccttatt aaggaaatac atagatttaa ggagaaatca	4200
taaaagggtg taatataaac tggctaaaat tgagcaaaaa ttgagcaatt aagacttttt	4260
gattgtatct ttttatatat ttaagggtata taatccttatt tatattgggg gaaggtagca	4320
tgcaatcatt agacaaaaat ttcagacatt tatcaagaca acaaaagtta caacaattag	4380
ttgataaaca gtggccttca gaagatcagt ttgatatttt acttaatcat cctcttatag	4440
atgaagaagt tgctaatagt cttatagaaa atgtaattgc acagggtgca ttaccagttg	4500
gacttcttcc taatataata gttgatgata aggcttatgt tgtaccaatg atggttgaag	4560
aacctagtgt tgttgcagct gcatcttatg gtgctaaatt agtaaatcag acagggtgat	4620
ttaaaactgt atcatcagaa agaataatga ttggacagat agtatttgat ggtgtagatg	4680
acactgaaaa attaagtgca gatattaag cattagaaaa acaatacat aagattgtag	4740
atgaagcata tcctagtata aaagcaagag gtgggtggta tcaaagaata gcaatagata	4800
catttccaga gcaacaactt ttaagtcctta aggtatttgt agatacaaaa gatgctatgg	4860
gtgctaatat gcttaatact atacttgagg caataactgc attccttaa aatgaatctc	4920
ctcaatcaga tatattaatg tctatacttt caaacatgc aactgctagt gtagtaaaag	4980
tacaaggatg gatagatgta aaagatcttg ctagaggatg aagaacaggt gaagaagtag	5040
ctaagagaat ggaaagagct tctgtattag ctgaggttga tattcataga gctgcaacac	5100
ataacaaagg tgttatgaat ggaatacatg ctgttgtttt agctacagga aatgatacta	5160
gagggtgctga agcatctgca catgcatacg catcaagaga cggacaatat agaggtagatg	5220
caacttggag atatgatcag aagagacaaa gacttattgg aactattgaa gttccaatga	5280
cacttgctat agtaggtggt ggtactaaag tattaccaat agctaaggca tcattagagt	5340
tattaaatgt tgattctgca caagaacttg gacacgtagt tgctgctggt ggattagcac	5400

ES 2 674 984 T3

aaaactttgc tgctttaga gcaactggtt ctgaaggat tcaacaagga cacatgtcat 5460  
 tacaatataa aagtttagca atagtagtag gtgcaaaagg tgacgagata gcacaagtag 5520  
 cagaagctct taaacaggaa ccaagagcta atacacaggt tgctgaaaga attttacagg 5580  
 aaattagaca gcaataatct agaatatcga tacagataaa aaaatatata atacagaaga 5640  
 aaaaattata aattttaggt ataataaaa gtatagtaat ttaagttaa acctcgtgaa 5700  
 aacgctaaca aataatagga ggtcaattga tgatagctgt tccatttaac gctggaaaaa 5760  
 taaaagtttt aattgaggca ttagaatctg gaaattattc atcaataaaa tcagatgtat 5820  
 atgacggaat gttatatgat gcaccagatc acctaaatc attagtaaac agattttag 5880  
 aacttaataa tataactgag ccattagcag taactataca gacaaatctt cctccttcaa 5940  
 gaggtcttgg atctagtgca gctgttgctg ttgcttttgt aagagcaagt tatgatttct 6000  
 taggaaaaag tttaactaaa gaagagctta tagaaaaggc taattgggct gaacaaatag 6060  
 ctcatggaaa gccatctgga atagatacac aaacaatagt atctggaaaag cctgtttggt 6120  
 ttcaaaaggg acatgcagaa acacttaaaa ctctttcact tgatggatac atggtagtaa 6180  
 ttgatacagg tgtaaagga agtacaagac aggctgtaga agatgttcat aaactttgcg 6240  
 aagatcctca atatatgagt cacgtaaac acataggaaa acttgactt agagcatctg 6300  
 atgttattga acatcataac tttgaagcac ttgctgatat attcaatgaa tgcatgctg 6360  
 atttaaaggc tcttacagta agtcatgaca aaatagaaca gttaatgaag ataggaaaag 6420  
 aaaatggtgc tatagctggt aaattaactg gtgctggtag aggtggttca atgttattac 6480  
 ttgcaaaaga cttaccaact gcaaagaata tagttaaagc agtagagaaa gctgggtgag 6540  
 cacatacttg gattgaaaat ttaggtggtt aagtcgaca agacactaaa aaattataaa 6600  
 agtaaaggag gacattaaat gatacaagta aaggcaccag gaaaattata tatagcaggt 6660  
 gaatacgtg ttacagaacc aggatataaa tctgttctta tagctcttga tagatttgtt 6720  
 acagctacta ttgaggaagc tgatcaatac aaaggaacaa tacattcaaa ggcattacat 6780  
 cacaatccag taacttttag tagagatgaa gattctattg ttatatcaga cccacacgca 6840  
 gcaaaacaac ttaattatgt agtaactgct atagaaatat ttgagcaata tgcaaaatca 6900  
 tgtgacatag caatgaagca ttttcattta actatagatt ctaacttaga tgatagtaat 6960  
 ggacataagt atggacttgg atcttctgct gctgttttag tttcagtaat taaagtactt 7020  
 aacgaatfff atgatatgaa actttcaaac ctttatatat ataagttagc agtaattgct 7080  
 aatatgaaat tacagagttt atcttcatgc ggtgatatag cagtaagtgt ttattcaggt 7140  
 tggtagctt attctacatt tgaccatgaa tgggtaaac accagataga agatacaaca 7200  
 gttgaagaag tacttattaa aaattggcct ggattacaca tagagccact tcaagctcct 7260  
 gaaaatatgg aagttcttat aggttgaca ggtagtccag ctagtgtcc tcattttggt 7320  
 tctgaagtta aaagacttaa gtcagatcct tcattttacg gtgatttctt agaagattca 7380  
 catagatgtg tagaaaaatt aattcatgca ttcaaaacta ataattataa ggggtttcag 7440

ES 2 674 984 T3

aaaatggtaa gacagaatag aactattata caaagaatgg ataaggaagc aacagttgat 7500  
 atagagactg agaagttaaa atatttatgt gatattgctg aaaaatatca tggtgcaagt 7560  
 aaaacttcag gtgctggtgg tggtgattgc ggaataacta taataaataa ggatgtagac 7620  
 aaagagaaaa tatatgatga atggactaaa catggaataa agcctcttaa gtttaatt 7680  
 tatcatggac aataaccatg gtcaataatc ttacaataaa taaaagaaag gaggcaaaaa 7740  
 tatgataaaa tctggaaaag caagagcaca cactaatata gcacttataa aatattgggg 7800  
 taagaaagat gaggcattaa taataccaat gaataactca atatcagtaa ctttagaaaa 7860  
 gttttatact gaaacaaaag ttacatttaa cgatcagctt actcaagatc aattttggct 7920  
 taatggtgaa aaagtttctg gaaaagaatt agaaaagatt tcaaagtata tggatattgt 7980  
 tagaaataga gctggaatag attggtatgc tgagatagaa tctgataatt ttgttcctac 8040  
 agctgctggt cttgctagtt ctgctagtgc ttatgcagca ttagctgctg catgtaacca 8100  
 agcacttgat ttacagttaa gtgataaaga cttaaagtaga ttagctagaa ttggatcagg 8160  
 atcagcatca agatcaatat acggtggttt tgcagaatgg gaaaaaggat ataatgacga 8220  
 aacttcttat gctgttccat tagaaagtaa tcactttgaa gatgatcttg ctatgatttt 8280  
 tgtagtaata aaccaacatt ctaaaaaggt tccttcaaga tatggaatgt ctcttacaag 8340  
 aaatacaagt agattctatc aatattggtt agaccatatt gatgaagatc ttgcagaagc 8400  
 aaaggcagca atacaagata aggattttta gagattaggt gaagttattg aagagaatgg 8460  
 acttagaatg catgctacaa atcttggatc aactccacct tttacttact tagtacaaga 8520  
 gtcatacgat gtaatggcat tagtacatga gtgtagagaa gcaggatatc catgctattt 8580  
 cactatggat gctggaccta atgtaaaaaat acttgtagag aagaaaaaca aacaacagat 8640  
 aatagataaa cttttaactc agttcgataa taatcagata atagatagtg atattatagc 8700  
 tacaggtatt gaaattatag aataaactag ttgtatatta aaatagtaga atacataaga 8760  
 tacttaattt aattaaagat agttaagtac ttttcaatgt gcttttttag atgtttaata 8820  
 caaatcttta attgtaaaag aaatgctgta ctatttactg ttctagtac gggattaaac 8880  
 tgtattaatt ataaataaaa aataagtaca gttgtttaaa attatatttt gtattaaatc 8940  
 taatagtacg atgtaagtta ttttatacta ttgctagttt aataaaaaga ttttaattata 9000  
 tacttgaaaa ggagaggaac tcgagatggc agagtatata atagcagtag atgagttcga 9060  
 taacgaaata ggatcaatag aaaagatgga agctcataga aaaggaacac ttcatagagc 9120  
 attcagtatt ttagttttta actcaaagaa tcaactttta ttacagaaaa gaaatgtaaa 9180  
 gaaatatcac tctccaggat tatggacaaa cacttgttgt agtcacccaa gatatggtga 9240  
 atctcttcat gatgctatat acagaagatt aaaagaagag atgggattta cttgcgaact 9300  
 tgaagaagta ttctcattca tatataaggt aaaacttgaa gataatttat ttgagaatga 9360  
 atatgaccat gtatttattg gtaaatatga tggtgagata attgttaata aagatgaagt 9420  
 tgatgatttt aaatgggtag acattaatga agttaaaaag gacataatag aaagacctga 9480

ES 2 674 984 T3

ggcataact tactggttta agtatcttgt aaataaagct gaaaataaga tttttaaata 9540  
 aaccggtcag taacgaatag aattagaaaa acaaaggagg caagacaatg gatttcccac 9600  
 aacaattaga agcatgtgta aacagggcta atcaggcact tagtagattt attgctcctc 9660  
 ttccttttca aaatacacca gtagtagaaa ctatgcaata cgggtgcactt ttaggtggtgta 9720  
 aaagattaag accattctta gtatatgcta caggacacat gtttggtgta tcaactaata 9780  
 ctttagacgc tccagctgct gctgttgaat gtattcatgc ttattcttta atacatgatg 9840  
 acttaccagc aatggatgac gatgatttaa gaagaggttt acctacatgt catgttaaata 9900  
 ttggtgaagc taatgcaatt ttagcagggtg acgctttaca aacttttagct ttttctatac 9960  
 tttcagatgc agacatgcct gaagtttcag atagagatag aatttctatg atatcagagc 10020  
 ttgcatctgc atcaggaata gctggaatgt gcggtgggtca agcacttgat ttagatgcag 10080  
 aaggtaaaca cgtaccactt gatgcttttag agagaataca tagacataaa acagggtgctc 10140  
 ttataagagc agcagtaaga ttaggtgctt taagtgtctg tgacaagggg agaagagcac 10200  
 ttccagtact tgataagtat gcagaaagta taggattagc ttttcaagtt caagatgaca 10260  
 tacttgacgt tgttggtgat actgctactt taggaaaaag acagggtgca gatcagcaat 10320  
 taggaaaatc tacataccct gctttacttg gattagaaca ggctagaaag aaagcaagag 10380  
 acttaataga tgacgcaaga caaagtctta aacagttagc tgaacaatca cttgacacaa 10440  
 gtgcacttga agcacttga gattatatta tacagagaaa caagtaaaag cttttaaagg 10500  
 aggggaaaaa atggaattta gagtacattt acaggcagac aacgaacaga aaatatttca 10560  
 aatcaaagc aaaccagagc cagaagcatc atatcttata aatcaaagaa gaagtgtctaa 10620  
 ttataaacca aacatttggg aaaacgattt tcttgatcag tctttaatat caaaatatga 10680  
 tggatgatgaa tatagaaaac tttcagaaaa gttaatagaa gaagtaaaga tatacatatc 10740  
 agcagagact atggatttag ttgctaaatt agaacttata gattctgtta gaaaacttgg 10800  
 acttgctaat ctttttgaga aagaaataaa ggaagcatta gacagtatag cagcaataga 10860  
 atcagataat ttaggaacta gagacgatct ttatggaaca gctcttcatt ttaagattct 10920  
 tagacagcat ggatataagg taagtcaaga tatatttggg agatttatgg atgagaaagg 10980  
 aacattagaa aatcatcact ttgcacactt aaaaggaatg ttagaattat ttgaggcaag 11040  
 taatcttggg tttgaagggt aagacatatt agatgaagct aaagcatctc ttacacttgc 11100  
 tcttagagat tcaggacata tttgttatcc agactcaaac ttaagtagag atgtagttca 11160  
 tagtttagaa ttacctagtc atagaagagt tcaatgggtc gatgtaaaat ggcagattaa 11220  
 tgcatacgaa aaagatattt gtagagtaaa tgcaacttta ttagagttag caaagttaaa 11280  
 ttttaatggt gttcaagctc agcttcagaa gaatctttaga gaagctagta gatgggtggg 11340  
 taatcttggg ttcgcagata atttaaagtt tgctagagat agactttag agtggttttc 11400  
 atgcgcagta ggtgtagcat ttgaaccaga gcattcatct tttagaatat gtttaactaa 11460  
 ggtaattaat cttgttctta ttatagatga tglatacgat atatatggat ctgaagaaga 11520

ES 2 674 984 T3

gttaaaacat tttaacaaatg ctgttgatag atgggacagt agagaaacag aacagcttcc 11580  
 tgaatgcatg aaaatgtggt ttcaagtatt atataacact acttgcgaaa tagcaagaga 11640  
 gatagaagaa gaaaacgggt ggaatcaagt attacctcaa cttactaagg tttgggctga 11700  
 tttttgtaag gctcttttag ttgaagcaga gtggtacaat aaatcacata ttccaacatt 11760  
 agaagaatat cttagaaacg gatgtatatt aagtagtgta tctgtacttt tagttcactc 11820  
 tttcttttca ataactcatg aaggtacaaa agaaatggct gatttcttac ataaaaatga 11880  
 agatctttta tacaacataa gtcttatagt aagattaaac aatgatttag gtacatcagc 11940  
 tgctgaacag gaaagagggt attctccttc ttctatagtt tgctatatga gagaagttaa 12000  
 tgcttctgaa gagactgcaa gaaagaatat aaagggatg attgataatg cttggaaaaa 12060  
 ggtaaatgga aaatgtttca caactaacca agttccattt ctttcatcat tcatgaataa 12120  
 tgcaactaac atggcaagag tagcacactc attatataaa gacggtgatg gttttggtga 12180  
 tcaagaaaaa ggacctagaa cacatattct tagtttatta ttccaacctt tagtaaatta 12240  
 agctagcata aaaataagaa gcctgcattt gcaggcttct ttttttatg gcgcccgcc 12300  
 attatttttt tgaacaattg acaattcatt tcttattttt tattaagtga tagtcaaaag 12360  
 gcataacagt gctgaataga aagaaattta cagaaaagaa aattatagaa tttagtatga 12420  
 ttaattatac tcatattatga atgtttaatt gaatacaaaa aaaaataactt gttatgtatt 12480  
 caattacggg ttaaaatata gacaagttga aaaatttaat aaaaaataa gtcctcagct 12540  
 cttatatatt aagctaccaa cttagtatat aagccaaaac ttaaatgtgc taccaacaca 12600  
 tcaagccgtt agagaactct atctatagca atatttcaaa tgtaccgaca tacaagagaa 12660  
 acattaacta tatatattca atttatgaga ttatcttaac agatataaat gtaaattgca 12720  
 ataagtaaga tttagaagtt tatagccttt gtgtattgga agcagtacgc aaaggctttt 12780  
 ttatttgata aaaattagaa gtatatttat ttttccataa ttaatttatg aaaatgaaag 12840  
 ggggtgagca aagtgacaga ggaaagcagt atcttatcaa ataacaaggt attagcaata 12900  
 tcattattga ctttagcagt aaacattatg acttttatag tgcttgtagc taagtagtac 12960  
 gaaaggggga gctttaaaaa gctccttgga atacatagaa ttcataaatt aatttatgaa 13020  
 aagaagggcg tatatgaaaa cttgtaaaaa ttgcaaagag tttattaaag atactgaaat 13080  
 atgcaaaata cattcggtga tgattcatga taaaacagta gcaacctatt gcagtaaata 13140  
 caatgagtca agatgtttac ataaagggaa agtccaatgt attaattggt caaagatgaa 13200  
 ccgatatgga tgggtgcca taaaaatgag atgttttaca gaggaagaac agaaaaaaga 13260  
 acgtacatgc attaaatatt atgcaaggag ctttaaaaaa gctcatgtaa agaagagtaa 13320  
 aaagaaaaaa taattttattt attaatataa tattgagagt gccgacacag tatgactaa 13380  
 aaaatatatc tgtggtgtag tgagccgata caaaaggata gtcactcgca ttttcataat 13440  
 acatcttatg ttatgattat gtgtcgggtg gacttcacga cgaaaacca caataaaaaa 13500  
 agagttcggg gtaggggttaa gcatagttga ggcaactaaa caatcaagct aggatatgca 13560

ES 2 674 984 T3

gtagcagacc gtaaggtcgt tgtttagggtg tgttgtaata catacgctat taagatgtaa 13620  
 aaatacggat accaatgaag ggaaaagtat aatTTTTTgga tgtagtttgt ttgttcatct 13680  
 atgggcaaac tacgtccaaa gccgtttcca aatctgctaa aaagtatatc ctttctaaaa 13740  
 tcaaagtcaa gtatgaaatc ataaataaag tttaatTTTTg aagttattat gatattatgt 13800  
 ttttctatta aaataaatta agtatataga atagtTTaat aatagtatat acttaatgtg 13860  
 ataagtgtct gacagtgtca cagaaaggat gattgttatg gattataaagc ggccggccag 13920  
 tgggcaagtt gaaaaattca caaaaatgtg gtataatatic tttgttcatt agagcgataa 13980  
 acttgaatTT gagagggAAC ttagatggta tttgaaaaaa ttgataaaaa tagttggaac 14040  
 agaaaagagt attttgacca ctactTTgca agtgtacCTT gtacctacag catgaccgTT 14100  
 aaagtggata tcacacaaat aaaggaaaaag ggaatgaaac tatatcctgc aatgctttat 14160  
 tatattgcaa tgattgtaaa ccgccattca gagtttagga cggcaatcaa tcaagatggt 14220  
 gaattgggggA tatatgatga gatgatacca agctatacaa tatttcacaa tgatactgaa 14280  
 acattttcca gcctttggac tgagtgtAag tctgactTTa aatcattttt agcagattat 14340  
 gaaagtgata cgcaacggta tggaaacaat catagaatgg aaggaaagcc aaatgctccg 14400  
 gaaaacattt ttaatgtatc tatgataccg tggTcaacct tcgatggcTT taatctgaat 14460  
 ttgcgaaaag gatatgatta tttgattcct atttttacta tggggaaata ttataaagaa 14520  
 gatacaaaaa ttatacttcc tttggcaatt caagttcatc acgcagtatg tgacggattt 14580  
 cacatttgcc gttttgtaaa cgaattgcag gaattgataa atagttaact tcaggtttgt 14640  
 ctgtaactaa aaacaagtat ttaagcaaaa acatcgtaga aatacgggtgt tttttgttac 14700  
 cctaagttt 14709

<210> 60

<211> 601

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> híbrido de tipo II de metiltransferasa

<400> 60

Met Phe Pro Cys Asn Ala Tyr Ile Glu Tyr Gly Asp Lys Asn Met Asn  
 1 5 10 15

Ser Phe Ile Glu Asp Val Glu Gln Ile Tyr Asn Phe Ile Lys Lys Asn  
 20 25 30

Ile Asp Val Glu Glu Lys Met His Phe Ile Glu Thr Tyr Lys Gln Lys  
 35 40 45

Ser Asn Met Lys Lys Glu Ile Ser Phe Ser Glu Glu Tyr Tyr Lys Gln  
 50 55 60

10



ES 2 674 984 T3

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

ES 2 674 984 T3

Ser Glu Lys Cys Lys Lys Phe Ser Ile Ser Gln Lys Ser Ile Asn Asn  
340 345 350

Asp Gly Trp Val Phe Val Asp Glu Val Glu Lys Asn Ile Ile Asp Lys  
355 360 365

Ile Lys Glu Lys Ser Lys Phe Ile Leu Lys Asp Ile Cys His Ser Cys  
370 375 380

Gln Gly Ile Ile Thr Gly Cys Asp Arg Ala Phe Ile Val Asp Arg Asp  
385 390 395 400

Ile Ile Asn Ser Arg Lys Ile Glu Leu Arg Leu Ile Lys Pro Trp Ile  
405 410 415

Lys Ser Ser His Ile Arg Lys Asn Glu Val Ile Lys Gly Glu Lys Phe  
420 425 430

Ile Ile Tyr Ser Asn Leu Ile Glu Asn Glu Thr Glu Cys Pro Asn Ala  
435 440 445

Ile Lys Tyr Ile Glu Gln Tyr Lys Lys Arg Leu Met Glu Arg Arg Glu  
450 455 460

Cys Lys Lys Gly Thr Arg Lys Trp Tyr Glu Leu Gln Trp Gly Arg Lys  
465 470 475 480

Pro Glu Ile Phe Glu Glu Lys Lys Ile Val Phe Pro Tyr Lys Ser Cys  
485 490 495

Asp Asn Arg Phe Ala Leu Asp Lys Gly Ser Tyr Phe Ser Ala Asp Ile  
500 505 510

Tyr Ser Leu Val Leu Lys Lys Asn Val Pro Phe Thr Tyr Glu Ile Leu  
515 520 525

Leu Asn Ile Leu Asn Ser Pro Leu Tyr Glu Phe Tyr Phe Lys Thr Phe  
530 535 540

Ala Lys Lys Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Glu Tyr Tyr Pro Asn Asn Leu  
545 550 555 560

Met Lys Leu Cys Ile Pro Ser Ile Asp Phe Gly Gly Glu Asn Asn Ile  
565 570 575

Glu Lys Lys Leu Tyr Asp Phe Phe Gly Leu Thr Asp Lys Glu Ile Glu  
580 585 590

Ile val Glu Lys Ile Lys Asp Asn Cys  
595 600

<210> 61

<211> 419

<212> ADN

5 <213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 674 984 T3

	<400> 61		
	agaaattttc ctttctaaaa tttttattc catgtcaaga actctgttta tttcattaaa	60	
	gaactataag tacaaagtat aaggcatttg aaaaaatagg ctagtatatt gattgattat	120	
	ttattttaaa atgcctaagt gaaatatata catattataa caataaaaata agtattagtg	180	
	taggatTTTT aaatagagta tctattttca gattaaattt ttgattattt gatttacatt	240	
	atataatatt gagtaaagta ttgactagca aaatTTTTtg atactttaat ttgtgaaatt	300	
	tcttatcaaa agttatattt ttgaataatt tttattgaaa aatacaacta aaaaggatta	360	
	tagtataagt gtgtgtaatt ttgtgttaaa tttaaagga ggaatgaac atgaaattg	419	
	<210> 62		
	<211> 567		
5	<212> ADN		
	<213> Clostridium autoethanogenum		
	<400> 62		
	ctcctaattt tgaaatctaa tatatctatt aaatcatatt ttcatatgta aataaataag	60	
	tttttatgca attttgaaaa aggtatttgc ataaaacggc ttgaaatcaa tagttaacgc	120	
	aatagttatt ctttttagcat acattaagtc aacaaaatta gcatgtaata attatgaata	180	
	attattacat atattcaata ttatattaaa aaaataactt tgttttaagt ataaagtaaa	240	
	aaaataggca taaatgtaac aaaaactggt aatTTTTtgt gtcaataatt tttgttatat	300	
	tattttaatt aaatTTTTca catgtataat taaaagtaag atagatattc taatgtactt	360	
	acttaggtag aaaaacatgt atacaaaatt aaaaaactat tataacacat agtatcaata	420	
	ttgaaggtaa tactgttcaa tatcgataca gataaaaaaa atatataata cagaagaaaa	480	
	aattataaat ttgtggtata atataaagta tagtaattta agtttaaacc tcgtgaaaac	540	
	gctaacaat aataggaggt gtattat	567	
	<210> 63		
10	<211> 1806		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> híbrido de tipo II de metiltransferas		
15	<400> 63		
	atgtttccgt gcaatgccta tatcgaatat ggtgataaaa atatgaacag ctttatcgaa	60	
	gatgtggaac agatctacaa cttcattaaa aagaacattg atgtggaaga aaagatgcat	120	
	ttcattgaaa cctataaaca gaaaagcaac atgaagaaag agattagctt tagcgaagaa	180	
	tactataaac agaagattat gaacggcaaa aatggcgttg tgtacacccc gccggaaatg	240	
	gcgcccttta tggttaaaaa tctgatcaac gttaacgatg ttattggcaa tccgtttatt	300	
	aaaatcattg acccgagctg cggtagcggc aatctgattt gcaaatgttt tctgtatctg	360	

ES 2 674 984 T3

aatcgcatct ttattaagaa cattgagggtg attaacagca aaaataacct gaatctgaaa 420  
 ctggaagaca tcagctacca catcgttcgc aacaatctgt ttggcttcga tattgacgaa 480  
 accgcgatca aagtgctgaa aattgatctg tttctgatca gcaaccaatt tagcgagaaa 540  
 aatttccagg ttaaagactt tctgggtgaa aatattgatc gcaaatatga cgtgttcatt 600  
 ggtaatccgc cgtatatcgg tcacaaaagc gtggacagca gctacagcta cgtgctgctc 660  
 aaaatctacg gcagcatcta ccgcgacaaa ggcgatatca gctattgttt ctttcagaag 720  
 agcctgaaat gtctgaagga aggtggcaaa ctggtgtttg tgaccagccg ctacttctgc 780  
 gagagctgca gcggtaaaga actgcgtaaa ttctgatcgc aaaacacgag catttacaag 840  
 atcattgatt tttacggcat ccgcccgttc aaacgcgtgg gtatcgatcc gatgattatt 900  
 tttctggttc gtacgaagaa ctggaacaat aacattgaaa ttattcggcc gaacaagatt 960  
 gaaaagaacg aaaagaacaa attcctggat agcctgttcc tggacaaaag cgaaaagtgt 1020  
 aaaaagttta gcattagcca gaaaagcatt aataacgatg gctgggtttt cgtggacgaa 1080  
 gtggagaaaa acattatcga caaaatcaaa gagaaaagca agttcattct gaaagatatt 1140  
 tgccatagct gtcaaggcat tatcaccggt tgtgatcgcg cctttattgt ggaccgtgat 1200  
 atcatcaata gccgtaagat cgaactgcgt ctgattaaac cgtggattaa aagcagccat 1260  
 atccgtaaga atgaagtat taagggcgaa aaattcatca tctatagcaa cctgattgag 1320  
 aatgaaaccg agtgtccgaa tgcgattaaa tatatcgaac agtacaagaa acgtctgatg 1380  
 gagcgcgcg aatgcaaaaa gggcacgcgt aagtggatg aactgcaatg gggccgtaaa 1440  
 ccggaaatct tcgaagaaaa gaaaattgtt ttcccgata aaagctgtga caatcgtttt 1500  
 gcactggata agggtagcta ttttagcgca gacatttata gcctggttct gaagaaaaat 1560  
 gtgccgttca cctatgagat cctgctgaat atcctgaata gcccgtgta cgagttttac 1620  
 ttttagacct tcgcgaaaaa gctgggagag aatctgtacg agtactatcc gaacaacctg 1680  
 atgaagctgt gcatcccgag catcgatttc ggcggtgaga acaatattga gaaaaagctg 1740  
 tatgatttct ttggtctgac ggataaagaa attgagattg tggagaagat caaagataac 1800  
 tgctaa 1806

<210> 64  
 <211> 4709  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> plásmido de metilación diseñado

<400> 64  
 gtttgccacc tgacgtctaa gaaaaggaat attcagcaat ttgcccgtgc cgaagaaagg 60  
 cccacccgtg aaggtgagcc agtgagttga ttgctacgta attagttagt tagcccttag 120  
 tgactcgtaa tacgactcac tatagggctc gaggcggccg cgcaacgcaa ttaatgtgag 180  
 ttagctcact cattagcac cccaggcttt acactttatg ctccggctc gtatgttgtg 240

5

10

ES 2 674 984 T3

tgggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacaca tatgtttccg tgcaatgcct 300  
 atatcgaata tggtgataaa aatatgaaca gctttatcga agatgtggaa cagatctaca 360  
 acttcattaa aaagaacatt gatgtggaag aaaagatgca tttcattgaa acctataaac 420  
 agaaaagcaa catgaagaaa gagattagct ttagcgaaga atactataaa cagaagatta 480  
 tgaacggcaa aaatggcggt gtgtacacc cgcggaaat ggcgcccttt atggttaaaa 540  
 atctgatcaa cgtaacgat gttattggca atccgtttat taaaatcatt gacccgagct 600  
 gcggtagcgg caatctgatt tgcaaatggt ttctgtatct gaatcgcac tttattaaga 660  
 acattgaggt gattaacagc aaaaataacc tgaatctgaa actggaagac atcagctacc 720  
 acatcgctcg caacaatctg tttggcttcg atattgacga aaccgcgac aaagtgtctga 780  
 aaattgatct gtttctgac agcaaccaat ttagcgagaa aaatttccag gttaaagact 840  
 ttctggtgga aaatattgat cgcaaatatg acgtgttcat tggtaatccg ccgtatatcg 900  
 gtcacaaaag cgtggacagc agctacagct acgtgctgcg caaaatctac ggcagcatct 960  
 accgcgacaa aggcgatatc agctattggt tctttcagaa gagcctgaaa tgtctgaagg 1020  
 aaggtggcaa actggtgttt gtgaccagcc gctacttctg cgagagctgc agcggtaaag 1080  
 aactgcgtaa attcctgac gaaaacacga gcatttaca gatcattgat ttttacggca 1140  
 tccgccggtt caaacgcgtg ggtatcgatc cgatgattat ttttctgggt cgtacgaaga 1200  
 actggaacaa taacattgaa attattcgcc cgaacaagat tgaaaagaac gaaaagaaca 1260  
 aattcctgga tagcctgttc ctggacaaaa gcgaaaagtg taaaagttt agcattagcc 1320  
 agaaaagcat taataacgat ggctgggttt tcgtggacga agtggagaaa aacattatcg 1380  
 acaaaatcaa agagaaaagc aagttcattc tgaagatat ttgccatagc tgtcaaggca 1440  
 ttatcaccgg ttgtgatcgc gcccttattg tggaccgtga tatcatcaat agccgtaaga 1500  
 tcgaactgcg tctgattaaa ccgtggatta aaagcagcca tatccgtaag aatgaagtta 1560  
 ttaagggcga aaaattcacc atctatagca acctgattga gaatgaaacc gagtgccga 1620  
 atgcgattaa atatatcgaa cagtacaaga aacgtctgat ggagcgcgc gaatgcaaaa 1680  
 agggcacgcg taagtggat gaactgcaat ggggccgtaa accggaaatc ttcgaagaaa 1740  
 agaaaattgt tttcccgat aaaagctgtg acaatcgttt tgcactggat aagggtagct 1800  
 attttagcgc agacatttat agcctggttc tgaagaaaaa tgtgccgttc acctatgaga 1860  
 tcctgctgaa tatcctgaat agcccgtgt acgagtttta cttaagacc ttcgcgaaaa 1920  
 agctgggcga gaatctgtac gagtactatc cgaacaacct gatgaagctg tgcacccga 1980  
 gcatcgattt cggcggtgag aacaatattg agaaaaagct gtatgatttc tttggtctga 2040  
 cggataaaga aattgagatt gtggagaaga tcaaagataa ctgctaagaa ttcgatatca 2100  
 cccgggaact agtctgcagc cctttagtga gggtaattg gagtcaactaa gggttagtta 2160  
 gttagattag cagaaagtca aaagcctccg accggaggct tttgactaaa acttccttg 2220  
 gggttatcat tggggctcac tcaaaggcgg taatcagata aaaaaatcc ttagctttcg 2280

ES 2 674 984 T3

ctaaggatga tttctgctag agatggaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga 2340  
 ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt 2400  
 gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggttaagcc ctcccgtatc 2460  
 gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct 2520  
 gagataggty cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata 2580  
 ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt 2640  
 gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc 2700  
 ttaataagat gatcttcttg agatcgtttt ggtctgcgcg taatctcttg ctctgaaaac 2760  
 gaaaaaacgg ccttgacggg cggtttttcg aaggttctct gagctaccaa ctctttgaac 2820  
 cgaggtaact ggcttgagg agcgcagtc ccaaaacttg tcctttcagt ttagccttaa 2880  
 ccggcgcgatg acttcaagac taactcctct aatcaatta ccagtggctg ctgccagtgg 2940  
 tgcttttgca tgtctttccg ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 3000  
 gtcggactga acggggggtt cgtgcataca gtccagcttg gagcgaactg cctaccggga 3060  
 actgagtgtc agcgtggaa tgagacaaac gcggccataa cagcggaatg acaccggtaa 3120  
 accgaaaggc aggaacagga gagcgcacga gggagccgcc aggggaaacg cctggtatct 3180  
 ttatagtctt gtcgggtttc gccaccactg atttgagcgt cagatttcgt gatgcttgtc 3240  
 aggggggagg agcctatgga aaaacggctt tgccgcggcc ctctcacttc cctgttaagt 3300  
 atcttctggt catcttccag gaaatctccg ccccgttcgt aagccatttc cgctcgccgc 3360  
 agtcgaacga ccgagcgtag cgagtcagtg agcaggaag cggaaatata cctgtatcac 3420  
 atattctgct gacgcaccgg tgcagccttt tttctctgc cacatgaagc acttactga 3480  
 caccctcatc agtgccaaca tagtaagcca gtatacactc cgctagcgt gaggtctgcc 3540  
 tcgtgaagaa ggtgttgctg actcatacca ggcctgaatc gccccatcat ccagccagaa 3600  
 agtgaggag ccacggttga tgagagcttt gttgtaggtg gaccagttgg tgattttgaa 3660  
 cttttgcttt gccacggaac ggtctgcggt gtcgggaaga tgcgtgatct gatccttcaa 3720  
 ctgagcaaaa gttcgattta ttcaacaaag ccacgttggt tctcaaaatc tctgatgta 3780  
 cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg aacaataaaa ctgtctgctt acataaacag 3840  
 taatacaagg ggtgtttact agaggttgat cgggcacgta agaggttcca actttacca 3900  
 taatgaaata agatcactac cgggcgtatt ttttgagta tcgagatttt caggagctaa 3960  
 ggaagctaaa atggagaaaa aatcacggg atataccacc gttgatataat cccaatggca 4020  
 tcgtaaagaa cattttgagg catttcagtc agttgtcctaa tgtacctata accagaccgt 4080  
 tcagctggat attacggcct ttttaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc 4140  
 ggcctttatt cacattcttg cccgcctgat gaacgctcac ccggagtttc gtatggccat 4200  
 gaaagacggg gagctggtga tctgggatag tgttcacctt tgttacaccg ttttccatga 4260  
 gcaaaactgaa acgttttcgt ccctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct 4320  
 ccacatatat tcgcaagatg tggcgtgtta cgtgaaaac ctggcctatt tcctaaagg 4380  
 gtttattgag aatatgtttt ttgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga 4440  
 tttaaacgtg gccaatatgg acaacttctt cgccccctt ttcacgatgg gcaaatatta 4500  
 tacgcaaggc gacaagggtc tgatgccgct ggcgatccag gttcatcatg ccgtttgta 4560  
 tggcttccat gtcggccgca tgcttaatga attacaacag tactgtgatg agtggcaggg 4620  
 cggggcgtaa taactatagc tccggcaaaa aaacgggcaa ggtgtcacca ccctgccctt 4680  
 tttctttaa accgaaaaga ttacttcgc 4709

<210> 65  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> oligonucleótido colE1-F

<400> 65  
 cgtcagaccc cgtagaaa 18

10 <210> 66  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido colE1-R

15 <400> 66  
 ctctcctgtt ccgacct 18

<210> 67  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> oligonucleótido fD1

<400> 67  
 ccgaattcgt cgacaacaga gttgatcct ggctcag 37

25 <210> 68  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido Rp2

30 <400> 68  
 cccgggatcc aagcttacgg ctacctgtt acgact 37

<210> 69  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> oligonucleótido ispS-F

<400> 69  
 aggctgaatt tcttacctt cttga 25

<210> 70  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> oligonucleótido ispS-R

<400> 70  
 gtaactccat caaatcctcc actac 25

50 <210> 71  
 <211> 25

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido idi-F  
 5 <400> 71  
 atacgtgctg tagtcatcca agata 25  
  
 <210> 72  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido idiR  
  
 <400> 72  
 tcttcaagtt cacatgtaaa accca 25  
 15 <210> 73  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> oligonucleótido dxs-F  
  
 <400> 73  
 acaaagtatc taagacagga ggtca 25  
  
 <210> 74  
 <211> 25  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido dxs-R  
  
 <400> 74  
 30 gatgtcccac atcccatata agttt 25  
  
 <210> 75  
 <211> 6018  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> plásmido pMTL85246-ispS-idi



ES 2 674 984 T3

<400> 75

ccggggatcc tctagagtcg acgtcacgcg tccatggaga tctcgaggcc tgcagacatg	60
caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacct	120
aacttaatcg ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc	180
gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc tagcataaaa	240
ataagaagcc tgcatttgca ggcttcttat ttttatggcg cgccgattc acttcttttc	300
tatataaata tgagcgaagc gaataagcgt cggaaaagca gcaaaaagtt tcctttttgc	360
tgttggagca tgggggttca gggggtgacg tatctgacgt caatgccgag cgaaagcgag	420
ccgaagggtg gcatttacgt tagataacct cctgatatgc tccgacgctt tatatagaaa	480
agaagattca actaggtaaa atcttaatat aggttgagat gataaggttt ataaggaatt	540
tgtttgttct aatttttcac tcattttggt ctaatttctt ttaacaaatg ttcttttttt	600
tttagaacag ttatgatata gttagaatag tttaaaataa ggagtggagaa aaagatgaaa	660
gaaagatatg gaacagtcta taaaggctct cagaggctca tagacgaaga aagtggagaa	720
gtcatagagg tagacaagtt ataccgtaaa caaacgtctg gtaacttcgt aaaggcatat	780
atagtgcaat taataagtat gttagatatg attggcggaa aaaaacttaa aatcgttaac	840
tatatcctag ataatgtcca cttaagtaac aatacaatga tagctacaac aagagaaata	900
gcaaaagcta caggaacaag tctacaaca gtaataaca cacttaaaat cttagaagaa	960
ggaaatatta taaaagaaa aactggagta ttaatgttaa accctgaact actaatgaga	1020
ggcgcgacc aaaaacaaaa atacctcta ctcgaatttg ggaactttga gcaagaggca	1080
aatgaaatag attgacctcc caataacacc acgtagtat tgggagggtca atctatgaaa	1140
tcgattaag ggccggccga agcaaaacta agagtgtggt gatagtgcag tatcttaaaa	1200
ttttgtataa taggaattga agttaaatta gatgctaaaa atttgaatt aagaaggagt	1260
gattacatga acaaaaatat aaaatattct caaaactttt taacgagtga aaaagtactc	1320
aaccaataa taaaacaatt gaatttaaaa gaaaccgata ccgtttacga aattggaaca	1380
ggtaaagggc atttaacgac gaaactggct aaaataagta aacaggtaac gtctattgaa	1440
ttagacagtc atctattcaa cttatcgtca gaaaaattaa aactgaatac tcgtgtcact	1500
ttaattcacc aagatattct acagtttcaa ttccctaaca aacagaggta taaaattggt	1560
gggagtattc cttaccattt aagcacacaa attattaataa aagtggtttt tgaaagccat	1620
gcgtctgaca tctatctgat tgttgaagaa ggattctaca agcgtacctt ggatattcac	1680
cgaacactag ggttgctctt gcacactcaa gtctcgattc agcaattgct taagctgcca	1740
gcggaatgct ttcacctaata accaaaagta aacagtgtct taataaaact taccgcat	1800

ES 2 674 984 T3

accacagatg ttccagataa atattggaag ctatatacgt actttgtttc aaaatgggtc 1860  
 aatcgagaat atcgtcaact gtttactaaa aatcagtttc atcaagcaat gaaacacgcc 1920  
 aaagtaaaca atttaagtac cgttacttat gagcaagtat tgtctatfff taatagtat 1980  
 ctattattta acgggaggaa ataattctat gagtgcgttt tgtaaatttg gaaagttaca 2040  
 cgttactaaa gggaatgtgt ttaaactcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta 2100  
 acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg 2160  
 agatcctfff tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc 2220  
 ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcctfff ccgaaggtaa ctggcttcag 2280  
 cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa 2340  
 gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc 2400  
 cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc 2460  
 gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta 2520  
 caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag 2580  
 aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca cgagggagct 2640  
 tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttcgcacc tctgacttga 2700  
 gcgtcgatff ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 2760  
 ggctttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttctc cacatgttct ttcctgcgtt 2820  
 atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcttttag tgagctgata ccgctcgcg 2880  
 cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg 2940  
 cagggccccc tgcaggataa aaaaattgta gataaatttt ataaaaatag tttatctaca 3000  
 atttttttat caggaaacag ctatgaccgc ggccgcgggt aatgttaaaa atttatagta 3060  
 taactttaaa aaactgtctt aaaaagtgtt tatataaaaa atgttgacaa ttaaacagct 3120  
 atttagtgca aaacaacat aaaaatttaa aaaataccat aaattacttg aaaaatagtt 3180  
 gataataatg tagagttata aacaaagggt aaaagcatta cttgtattct tttttatata 3240  
 ttattataaa ttaaaatgaa gctgtattag aaaaaataca cacctgtaat ataaaaattt 3300  
 aaattaatff ttaatttttt caaaatgtat tttacatgtt tagaattttg atgtatatta 3360  
 aaatagtaga atacataaga tacttaatff aattaaagat agttaagtac ttttcaatgt 3420  
 gcttttttag atgtttaata caaatcttta attgtaaaag aatgctgta ctatttactg 3480  
 tactagtjac gggattaaac tgtattaatt ataaataaaa aataagtaca gttgtttaaa 3540  
 attatattff gtattaaatc taatagtacg atgtaagtta ttttatacta ttgctagttt 3600  
 aataaaaaga ttttaattata tacttgaaaa ggagaggaat ttttatgcgt catatggcaa 3660  
 cagaattatt atgtttacac agacctatat cacttactca caaacttttt aggaatccat 3720  
 tacctaaagt tattcaagct acacctttaa cattaaaact taggtgtagt gtttctacag 3780  
 aaaatgtatc atttagttag acagaaactg aaacaagaag atcagcaaat tatgaaccaa 3840

ES 2 674 984 T3

attcttggga ttatgattat cttctttctt ctgatactga tgagtcaata gaagtacata 3900  
 aagataaggc taagaaatta gaagctgaag ttaggagaga aataaataat gagaaggctg 3960  
 aatttcttac acttcttgaa cttattgata atgtacaaag acttggatta ggatatagat 4020  
 ttgagtctga tataagaaga gcattagata gatttgtaag tagtggagga tttgatggag 4080  
 ttactaaaac ttacattacat ggaacagcat tatcatttag gttattaagg caacatgggt 4140  
 ttgaagtatc tcaagaagct tttagtggat ttaaagatca gaatggaaac tttcttgaga 4200  
 atttaaagga agacataaaa gcaattcttt ctctttatga agcatcattt ttagcattag 4260  
 aagggtgagaa tatatttagat gaggctaaag tatttgcaat atctcatctt aaagaactta 4320  
 gtgaagaaaa gattggtaaa gaattagctg aacaagtttc acatgcttta gaattaccat 4380  
 tacatagaag aacacaaaga ttagaagcag tttggtaaat agaagcatat agaaagaaa 4440  
 aagacgcaaa tcaagtactt ttagaacttg caatacttga ctacaatatg attcaaagtg 4500  
 tatacagag ggatttaaga gaaacatcaa gatggtggag aagagtagga ttagcaacta 4560  
 aattacattt tgctagagat aggcttattg aaagttttta ttgggctggt ggagttgctt 4620  
 ttgaaccaca atattctgat tgcagaaata gtgtagcaaa gatgttttca tttgttacta 4680  
 taattgacga tatttacgat gtatatggaa ctttagatga acttgaactt tttactgatg 4740  
 cagttgaaag atgggatgta aatgctatta atgatcttc tgattatatg aagttatggt 4800  
 ttcttgcact ttacaatact attaacgaga tagcttacga taacttaaaa gataaagggtg 4860  
 agaacatact tccttattta acaaaagcat gggcagattt atgtaatgca tttcttcaag 4920  
 aagctaagtg gctttataat aatcaacac ctacatttga tgattatfff ggaaatgcat 4980  
 ggaaaagttc tagtggacct ttacagctta tttttgctta ttttgctgta gtacagaaca 5040  
 ttaaaaagga agagattgag aatcttcaga aatatcatga cataatatca agacctagtc 5100  
 acatttttag gctttgtaat gatttagcat ctgcttcagc agaaatagca agaggtgaaa 5160  
 ctgctaattc tgtaagttgt tatatgagaa caaaaggtat atctgaagaa ttagctactg 5220  
 aaagtgttat gaatcttata gacgaaactt ggaagaaaat gaacaaagaa aaacttggtg 5280  
 gatctttatt tgcaaaacct tttgttgaga ctgctataaa tttagctaga cagtctcatt 5340  
 gcacatatca taatggtgat gcacatacta gtccagatga attactagg aaaagagtac 5400  
 ttagtgtaat aactgaacca atattaccat ttgaaagata agaattcgag ctcgaaaggg 5460  
 gaaattaaat ggcagaatat ataatagctg tagatgaatt tgataacgaa ataggttcaa 5520  
 ttgaaaaaat ggaggctcac cgtaaaggaa cattacatag agctttttct atattagtat 5580  
 ttaattctaa aatcaattg ttattacaga aaagaaatgt aaaaaaatat cattcgctg 5640  
 gtctctggac aaatacgtgc tgtagtcatc caagatacgg tgaaagtta catgatgca 5700  
 tttatagaag gcttaaggaa gaaatgggtt ttacatgtga acttgaagaa gtatttagtt 5760  
 ttatttataa agtaaaactt gaagataatc tttttgaaa tgaatatgat catgtattca 5820  
 ttgggaaata tgatggagaa ataattgtaa acaagatga agtagatgat ttaagtggg 5880  
 ttgatattaa tgaggttaag aaggatatta tagaaaggcc agaagcatac acttattggt 5940  
 tcaagtattt agttaataag gcagaaaaca aatatttaa ataagtaaga atttcgtcta 6000  
 aataaagatt tggggtac 6018

- 5 <210> 76
- <211> 6909
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 674 984 T3

<220>

<223> plásmido pMTL 82151-Patp-HMGR

<400> 76

cctgcaggat aaaaaaattg tagataaatt ttataaaata gttttatcta caatTTTTTT	60
atcaggaaac agctatgacc gcggccgctg tatccatag accatgatta cgaattcgag	120
ctcgttataa ttttcaattt tcattctttt taaaggagat tagcatacat tttatcataa	180
ttatacagac aatatagtaa tatatgatgt taaaatatca atatatggtt aaaaatctgt	240
atattTTTTT ccattttaat tttttgtact ataataattac actgagtgta ttgcatattt	300
aaaaaatatt tggtaacaatt agttagttaa ataaattcta aattgtaaat tadcagaatc	360
cttattaagg aaatacatag atttaaggag aaatcataaa aagggtgtaat ataaactggc	420
taaaattgag caaaaattga gcaattaaga ctttttgatt gtatcttttt atatatttaa	480
ggtatataat cttatttata ttgggggaag gtaccatgca atcattagac aaaaatttca	540
gacatttatc aagacaacaa aagttacaac aattagttga taaacagtgg ctttcagaag	600
atcagtttga ttttttactt aatcatctc ttatagatga agaagttgct aatagtccta	660
tagaaaatgt aattgcacag ggtgcattac cagttggact tcttcctaata ataatagttg	720
atgataaggc ttatgttga ccaatgatgg ttgaagaacc tagtgttggt gcagctgcat	780
cttatggtgc taaattagta aatcagacag gtggatttaa aactgtatca tcagaaagaa	840
taatgattgg acagatagta tttgatggtg tagatgacac tgaaaaatta agtgcagata	900
ttaaagcatt agaaaaacaa atacataaga ttgcagatga agcatatcct agtataaaaag	960
caagaggtgg tggttatcaa agaatagcaa tagatacatt tccagagcaa caacttttaa	1020
gtcctaaggt atttgtagat acaaaagatg ctatgggtgc taatatgctt aatactatac	1080
ttgaggcaat aactgcattc cttaaaaatg aatctcctca atcagatata ttaatgtcta	1140
tactttcaaa ccatgcaact gctagtgtag taaaagtaca aggtgagata gatgtaaaag	1200
atcttgctag aggtgaaaga acaggtgaag aagtagctaa gagaatggaa agagcttctg	1260
tattagctca ggttgatatt catagagctg caacacataa caaagggtgt atgaatggaa	1320
tacatgctgt tgtttttagct acaggaaatg atactagagg tgctgaagca tctgcacatg	1380
catacgcatc aagagacgga caatatagag gtatagcaac ttggagatat gatcagaaga	1440
gacaaagact tattggaact attgaagttc caatgacact tgctatagta ggtgggtgta	1500
ctaaagtatt accaatagct aaggcatcat tagagttatt aaatgttgat tctgcacaag	1560

5

ES 2 674 984 T3

aacttggaca cgtagttgct gctgttggat tagcacaaaa ctttgctgct tgtagagcac 1620  
ttgtttctga aggtattcaa caaggacaca tgtcattaca atataaaagt ttagcaatag 1680  
tagtaggtgc aaaaggtgac gagatagcac aagtagcaga agctcttaa caggaaccaa 1740  
gagctaatac acaggttgct gaaagaattt tacaggaaat tagacagcaa taatctagag 1800  
tcgacgtcac gcgtccatgg agatctcgag gcctgcagac atgcaagctt ggcaactggc 1860  
gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta cccaacttaa tcgccttgca 1920  
gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc 1980  
caacagtgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgctagcata aaaataagaa gcctgcattt 2040  
gcaggcttct tatttttatg gcgcccgtt ctgaatcctt agctaattgg tcaacaggta 2100  
actatgacga agatagcacc ctggataagt ctgtaatgga ttctaaggca tttaatgaag 2160  
acgtgtatat aaaatgtgct aatgaaaaag aaaatgcggt aaaagagcct aaaatgagtt 2220  
caaatggttt tgaaattgat tggtagttta atttaataata tttttctat tggctatctc 2280  
gataacctata gaatctctg ttcacttttg tttttgaaat ataaaaagg gctttttagc 2340  
ccctttttt taaaactccg gaggagtttc ttcattcttg atactatacg taactatttt 2400  
cgatttgact tcattgtcaa ttaagctagt aaaatcaatg gttaaaaaac aaaaaactg 2460  
catttttcta ctagtaatt tataatttta agtgtcagat ttaaaagtat aatttaccag 2520  
gaaaggagca agttttttaa taaggaaaaa ttttccctt taaaattcta tttcgttata 2580  
tgactaatta taatcaaaaa aatgaaaata aacaagaggt aaaaactgct ttagagaaat 2640  
gtactgataa aaaaagaaaa aatcctagat ttacgtcata catagcacct ttaactacta 2700  
agaaaaatat tgaaaggact tccacttgtg gagattattt gtttatgttg agtgatgag 2760  
acttagaaca ttttaatta cataaaggta attttgcgg taatagattt tgtccaatgt 2820  
gtagtggcg acttgcttgt aaggatagtt tagaaatate tattcttatg gagcatttaa 2880  
gaaaagaaga aaataaagag tttatattt taactcttac aactccaaat gtaaaaagtt 2940  
atgatcttaa ttattctatt aaacaatata ataaatctt taaaaatta atggagcgta 3000  
aggaagttaa ggatataact aaaggttata taagaaaatt agaagtaact taccaaaagg 3060  
aaaaatacat aacaaaggat ttatggaaa taaaaaaga ttattatcaa aaaaaggac 3120  
ttgaaattgg tgatttagaa cctaattttg atacttataa tcctcatttt catgtagtta 3180  
ttgcagttaa taaaagttat ttacagata aaaattatta tataaatcga gaaagatgg 3240  
tggaattatg gaagtttgc actaaggatg attctataac tcaagttgat gttagaaaag 3300  
caaaaattaa tgattataaa gaggtttacg aacttgcgaa atattcagct aaagacactg 3360  
attatttaat atcgaggcca gtatttgaaa tttttataa agcattaaaa ggcaagcagg 3420  
tattagtttt tagtggattt tttaaagatg cacacaaatt gtacaagcaa ggaaaacttg 3480  
atgtttataa aaagaaagat gaattaaat atgtctatat agtttattat aattggtgca 3540  
aaaaacaata tgaaaaaact agaataaggg aacttacgga agatgaaaa gaagaattaa 3600

ES 2 674 984 T3

atcaagattt aatagatgaa atagaaatag attaaagtgt aactataactt tatatatata	3660
tgattaaaaa aataaaaaac aacagcctat taggttgttg ttttttattt tctttattaa	3720
tttttttaat ttttagtttt tagtttcttt ttaaataag tttcagcctc tttttcaata	3780
ttttttaaag aaggagtatt tgcataaatt gccttttttc taacagactt aggaaatatt	3840
ttaacagtat cttcttgccg cgggtgatttt ggaacttcat aacttactaa tttataatta	3900
ttattttctt ttttaattgt aacagttgca aaagaagctg aacctgttcc ttcaactagt	3960
ttatcatctt caatataata ttcttgacct atatagtata aatataattt tattatattt	4020
ttactttttt ctgaatctat tttttataa tcataaaaag ttttaccacc aaaagaaggt	4080
tgtactcctt ctggtccaac atattttttt actatattat ctaaataatt tttgggaact	4140
ggtgttgtaa tttgattaat cgaacaacca gttatactta aaggaattat aactataaaa	4200
atatatagga ttatcttttt aaatttcatt attggcctcc tttttattaa atttatgta	4260
ccataaaaag gacataacgg gaatatgtag aatattttta atgtagacaa aattttacat	4320
aaataaaaag aaaggaagtg tttgtttaaa ttttatagca aactatcaaa aattaggggg	4380
ataaaaattt atgaaaaaaa ggttttcgat gttattttta tgtttaactt taatagtttg	4440
tggtttattt acaaattcgg ccggccagtg ggcaagttga aaaattcaca aaaatgtggt	4500
ataatatctt tgttcattag agcgataaac ttgaatttga gaggggaactt agatggtatt	4560
tgaaaaaatt gataaaaata gttggaacag aaaagagtat tttgaccact actttgcaag	4620
tgtaccttgt acctacagca tgaccgttaa agtggatata acacaaataa aggaaaaggg	4680
aatgaaacta tatcctgcaa tgcctttatta tattgcaatg attgtaaacc gccattcaga	4740
gtttaggacg gcaatcaatc aagatggtga attggggata tatgatgaga tgataccaag	4800
ctatacaata tttcacaatg atactgaaac attttccagc ctttggactg agtgtaagtc	4860
tgactttaaa tcatttttag cagattatga aagtgatacg caacggtagt gaaacaatca	4920
tagaatggaa ggaaagccaa atgctccgga aaacattttt aatgtatcta tgataccgtg	4980
gtcaaccctc gatggcttta atctgaattt gcagaaagga tatgattatt tgattcctat	5040
ttttactatg gggaaatatt ataaagaaga taacaaaatt atacttcctt tggcaattca	5100
agttcatcac gcagtatgtg acggatttca catttgccgt tttgtaaacg aattgcagga	5160
attgataaat agttaacttc aggtttgtct gtaactaaaa acaagtattt aagcaaaaac	5220
atcgtagaaa tacggtgttt tttgttacc taagttaaa ctcctttttg ataattctcat	5280
gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccaactgagcg tcagaccccg tagaaaagat	5340
caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa	5400
accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa	5460
ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactggt cttctagtgt agccgtagtt	5520
aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctggt	5580
accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata	5640

ES 2 674 984 T3

gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt 5700  
 ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac 5760  
 gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga 5820  
 gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg 5880  
 ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa 5940  
 aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat 6000  
 gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc 6060  
 tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcagc tcagtgagcg aggaagcgga 6120  
 agagcgccca atacgcaggg cccctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcggata 6180  
 tccatccttt ttcgcacgat atacaggatt ttgccaaagg gttcgtgtag actttccttg 6240  
 gtgtatccaa cggcgtcagc cgggcaggat aggtgaagta ggcccaccg cgagcgggtg 6300  
 ttccttcttc actgtccctt attcgcacct ggcggtgctc aacgggaatc ctgctctgcg 6360  
 aggctggccg gctaccgccg gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa 6420  
 gccaaccagg aagggcagcc cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc 6480  
 gattgaggaa aaggcggcgg cggccggcat gacctgtcg gcctacctgc tggccgctcg 6540  
 ccagggctac aaaatcacgg gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcct 6600  
 caatggcgac ctgggcccgc tgggcccct gctgaaactc tggctcaccg acgaccgcg 6660  
 cacggcgcgg ttcgggtgat ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca 6720  
 ggacgagctt ggcaaggcca tgatgggctg ggtccgcccg agggcagagc catgactttt 6780  
 ttagccgcta aaacggccgg ggggtgcgcg tgattgcaa gcacgtcccc atgcgctcca 6840  
 tcaagaagag cgacttcgcg gagctggtga agtacatcac cgacgagcaa ggcaagaccg 6900  
 atcggggccc 6909

<210> 77  
 <211> 31  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido EcoRI-HMGS\_F

<400> 77  
 agccgtgaat tcgaggcttt tactaaaaac a 31

10 <210> 78  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> oligonucleótido EcoRI-HMGS\_R

<400> 78  
 agcgtctag atgtctgtct ctacaaataa tt 32

20 <210> 79  
 <211> 8116  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> plásmido pMTL 82151-HMGS-Patp-HMGR

ES 2 674 984 T3

<400> 79  
cctgcaggat aaaaaaattg tagataaatt ttataaaata gttttatcta caatTTTTTT 60  
atcaggaaac agctatgacc gcggccgctg tatccatag accatgatta cgaattcgag 120  
gcttttacta aaaacaataa aacaggagg aaataatag actataggaa ttgacaaaat 180  
aaacttttac gtacaaaaat attatgtaga tatggcaaaa ttagcagaag caagacaagt 240  
agacccaaat aaatTTCTTA ttggaatagg acagactgaa atggcagtta gtccagtaaa 300  
ccaagatata gtatcaatgg tgctaatgc tgctaaagat ataataactg atgaagacaa 360  
aaagaaaata ggaatggtaa tagtagcaac tgagtcagca gtagatgcag caaaggcagc 420  
agcagtacag attcataatt tattaggtat tcaaccattt gcaagatggt tcgaaatgaa 480  
agaagcatgt tatgctgcta ctctgcaat tcagttagct aaggattatt tagctacaag 540  
accaaatgag aaagTTTTAG ttatagctac agatacagct agatatggac ttaattcagg 600  
tggtgaacct actcaaggty ctggtgctgt tgctatgggt atagctcata atcctagtat 660  
acttgcatta aatgaagagc ctgTTGCTTA tacagaagat gtttatgatt tctggagacc 720  
aacaggacat aagtatccat tagtagatgg tgctttatca aaagacgcat atattagatc 780  
TTTTCAACA tcttggatg aatatgctaa gagacaagga aagagTTTAG ctgattttgc 840  
tagtctttgc tttcatgttc cttttactaa aatgggtaaa aaggctttag aatctataat 900  
agataacgca gatgaaacaa ctcaagagag attaagatct ggatatgaag atgcagttga 960  
ttacaataga tatgttggaa atatatacac aggaagtctt tatctttctc ttataagtct 1020  
tcttgaaaat agagatttac aggctggtga aactattgga ttattttcat acggatcagg 1080  
ttctgttggg gaatTTTatt cagctacact tgtagaagga tataaagatc accttgatca 1140  
ggcagcacac aaagcacttt taaacaatag aactgaagta tcagtagatg catacgaaac 1200  
atTTTTCAAG agatttgatg atgtagaatt tgatgaagag caggatgcag ttcattgaaga 1260  
tagacatata ttctatcttt caaacataga gaataatgta agagaatatc atagacctga 1320  
ataagagctc gttataaatt tcaatTTTCA tTCTTTTAA aggagattag catacatttt 1380  
atcataatta tacagacaat atagtaatat atgatgttaa aatatcaata tatgggtaaa 1440  
aatctgtata tttttccca ttttaattat ttgtactata atattacact gagtgtattg 1500  
catatTTAAA aaatatttgg tacaattagt tagttaaata aattctaaat tgtaaattat 1560  
cagaatcctt attaaggaag tacatagatt taaggagaaa tcataaaaag gtgtaataata 1620  
aactggctaa aattgagcaa aaattgagca attaagactt tttgattgta tctttttata 1680  
tatttaaggt atataatctt atttatattg ggggaaggta ccatgcaatc attagacaaa 1740



ES 2 674 984 T3

aatttcagac atttatcaag acaacaaaag ttacaacaat tagttgataa acagtggcct 1800  
tcagaagatc agtttgatat tttacttaat catccttta tagatgaaga agttgctaata 1860  
agtcttatag aaaatgtaat tgcacagggt gcattaccag ttggacttct tcctaataata 1920  
atagttgatg ataaggctta tgttgtacca atgatggttg aagaacctag tgttgttgca 1980  
gctgcatcct atggtgctaa attagtaaat cagacagggt gatttaaaac tgtatcatca 2040  
gaaagaataa tgattggaca gatagtattt gatgggtgag atgacactga aaaattaagt 2100  
gcagatatta aagcattaga aaaacaaata cataagattg cagatgaagc ataccttagt 2160  
ataaaagcaa gaggtggtgg ttatcaaaga atagcaatag atacatttcc agagcaacaa 2220  
cttttaagtc ttaaggtatt tgtagatata aaagatgcta tgggtgctaa tatgcttaat 2280  
actatacttg aggcaataac tgcattcctt aaaaatgaat ctctcaatc agatatatta 2340  
atgtctatac tttcaacca tgcactgct agttagtaa aagtacaagg tgagatagat 2400  
gtaaaagatc ttgctagagg tgaagaaca ggtgaagaag tagctaagag aatggaaaga 2460  
gcttctgat tagctcagggt tgatattcat agagctgcaa cacataacaa aggtgttatg 2520  
aatggaatac atgctgttgt tttagctaca ggaatgata ctagagggtgc tgaagcatct 2580  
gcacatgcat acgcatcaag agacggacaa tatagaggta tagcaacttg gagatatgat 2640  
cagaagagac aaagacttat tggactatt gaagtccaa tgacacttgc tatagtaggt 2700  
gggtgacta aagtattacc aatagctaag gcatcattag agttattaaa tgttgattct 2760  
gcacaagaac ttggacacgt agttgctgct gttggattag cacaaaactt tgctgcttgt 2820  
agagcacttg tttctgaagg tattcaacaa ggacacatgt cattacaata taaaagttta 2880  
gcaatagtag taggtgcaaa aggtgacgag atagcacaag tagcagaagc tcttaaacag 2940  
gaaccaagag ctaatacaca ggttctgaa agaattttac aggaaattag acagcaataa 3000  
tctagagtcg acgtcacgcg tccatggaga tctcgaggcc tgcagacatg caagcttggc 3060  
actggccgct gttttacaac gtcgtgactg ggaaaacctt ggcgttacc aacttaatcg 3120  
ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 3180  
cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc tagcataaaa ataagaagcc 3240  
tgcatttgca ggcttcttat ttttatggcg cgccgttctg aatccttagc taatggttca 3300  
acaggtaact atgacgaaga tagcacctg gataagtctg taatggattc taaggcattt 3360  
aatgaagacg tgtatataaa atgtgctaata gaaaaagaaa atgcgttaaa agagcctaaa 3420  
atgagttcaa atggttttga aattgattgg tagtttaatt taatatattt tttctattgg 3480  
ctatctcgat acctatagaa tcttctgttc acctttgttt ttgaaatata aaaaggggct 3540  
ttttagcccc ttttttttaa aactccggag gagtttcttc attcttgata ctatacgtaa 3600  
ctattttcga tttgacttca ttgtcaatta agctagtaaa atcaatggtt aaaaaacaaa 3660  
aaacttgcac ttttctacct agtaatttat aattttaagt gtcgagttta aaagtataat 3720  
ttaccaggaa aggagcaagt tttttaataa ggaaaaattt ttccttttaa aattctattt 3780

ES 2 674 984 T3

cgttatatga ctaattataa tcaaaaaaat gaaaataaac aagaggtaaa aactgcttta	3840
gagaaatgta ctgataaaaa aagaaaaaat cctagattta cgtcatacat agcaccttta	3900
actactaaga aaaatattga aaggacttcc acttgtggag attatttggt tatgttgagt	3960
gatgcagact tagaacattht taaattacat aaaggtaatt tttgcggtaa tagattttgt	4020
ccaatgtgta gttggcgact tgcttgtaag gatagtttag aaatatctat tcttatggag	4080
catttaagaa aagaagaaaa taaagagttt atatttttaa ctcttacaac tccaatgta	4140
aaaagttatg atcttaatta ttctattaaa caatataata aatcttttaa aaaattaatg	4200
gagcgttaagg aagttaagga tataactaaa ggttatataa gaaaattaga agtaacttac	4260
caaaaggaaa aatacataac aaaggattta tggaaaataa aaaaagatta ttatcaaaaa	4320
aaaggacttg aaattggtga tttagaacct aattttgata cttataatcc tcattttcat	4380
gtagttattg cagttaataa aagttatttt acagataaaa attattatat aaatcgagaa	4440
agatggttgg aattatggaa gtttgctact aaggatgatt ctataactca agttgatgtt	4500
agaaaagcaa aaattaatga ttataaagag gtttacgaac ttgcgaaata ttcagctaaa	4560
gacactgatt atttaatatt gaggccagta tttgaaattht tttataaagc attaaaaggc	4620
aagcaggtat tagtttttag tggatttttt aaagatgcac acaaattgta caagcaagga	4680
aaacttgatg tttataaaaa gaaagatgaa attaaatatt tctatatagt ttattataat	4740
tggtgcaaaa aacaatatga aaaaactaga ataagggaac ttacggaaga tgaaaaagaa	4800
gaattaaatc aagatttaat agatgaaata gaaatagatt aaagtgtaac tatactttat	4860
atatatatga ttaaaaaaat aaaaaaacac agcctatttag gttgttgttt tttattttct	4920
ttattaattht ttttaatttt tagtttttag ttctttttta aaataagttt cagcctcttt	4980
ttcaatattt tttaaagaag gagtatttgc atgaattgcc ttttttctaa cagacttagg	5040
aaatattttt acagtatctt ctgcccgg tgattttgga acttcataac ttactaattt	5100
ataattatta tttcttttt taattgtaac agttgcaaaa gaagctgaac ctgttccttc	5160
aactagttta tcatcttcaa tataatattc ttgacctata tagtataaat atatttttat	5220
tatattttta cttttttctg aatctattat tttataatca taaaaagttt taccaccaa	5280
agaaggttgt actcctctg gtccaacata tttttttact atattatcta aataattttt	5340
gggaactggt gttgtaattht gattaatcga acaaccagtt atacttaaag gaattataac	5400
tataaaaaata tataggatta tcttttttaa tttcattatt ggcctccttt ttattaaatt	5460
tatgttacca taaaaggac ataacgggaa tatgtagaat atttttaatg tagacaaaat	5520
ttacataaaa tataaagaaa ggaagtgttt gtttaaattt tatagcaaac tatcaaaaat	5580
tagggggata aaaatttatg aaaaaaagg tttcgatgtt atttttatgt ttaactttaa	5640
tagtttgtag tttatttaca aattcggccg gccagtgggc aagttgaaaa attcacaaaa	5700
atgtggtata atatctttgt tcatttagac gataaacttg aatttgagag ggaacttaga	5760
tggtatttga aaaaattgat aaaaatagtt ggaacagaaa agagtatttt gaccactact	5820

ES 2 674 984 T3

ttgcaagtgt accttgtacc tacagcatga ccgttaaagt ggatadcaca caataaagg 5880  
 aaaaggggat gaaactatat cctgcaatgc tttattatat tgcaatgatt gtaaaccgcc 5940  
 attcagagtt taggacggca atcaatcaag atggtgaatt ggggatatat gatgagatga 6000  
 taccaagcta tacaatattt cacaatgata ctgaacatt ttccagcctt tggactgagt 6060  
 gtaagtctga ctttaaatca tttttagcag attatgaaag tgatadgcaa cggatggaa 6120  
 acaatcatag aatggaagga aagccaaatg ctccgaaaa catttttaat gtatctatga 6180  
 taccgtggtc aaccttcgat ggctttaatc tgaatttgca gaaaggatat gattatttga 6240  
 ttctattttt tactatgggg aatattata aagaagataa caaaattata cttcctttgg 6300  
 caattcaagt tcatcacgca gtatgtgacg gatttcacat ttgccgtttt gtaaacgaat 6360  
 tgcaggaatt gataaatagt taacttcagg tttgtctgta actaaaaaca agtatttaag 6420  
 caaaaacatc gtagaaatac ggtgtttttt gttaccctaa gtttaactc ctttttgata 6480  
 atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag 6540  
 aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaa 6600  
 caaaaaaacc accgctacca gcgggtggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactctt 6660  
 ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc 6720  
 cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa 6780  
 tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa 6840  
 gacgatagtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc 6900  
 ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatadct acagcgtgag ctatgagaaa 6960  
 gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggctcgaa 7020  
 caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg 7080  
 ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctctcaggg gggcggagcc 7140  
 tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg 7200  
 ctcatatggt ctttctgcg ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg 7260  
 agtgagctga taccgctgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcaggtca gtgagcaggg 7320  
 aagcgaaga gcgccaata cgcagggccc cctgcttcgg ggtcattata gcgattttt 7380  
 cggtatatcc atccttttcc gcacgatata caggattttg ccaaaggggt cgtgtagact 7440  
 ttcttgggtg tatecaacgg cgtcagccgg gcaggatagg tgaagtaggc ccaccgcga 7500  
 gcgggtgttc cttcttcact gtcccttatt cgcacctggc ggtgctcaac gggaatcctg 7560  
 ctctgcgagg ctggccggct accgccggcg taacagatga gggcaagcgg atggctgatg 7620  
 aaaccaagcc aaccaggaag ggcagcccac ctatcaaggt gtactgcctt ccagacgaac 7680  
 gaagagcgat tgaggaaaag gcggcggcgg ccggcatgag cctgtcggcc tacctgctgg 7740  
 ccgtcggcca gggctacaaa atcacggcg tcgtggacta tgagcacgtc cgcgagctgg 7800  
 cccgatcaa tggcgacctg ggccgcctgg gcggcctgct gaaactctgg ctaccgacg 7860  
 accccgcac ggcgcggttc ggtgatgcca cgatcctcgc cctgctggcg aagatcgaag 7920  
 agaagcagga cgagcttggc aaggatcatga tggcgtggc ccgcccaggg gcagagccat 7980  
 gactttttta gccgctaaaa cggccggggg gtgcgcgtga ttgccaagca cgtcccatg 8040  
 cgctccatca agaagagcga cttcgcggag ctggtgaagt acatcaccga cgagcaaggc 8100  
 aagaccgatc gggccc 8116

<210> 80

<211> 55

5

ES 2 674 984 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido NotI-XbaI-Prnf-MK\_F

5 <400> 80  
 atgCGCGGCC gctaggtcta gaatatcgat acagataaaa aaatatataa tacag 55

<210> 81  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido Sall-Prnf-MK\_R

<400> 81  
 tggTctgta acagcgTatt cacctgc 27

15 <210> 82  
 <211> 4633  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> plásmido pMTL8314-Prnf-MK

<400> 82  
 aaactccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 60  
 gCGtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 120  
 atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 180  
 gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
 gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
 tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 360  
 accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480  
 cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggta 540  
 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat 600  
 ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 660  
 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 720

ES 2 674 984 T3

ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac	780
cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc	840
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca gggccccctg caggataaaa	900
aaattgtaga taaatTTTTat aaaatagttt tatctacaat ttttttatca ggaaacagct	960
atgaccgagg ccgctaggtc tagaatatcg atacagataa aaaaatatat aatacagaag	1020
aaaaaattat aaatTTgtgg tataatataa agtatagtaa ttttaagttta aacctcgtga	1080
aaacgctaac aaataatagg aggtcaattg atgatagctg ttccatttaa cgctggaaaa	1140
ataaaagttt taattgaggc attagaatct ggaattatt catcaataaa atcagatgta	1200
tatgacggaa tgttatatga tgcaccagat caccttaaat cattagtaaa cagatttcta	1260
gaacttaata atataactga gccattagca gtaactatac agacaaatct tcctccttca	1320
agaggctctg gatctagtgc agctggttgc gttgcttttg taagagcaag ttatgatttc	1380
ttaggaaaaa gttaactaa agaagagctt atagaaaagg ctaattgggc tgaacaaata	1440
gctcatggaa agccatctgg aatagataca caaacaatag tatctggaaa gcctgtttg	1500
tttcaaagg gacatgcaga aacacttaa actctttcac ttgatggata catggtagta	1560
attgatacag gtgttaaagg aagtacaaga caggctgtag aagatgttca taaactttgc	1620
gaagatcctc aatataatgag tcacgtaaaa cacataggaa aactgtact tagagcatct	1680
gatgttattg aacatcataa ctttgaagca cttgctgata tattcaatga atgtcatgct	1740
gatttaaagg ctcttacagt aagtcatgac aaaatagaac agttaatgaa gataggaaaa	1800
gaaaatgggt ctatagctgg taaatTaaact ggtgctggta gaggtggttc aatgttatta	1860
cttgcaaaa acttaccac tgcaagaat atagttaaag cagtagagaa agctggtgca	1920
gcacatactt ggattgaaaa tttaggtgggt taagtcgacg tcacgcgtcc atggagatct	1980
cgaggcctgc agacatgcaa gcttggcact ggcgctcgtt ttacaacgtc gtgactggga	2040
aaaccctggc gttacccaac ttaatcgctt tgcagcacat cccccttctg ccagctggcg	2100
taatagcgaa gaggcccga ccgatcgccc tccccacag ttgcgcagcc tgaatggcga	2160
atggcgctag cataaaaata agaagcctgc atttgcaggc ttcttatttt tatggcgcgc	2220
cgccattatt tttttgaaca attgacaatt catttcttat tttttattaa gtgatagtca	2280
aaaggcataa cagtgtctgaa tagaaagaaa tttacagaaa agaaaattat agaatttagt	2340
atgattaatt atactcattt atgaatgttt aattgaatac aaaaaaaaaat acttgttatg	2400
tattcaatta cgggttaaaa tatagacaag ttgaaaaatt taataaaaaa ataagtcctc	2460
agctcttata tattaagcta ccaacttagt atataagcca aaacttaaat gtgctaccaa	2520
cacatcaagc cgttagagaa ctctatctat agcaatattt caaatgtacc gacatacaag	2580
agaaacatta actatatata ttcaatttat gagattatct taacagatat aatgtaaat	2640
tgcaataagt aagatttaga agtttatagc ctttgtgtat tggaaagcagt acgcaaaggc	2700
ttttttattt gataaaaatt agaagtatat ttattttttc ataattaatt tatgaaaatg	2760

ES 2 674 984 T3

aaagggggtg agcaaagtga cagaggaaag cagtatctta tcaaataaca aggtattagc 2820  
 aatatcatta ttgacttttag cagtaaacad tatgactttt atagtgcctg tagctaagta 2880  
 gtacgaaagg gggagcttta aaaagctcct tggatacatc agaattcata aattaattta 2940  
 tgaaaagaag ggcgtatatg aaaacttgta aaaattgcaa agagtttatt aaagatactg 3000  
 aatatgcaa aatacattcg ttgatgattc atgataaaac agtagcaacc tattgcagta 3060  
 aatacaatga gtcaagatgt ttacataaag ggaaagtcca atgtattaat tgttcaaaga 3120  
 tgaaccgata tggatggtgt gccataaaaa tgagatgttt tacagaggaa gaacagaaaa 3180  
 aagaacgtac atgcattaaa tattatgcaa ggagctttaa aaaagctcat gtaaagaaga 3240  
 gtaaaaaaga aaaataattt atttattaat ttaatatgga gagtgccgac acagtatgca 3300  
 ctaaaaaata tatctgtggt gtagtgagcc gatacaaaag gatagtcact cgcattttca 3360  
 taatacatct tatgttatga ttatgtgtcg gtgggacttc acgacgaaaa cccacaataa 3420  
 aaaaagagtt cggggtaggg ttaagcatag ttgaggcaac taaacaatca agctaggata 3480  
 tgcagtagca gaccgtaagg tcgttgttta ggtgtgttgt aatacatacg ctattaagat 3540  
 gtaaaaaatac ggataccaat gaagggaaaa gtataatttt tggatgtagt ttgtttgttc 3600  
 atctatgggc aaactacgtc caagccggt tccaaatctg ctaaaaagta taccctttct 3660  
 aaaatcaaaag tcaagtatga aatcataaat aaagttaat tttgaagtta ttatgatatt 3720  
 atgtttttct attaaaataa attaagtata tagaatagtt taataatagt atatacttaa 3780  
 tgtgataagt gtctgacagt gtcacagaaa ggatgattgt tatggattat aagcggccgg 3840  
 ccagtgggca agttgaaaaa ttcacaaaaa tgtggtataa tatctttggt cattagagcg 3900  
 ataaacttga atttgagagg gaacttagat ggtatttgaa aaaattgata aaaatagttg 3960  
 gaacagaaaa gagtattttg accactactt tgcaagtgta ccttgtacct acagcatgac 4020  
 cgtaaagtg gatatacac aaataaagga aaaggaatg aaactatata ctgcaatgct 4080  
 ttattatatt gcaatgattg taaaccgcca ttcagagttt aggacggcaa tcaatcaaga 4140  
 tggatgaattg gggatatatg atgagatgat accaagctat acaatatttc acaatgatac 4200  
 tgaaacattt tccagccttt ggactgagtg taagtctgac tttaaatcat ttttagcaga 4260  
 ttatgaaagt gatacgaac ggtatggaaa caatcataga atggaaggaa agccaaatgc 4320  
 tccggaaaac atttttaatg tatctatgat accgtggtca accttcgatg gctttaatct 4380  
 gaatttgcag aaaggatag attatttgat tcctattttt actatgggga aatattataa 4440  
 agaagataac aaaattatac ttcctttggc aattcaagtt catcacgag tatgtgacgg 4500  
 atttcacatt tgccgttttg taaacgaatt gcaggaattg ataaatagtt aacttcaggt 4560  
 ttgtctgtaa ctaaaaaaca gtatttaagc aaaaacatcg tagaaatacg gtgtttttg 4620  
 ttaccctaag ttt 4633

<210> 83

<211> 6753

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> plásmido pMTL 8314-Prnf-MK-PMK-PMD

ES 2 674 984 T3

<400> 83  
aaactccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 60  
gcgctagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 120  
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 180  
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
tacctcgcctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 360  
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
ggttcgtgca cacagcccag ctggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480  
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggggaaa aggcggacag gtatccggtg 540  
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat 600  
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 660  
tcagggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 720  
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac 780  
cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc 840  
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgcga gggccccctg caggataaaa 900  
aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat ttttttatca ggaaacagct 960  
atgaccgcgg ccgctaggtc tagaatacgc atacagataa aaaaatatat aatacagaag 1020  
aaaaaattat aaatttggtg tataatataa agtatagtaa ttttaagtta aacctcgtga 1080  
aaacgctaac aaataatagg aggtcaattg atgatagctg ttccatttaa cgctggaaaa 1140  
ataaaagttt taattgaggc attagaatct ggaattatt catcaataaa atcagatgta 1200  
tatgacggaa tgttatatga tgcaccagat caccttaaat cattagtaaa cagatttgta 1260  
gaacttaata atataactga gccattagca gtaactatac agacaaatct tcctccttca 1320  
agaggtcttg gatctagtc agctgttgct gttgcttttg taagagcaag ttatgatttc 1380  
ttaggaaaaa gtttaactaa agaagagctt atagaaaagg ctaattgggc tgaacaaata 1440  
gctcatggaa agccatctgg aatagataca caaacaatag tatctggaaa gcctgtttgg 1500  
tttcaaaagg gacatgcaga aacacttaa actctttcac ttgatggata catggtagta 1560  
attgatacag gtgttaaagg aagtacaaga caggctgtag aagatgttca taaactttgc 1620  
gaagatcctc aatatatgag tcacgtaaaa cacataggaa aacttgact tagagcatct 1680  
gatgttattg aacatcataa ctttgaagca cttgctgata tattcaatga atgtcatgct 1740  
gatttaaagg ctcttacagt aagtcatgac aaaatagaac agttaatgaa gataggaaaa 1800  
gaaaatgggt ctatagctgg taaattaact ggtgctggta gaggtggttc aatgttatta 1860

ES 2 674 984 T3

cttgcaaaag acttaccaac tgcaagaat atagttaaag cagtagagaa agctggtgca 1920  
 gcacatactt ggattgaaaa tttaggtggt taagtcgaca aagacactaa aaaattataa 1980  
 aagtaaagga ggacattaaa tgatacaagt aaaggcacca ggaaaattat atatagcagg 2040  
 tgaatacgct gttacagaac caggatataa atctgttctt atagctcttg atagatttgt 2100  
 tacagctact attgaggaag ctgatcaata caaaggaaca atacattcaa aggcattaca 2160  
 tcacaatcca gtaactttta gtagagatga agattctatt gttatatcag acccacacgc 2220  
 agcaaaacaa cttaattatg tagtaactgc tatagaaata tttgagcaat atgcaaaatc 2280  
 atgtgacata gcaatgaagc attttcattt aactatagat tctaacttag atgatagtaa 2340  
 tggacataag tatggacttg gatcttctgc tgctgtttta gtttcagtaa ttaaagtact 2400  
 taacgaattt tatgatatga aactttcaa cctttatata tataagttag cagtaattgc 2460  
 taatatgaaa ttacagagtt tatcttcatg cgggatata gcagtaagtg tttattcagg 2520  
 ttggttagct tattctacat ttgacatga atgggtaaaa caccagatag aagatacaac 2580  
 agttgaagaa gtacttatta aaaattggcc tggattacac atagagccac ttcaagctcc 2640  
 tgaaaatag gaagttctta taggttgac aggtagtcca gctagtagtc ctcatthtgt 2700  
 ttctgaagtt aaaagactta agtcagatcc ttcattttac ggtgatttct tagaagattc 2760  
 acatagatgt gtagaaaaat taattcatgc attcaaaact aataatatta aggggtttca 2820  
 gaaaatgga agacagaata gaactattat acaagaatg gataaggaag caacagttga 2880  
 tatagagact gagaagftaa aatatttatg tgatattgct gaaaaatc atggtgcaag 2940  
 taaaacttca ggtgctggtg gtggtgattg cggaaataact ataataaata aggatgtaga 3000  
 caaagagaaa atatatgatg aatggactaa acatggaata aagcctctta agtttaatat 3060  
 ttatcatgga caataacat ggtcaataat cttacaataa ataaaagaaa ggaggcaaaa 3120  
 atatgataaa atctggaaaa gcaagagcac acactaatat agcacttata aatattggg 3180  
 gtaagaaaga tgaggcatta ataataccea tgaataactc aatatcagta acttttagaaa 3240  
 agttttatag tgaaacaaaa gttacattta acgatcagct tactcaagat caatthtggc 3300  
 ttaatggtga aaaagtttct ggaaaagaat tagaaaagat ttcaaagtat atggatattg 3360  
 ttagaaatag agctggaata gattggtatg ctgagataga atctgataat tttgttccta 3420  
 cagctgctgg tcttgctagt tctgctagt cttatgcagc attagctgct gcatgtaacc 3480  
 aagcacttga tttacagtta agtgataaag acttaagtag attagctaga attggatcag 3540  
 gatcagcatc aagatcaata tacggtggtt ttgcagaatg ggaaaagga tataatgacc 3600  
 aaacttctta tgctgttcca ttagaaagta atcactttga agatgatctt gctatgattt 3660  
 ttgtagtaat aaaccaacat tctaaaaagg ttccttcaag atatggaatg tctcttacia 3720  
 gaaatacaag tagattctat caatattggt tagaccatat tgatgaagat cttgcagaag 3780  
 caaaggcagc aatacaagat aaggatttta agagattagg tgaagttatt gaagagaatg 3840  
 gacttagaat gcatgctaca aatcttggat caactccacc tttacttac ttagtacaag 3900



ES 2 674 984 T3

agtcatacga tgtaatggca ttagtacatg agtgtagaga agcaggatat ccatgctatt 3960  
 tcactatgga tgctggacct aatgtaaaaa tactttaga gaagaaaaac aaacaacaga 4020  
 taatagataa acttttaact cagttcgata ataatcagat aatagatagt gatattatag 4080  
 ctacaggatg tgaaattata gaataaacta gttccgctaa gcttggcact ggccgctcgtt 4140  
 ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttaccacaac ttaatcgctt tgcagcacat 4200  
 ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc tcccaacag 4260  
 ttgcgagcc tgaatggcga atggcgctag cataaaaaata agaagcctgc atttgcaggc 4320  
 ttcttatttt tatggcgcgc cgccattatt tttttgaaca attgacaatt catttcttat 4380  
 tttttattaa gtgatagtca aaaggcataa cagtgtgaa tagaaagaaa ttacagaaa 4440  
 agaaaattat agaatttagt atgattaatt atactcattt atgaatgttt aattgaatac 4500  
 aaaaaaaaa acttgttatg tattcaatta cgggttaaaa tatagacaag ttgaaaaatt 4560  
 taataaaaaa ataagtcttc agctcttata tattaagcta ccaacttagt atataagcca 4620  
 aaacttaaat gtgctacca cacatcaagc cgttagagaa ctctatctat agcaatattt 4680  
 caaatgtacc gacatacaag agaaacatta actatatata ttcaatttat gagattatct 4740  
 taacagatat aatgtaaat tgcaataagt aagatttaga agtttatagc ctttgtgtat 4800  
 tggaagcagt acgcaaaggc ttttttattt gataaaaaatt agaagtatat ttattttttc 4860  
 ataattaatt tatgaaaatg aaaggggtg agcaaagtga cagaggaaag cagtatctta 4920  
 tcaaataaca aggtattagc aatatcatta ttgactttag cagtaaacat tatgactttt 4980  
 atagtgcttg tagctaagta gtacgaaagg gggagcttta aaaagctcct tggatacat 5040  
 agaattcata aattaattta tgaaaagaag ggcgtatatg aaaacttgta aaaattgcaa 5100  
 agagtttatt aaagatactg aaatatgcaa aatacattcg ttgatgattc atgataaaac 5160  
 agtagcaacc tattgcagta aatacaatga gtcaagatgt ttacataaag ggaaagtcca 5220  
 atgtattaat tgttcaaaga tgaaccgata tggatggtgt gccataaaaa tgagatgttt 5280  
 tacagaggaa gaacagaaaa aagaacgtac atgcattaaa tattatgcaa ggagctttaa 5340  
 aaaagctcat gtaaagaaga gtaaaaagaa aaaataattt atttattaat ttaatattga 5400  
 gagtgccgac acagtatgca ctaaaaata tatctgtggt gtagtgagcc gatacaaaag 5460  
 gatagtcact cgcattttca taatacatct tatgttatga ttatgtgtcg gtgggacttc 5520  
 acgacgaaaa cccacaataa aaaaagagtt cggggtaggg ttaagcatag ttgaggcaac 5580  
 taaacaatca agctaggata tgcagtagca gaccgtaagg tcgttgttta ggtgtgttgt 5640  
 aatacatagc ctattaagat gtaaaaatac ggataccaat gaagggaaaa gtataatttt 5700  
 tggatgtagt ttgtttgttc atctatgggc aaactacgct caaagccggt tccaaatctg 5760  
 ctaaaagta tatcctttct aaaatcaaag tcaagtatga aatcataaat aaagttaaat 5820  
 tttgaagtta ttatgatatt atgtttttct attaaaataa attaagtata tagaatagtt 5880  
 taataatagt atatacttaa tgtgataagt gtctgacagt gtcacagaaa ggatgattgt 5940

ES 2 674 984 T3

tatggattat aagcggccgg ccagtgggca agttgaaaaa ttcacaaaaa tgggtataa 6000  
 tatctttggt cattagagcg ataaacttga atttgagagg gaacttagat ggtatntgaa 6060  
 aaaattgata aaaatagttg gaacagaaaa gagtattttg accactactt tgcaagtgta 6120  
 ccttgtagct acagcatgac cgttaaagtg gatatcacac aaataaagga aaagggaatg 6180  
 aactatatac ctgcaatgct ttattatatt gcaatgattg taaaccgcca ttcagagttt 6240  
 aggacggcaa tcaatcaaga tgggaattg gggatatatg atgagatgat accaagctat 6300  
 acaatatttc acaatgatac tgaacattt tccagccttt ggactgagtg taagtctgac 6360  
 tttaaatcat ttttagcaga ttatgaaagt gatacgcac ggtatggaaa caatcataga 6420  
 atggaaggaa agccaaatgc tccggaaaac atttttaatg tatctatgat accgtggtca 6480  
 acctcgatg gctttaatct gaatttgtag aaaggatag attatttgat tcctattttt 6540  
 actatgggga aatattataa agaagataac aaaattatac ttcctttggc aattcaagtt 6600  
 catcacgtag tatgtgacgg atttcacatt tgcctgtttg taaacgaatt gcaggaattg 6660  
 ataaatagtt aacttcaggt ttgtctgtaa ctaaaaacaa gtatttaagc aaaaacatcg 6720  
 tagaaatagc gtgttttttg ttaccctaag ttt 6753

<210> 84

<211> 9198

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> plásmido pMTL8314-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispS

<400> 84

aaactccttt ttgataatct catgacaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 60  
 gcgtagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgtagcgt 120  
 atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa 180  
 gagctaccaa ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
 gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
 tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtcct 360  
 accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480  
 cgtgagctat gagaaagcgc cacgctccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggt 540  
 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat 600  
 ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 660  
 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 720  
 ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcttat ccctgatctc tgtggataac 780  
 cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcggcga gccgaacgac cgagcgcagc 840  
 gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgcg gggccccctg caggataaaa 900

10

ES 2 674 984 T3

aaattgtaga taaatTTTat aaaatagttt tatctacaat ttttttatca ggaaacagct 960  
 atgaccgCGG ccgctaggtc tagaatatcg atacagataa aaaaatatat aatacagaag 1020  
 aaaaaattat aaatTTgtgg tataatataa agtatagtaa tTTaagTTta aacctcgtga 1080  
 aaacgctaac aaataatagg aggtcaattg atgatagctg ttccatttaa cgctggaaaa 1140  
 ataaaagttt taattgaggc attagaatct ggaaattatt catcaataaa atcagatgta 1200  
 tatgacggaa tgttatatga tgcaccagat caccttaaat cattagtaaa cagatttgta 1260  
 gaacttaata atataactga gccattagca gtaactatac agacaaatct tcctccttca 1320  
 agaggTcttg gatctagtgc agctgttgct gttgcttttg taagagcaag ttatgatttc 1380  
 ttaggaaaaa gTTtaactaa agaagagctt atagaaaagg ctaattgggc tgaacaaata 1440  
 gctcatggaa agccatctgg aatagataca caaacaatag tatctggaaa gcctgTTtg 1500  
 tttcaaaagg gacatgcaga aacacttaa actctttcac ttgatggata catggtagta 1560  
 attgatacag gtgttaaagg aagtacaaga caggctgtag aagatgttca taaactttgc 1620  
 gaagatcctc aatatatgag tcacgtaaaa cacataggaa aacttgtaact tagagcatct 1680  
 gatgttattg aacatcataa ctttgaagca cttgctgata tattcaatga atgtcatgct 1740  
 gatttaaagg ctcttacagt aagtcatgac aaaatagaac agttaatgaa gataggaaaa 1800  
 gaaaatgggt ctatagctgg taaattaact ggtgctggta gaggtggTtc aatgttatta 1860  
 cttgcaaaag acttaccAAC tgcaagaat atagttaaag cagtagagaa agctggTgca 1920  
 gcacatactt ggattgaaaa tttaggtggt taagtcgaca aagacactaa aaaattataa 1980  
 aagtaaagga ggacattaaa tgatacaagt aaaggcacca ggaaaattat atatagcagg 2040  
 tgaatacgct gttacagaac caggatataa atctgttctt atagctcttg atagatttgt 2100  
 tacagctact attgaggaag ctgatcaata caaaggaaca atacattcaa aggcattaca 2160  
 tcacaatcca gtaactTTta gtagagatga agattctatt gttatatcag acccacacgc 2220  
 agcaaaaaca cttaattatg tagtaactgc tatagaaata tttgagcaat atgcaaaatc 2280  
 atgtgacata gcaatgaagc atTTTcattt aactatagat tctaacttag atgatagtaa 2340  
 tggacataag tatggacttg gatcttctgc tgctgtTTta gtttcagtaa ttaaagtact 2400  
 taacgaattt tatgatatga aactTTTcaa cTTTtatata tataagttag cagtaattgc 2460  
 taatatgaaa ttacagagtt tatcttcatg cggTgatata gcagtaagtg tttattcagg 2520  
 ttggttagct tattctacat ttgacctga atgggtaaaa caccagatag aagatacaac 2580  
 agttgaagaa gtacttatta aaaattggcc tggattacac atagagccac ttcaagctcc 2640  
 tgaaaatag gaagttctta taggttgac aggtagtcca gctagtagtc ctcatTTTgt 2700  
 ttctgaagtt aaaagactta agtcagatcc ttcattttac ggtgatttct tagaagattc 2760  
 acatagatgt gtagaaaaat taattcatgc attcaaaact aataatatta agggTgttca 2820  
 gaaaatggta agacagaata gaactattat acaagaatg gataaggaag caacagttga 2880  
 tatagagact gagaagTtaa aatatttatg tgatattgct gaaaaatatc atggTgcaag 2940

ES 2 674 984 T3

taaaacttca ggtgctggtg gtggtgattg cggataaact ataataaata aggatgtaga 3000  
 caaagagaaa atatatgatg aatggactaa acatggaata aagcctctta agttaaata 3060  
 ttatcatgga caataacat ggtcaataat cttacaataa ataaaagaaa ggaggcaaaa 3120  
 atatgataaa atctggaaaa gcaagagcac acactaatat agcacttata aaatattggg 3180  
 gtaagaaaga tgaggcatta ataataccea tgaataactc aatatcagta actttagaaa 3240  
 agttttatac tgaacaaaa gttacattta acgatcagct tactcaagat caattttggc 3300  
 ttaatggtga aaaagtttct ggaaaagaat tagaaaagat ttcaaagtat atggatattg 3360  
 ttagaaatag agctggaata gattgggatg ctgagataga atctgataat tttgttccta 3420  
 cagctgctgg tcttgctagt tctgctagtg cttatgcagc attagctgct gcatgtaacc 3480  
 aagcacttga tttacagtta agtgataaag acttaagtag attagctaga attggatcag 3540  
 gatcagcatc aagatcaata tacggtggtt ttgcagaatg ggaaaaagga tataatgacg 3600  
 aaacttctta tgctgttcca ttagaaagta atcactttga agatgatctt gctatgattt 3660  
 ttgtagtaat aaaccaacat tctaaaaagg ttccttcaag atatggaatg tctcttaca 3720  
 gaaatacaag tagattctat caatattggt tagaccatat tgatgaagat cttgcagaag 3780  
 caaaggcagc aatacaagat aaggatttta agagattagg tgaagttatt gaagagaatg 3840  
 gacttagaat gcatgctaca aatcttggat caactccacc tttacttac ttagtacaag 3900  
 agtcatacga tgtaatggca ttagtacctg agttagaga agcaggatat ccatgctatt 3960  
 tcactatgga tgctggacct aatgtaaaaa tactttaga gaagaaaaac aaacaacaga 4020  
 taatagataa acttttaact cagttcgata ataactcagat aatagatagt gatattatag 4080  
 ctacaggat tgaaattata gaataaacta gttgtatatt aaaatagtag aatacataag 4140  
 atacttaatt taattaaaga tagttaagta cttttcaatg tgctttttta gatgtttaat 4200  
 acaaatcttt aattgtaaaa gaaatgctgt actatttact gttctagtga cgggattaaa 4260  
 ctgtattaat tataaataaa aaataagtac agttgtttaa aattatattt tgtattaaat 4320  
 ctaatagtac gatgtaagtt attttatact attgctagtt taataaaaag atttaattat 4380  
 atacttgaaa aggagaggaa ctcgagatgg cagagtatat aatagcagta gatgagttcg 4440  
 ataacgaaat aggatcaata gaaaagatgg aagctcatag aaaaggaaca cttcatagag 4500  
 cattcagat tttagttttt aactcaaaga atcaactttt attacagaaa agaatgtaa 4560  
 agaaatatca ctctccagga ttatggacaa acacttgttg tagtcacca agatattggtg 4620  
 aatctcttca tgatgctata tacagaagat taaaagaaga gatgggattt acttgcaac 4680  
 ttgagaagt attctcattc atatataagg taaaacttga agataattta tttgagaatg 4740  
 aatatgacca tgtatttatt ggtaaatag atggtgagat aattgttaat aaagatgaag 4800  
 ttgatgattt taaatgggta gacattaatg aagttaaaaa ggacataata gaaagacctg 4860  
 aggcatac tttactggtt aagtatcttg taaataaagc tgaaaataag atatttaaat 4920  
 aaaccggtgg gaggaatga acatggcaac agaattatta tgtttacaca gacctatc 4980

ES 2 674 984 T3

acttactcac aaacttttta ggaatccatt acctaaagtt attcaagcta cacctttaac 5040  
 attaaaactt aggtgtagtg tttctacaga aaatgtatca tttagtgaga cagaaactga 5100  
 aacaagaaga tcagcaaatt atgaaccaa ttcttgggat tatgattatc ttctttcttc 5160  
 tgatactgat gagtcaatag aagtacataa agataaggct aagaaattag aagctgaagt 5220  
 taggagagaa ataaataatg agaaggctga atttcttaca cttcttgaac ttattgataa 5280  
 tgtacaaaga cttggattag gatatagatt tgagtctgat ataagaagag cattagatag 5340  
 atttghtaagt agtggaggat ttgatggagt tactaaaact tcattacatg gaacagcatt 5400  
 atcatttagg ttattaaggc aacatggttt tgaagtatct caagaagctt ttagtggatt 5460  
 taaagatcag aatggaaact ttcttgagaa tttaaaggaa gacataaaag caattctttc 5520  
 tctttatgaa gcatcatttt tagcattaga aggtgagaat atattagatg aggctaaagt 5580  
 atttgcataa tctcatctta aagaacttag tgaagaaaag attggtaaag aattagctga 5640  
 acaagtttca catgctttag aattaccatt acatagaaga acacaaagat tagaagcagt 5700  
 ttggtcaata gaagcatata gaaagaaaga agacgcaa at caagtacttt tagaacttgc 5760  
 aatacttgac tacaatatga ttcaaagtgt atatcagagg gatttaagag aaacatcaag 5820  
 atggtggaga agagtaggat tagcaactaa attacatttt gctagagata ggcttattga 5880  
 aagtttttat tgggctgttg gagttgcttt tgaaccacaa tattctgatt gcagaaatag 5940  
 tgtagcaaag atgttttcat ttgttactat aattgacgat atttaccgat tatatggaac 6000  
 tttagatgaa cttgaacttt ttactgatgc agttgaaaga tgggatgtaa atgctattaa 6060  
 tgatcttcct gattatatga agttatgttt tcttgcactt tacaatacta ttaacgagat 6120  
 agcttacgat aacttaaaag ataaagggtga gaacatactt ccttatttaa caaaagcatg 6180  
 ggcagattta tgtaatgcat ttcttcaaga agctaagtgg ctttataata aatcaacacc 6240  
 tacatttgat gattattttg gaaatgcatg gaaaagtctt agtggacctt tacagcttat 6300  
 ttttgcttat tttgctgtag tacagaacat taaaaaggaa gagattgaga atcttcagaa 6360  
 atatcatgac ataatatcaa gacctagtca ctttttagg ctttghtaatg atttagcatc 6420  
 tgcttcagca gaaatagcaa gaggtgaaac tgctaattct gtaagttggt atatgagaac 6480  
 aaaaggata tctgaagaat tagctactga aagtgttatg aatcttatag acgaaacttg 6540  
 gaagaaaatg aacaagaaa aacttgggtg atctttattt gcaaaacctt ttgttgagac 6600  
 tgctataaat ttagctagac agtctcattg cacatatcat aatggtgatg cacatactag 6660  
 tccagatgaa ttaactagga aaagagtact tagtgtaata actgaaccaa tattaccatt 6720  
 tgaagataa gctagcataa aaataagaag cctgcatttg caggcttctt atttttatgg 6780  
 cgcgcccca ttattttttt gaacaattga caattcattt cttatttttt attaagtgat 6840  
 agtcaaaagg cataacagtg ctgaatagaa agaaatttac agaaaagaaa attatagaat 6900  
 ttagtatgat taattatact catttatgaa tgtttaattg aatacaaaaa aaaatacttg 6960  
 ttatgtattc aattacgggt taaaatatag acaagttgaa aaatttaata aaaaaataag 7020

ES 2 674 984 T3

tcctcagctc ttatatatta agctaccaac ttagtatata agccaaaact taaatgtgct 7080  
 accaacacat caagccgtta gagaactcta tctatagcaa ttttcaaat gtaccgacat 7140  
 acaagagaaa cattaactat atatattcaa tttatgagat tatcttaaca gatataaatg 7200  
 taaattgcaa taagtaagat ttagaagttt atagcctttg tgtattggaa gcagtacgca 7260  
 aaggcttttt ttttgataa aaattagaag tatatttatt ttttcataat taatttatga 7320  
 aatgaaagg gggtagcaaa agtgacagag gaaagcagta tcttatcaaa taacaaggta 7380  
 ttagcaatat cattattgac tttagcagta aacattatga cttttatagt gctttagct 7440  
 aagtagtacg aaagggggag ctttaaaaag ctccttggaa tacatagaat tcataaatta 7500  
 atttatgaaa agaagggcgt atatgaaaac ttgtaaaaat tgcaaagagt ttattaaaga 7560  
 tactgaaata tgcaaaatac attcgttgat gattcatgat aaaacagtag caacctattg 7620  
 cagtaaatac aatgagtcaa gatgtttaca taaagggaaa gtccaatgta ttaattgttc 7680  
 aaagatgaac cgatatggat ggtgtgccat aaaaatgaga tgttttacag aggaagaaca 7740  
 gaaaaaagaa cgtacatgca ttaaatatta tgcaaggagc tttaaaaaag ctcagtataa 7800  
 gaagagtaaa aagaaaaaat aatttattta ttaatttaat attgagagtg ccgacacagt 7860  
 atgcactaaa aaatataatc gtggtgtagt gagccgatac aaaaggatag tcaactcgc 7920  
 tttcataata catcttatgt tatgattatg tgcggtggg acttcacgac gaaaaccac 7980  
 aataaaaaaa gagttcgggg tagggttaag catagttgag gcaactaac aatcaagcta 8040  
 ggatatgcag tagcagaccg taaggctggt gtttaggtgt gttgtaatac atacgctatt 8100  
 aagatgtaaa aatcaggata ccaatgaagg gaaaagtata atttttggat gtagtttgtt 8160  
 tgttcatcta tgggcaaact acgtccaaag ccgtttccaa atctgctaaa aagtatatcc 8220  
 tttctaaaat caaagtcaag tatgaaatca taaataaagt ttaattttga agttattatg 8280  
 atattatggt tttctattaa aataaattaa gtatatagaa tagtttaata atagtatata 8340  
 cttaatgtga taagtgtctg acagtgtcac agaaaggatg attgttatgg attataagcg 8400  
 gccggccagt gggcaagttg aaaaattcac aaaaatgtgg tataatatct ttgttcatta 8460  
 gagcgataaa cttgaatttg agagggaaact tagatggtat ttgaaaaaat tgataaaaat 8520  
 agttggaaca gaaaagagta ttttgaccac tactttgcaa gtgtaccttg tacctacagc 8580  
 atgaccgtaa aagtggatat cacacaaata aaggaaaagg gaatgaaact atacctgca 8640  
 atgctttatt atattgcaat gattgtaaac cgccattcag agtttaggac ggcaatcaat 8700  
 caagatggtg aattggggat atatgatgag atgataccaa gctatacaat atttcacaat 8760  
 gatactgaaa cattttccag ctttggact gagtgaagt ctgactttaa atcattttta 8820  
 gcagattatg aaagtgatac gcaacggat ggaaacaatc atagaatgga aggaaagcca 8880  
 aatgctccgg aaaacatttt taatgtatct atgataccgt ggtcaacctt cgatggcttt 8940  
 aatctgaatt tgcagaaagg atatgattat ttgattccta tttttactat ggggaaatat 9000  
 tataaagaag ataacaaaat tatacttctt ttggcaattc aagttcatca cgcagtatgt 9060  
 gacggatttc acatttgccg ttttgtaaac gaattgcagg aattgataaa tagttaactt 9120  
 caggtttgtc tgtaactaaa aacaagtatt taagcaaaaa catcgtagaa atacggtggt 9180  
 ttttgttacc ctaagttt 9198

- <210> 85
- <211> 6841
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 674 984 T3

<220>

<223> plásmido pMTL83245-Pfor-FS-idi

<400> 85

aaactccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga	60
gcgctagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta	120
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa	180
gagctaccaa ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact	240
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca	300
tacctcgctc tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt	360
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg	420
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag	480
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggtat	540
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat	600
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg	660
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc	720
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac	780
cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc	840
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgcga gggccccctg caggataaaa	900
aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat tttttatca ggaaacagct	960
atgaccgcgg ccgcaatatg atatttatgt ccattgtgaa agggattata ttcaactatt	1020
attccagtta cgttcataga aattttcctt tctaaaaat tttattccat gtcaagaact	1080
ctgtttattt cattaagaa ctataagtac aaagtataag gcatttgaaa aaataggcta	1140
gtatattgat tgattattta ttttaaatg cctaagttaa atatatacat attataacaa	1200
taaaataagt attagttag gatttttaaa tagagtatct attttcagat taaatttttg	1260
attatttgat ttacattata taatattgag taaagtattg actagcaaaa ttttttgata	1320
ctttaatttg tgaaatttct tatcaaaagt tatatttttg aataattttt attgaaaaat	1380
acaactaaaa aggattatag tataagtgtg tgtaattttg tgttaaattt aaagggagga	1440
aatgaacatg aaacatatgg tgaccatgat tacgaattcg agctcggtag ccggggatcc	1500
tctagttgta tattaataa gtagaataca taagatactt aatttaatta aagatagtta	1560

5

ES 2 674 984 T3

agtacttttc aatgtgcttt tttagatggt taatacaaat ctttaattgt aaaagaaatg	1620
ctgtactatt tactgttcta gtgacgggat taaactgtat taattataaa taaaaataa	1680
gtacagtgtt ttaaaattat attttgtatt aaactaata gtacgatgta agttatttta	1740
tactattgct agtttaataa aaagatttaa ttatatactt gaaaaggaga ggaactcgag	1800
atggaattta gagtacattt acaggcagac aacgaacaga aaatatttca aatcaaagt	1860
aaaccagagc cagaagcatc atatcttata aatcaaagaa gaagtgctaa ttataaacca	1920
aacatttggg aaaacgattt tcttgcacag tctttaatat caaaatatga tggatgaa	1980
tatagaaaac tttcagaaaa gttaatagaa gaagtaaaga tatacatatc agcagagact	2040
atggatttag ttgctaaatt agaacttata gattctgta gaaaacttgg acttgctaat	2100
ctttttgaga aagaaataaa ggaagcatta gacagtatag cagcaataga atcagataat	2160
ttaggaacta gagacgatct ttatggaaca gctcttcatt ttaagattct tagacagcat	2220
ggatataagg taagtcaaga tatatttggg agatttatgg atgagaaagg aacattagaa	2280
aatcatcact ttgcacactt aaaaggaatg ttagaattat ttgaggcaag taatcttggg	2340
tttgaaggtg aagacatatt agatgaagct aaagcatctc ttacacttgc tcttagagat	2400
tcaggacata tttgttatcc agactcaaac ttaagtagag atgtagttca tagtttagaa	2460
ttacctagtc atagaagagt tcaatggttc gatgtaaaat ggcagattaa tgcatacгаа	2520
aaagatattt gtagagtaaа tgcaacttta ttagagttag caaagttaaа ttttaatggt	2580
gttcaagctc agcttcagaa gaatcttaga gaagctagta gatggtgggc taatcttggg	2640
ttcgcagata atttaaagtt tgctagagat agacttgtag agtgtttttc atgcgcagta	2700
gggtagcat ttgaaccaga gcattcatct tttagaatat gtttaactaa ggtaattaat	2760
cttgttctta ttatagatga tgtatacgat atatatggat ctgaagaaga gttaaaacat	2820
tttacaatg ctgttgatag atgggacagt agagaacag aacagcttcc tgaatgcatg	2880
aaaatgtggt ttcaagtatt atataacact acttgcgaaa tagcaagaga gatagaagaa	2940
gaaaacgggt ggaatcaagt attacctcaa cttactaagg tttgggctga tttttgtaag	3000
gctcttttag ttgaagcaga gtggtacaat aaatcacata ttccaacatt agaagaatat	3060
cttagaaacg gatgtatatc aagtagtgta tctgtacttt tagttcactc tttcttttca	3120
ataactcatg aaggtaaaaa agaaatggct gatttcttac ataaaaatga agatctttta	3180
tacaacataa gtcttatagt aagattaaac aatgatttag gtacatcagc tgctgaacag	3240
gaaagaggtg attctccttc ttctatagtt tgctatatga gagaagttaa tgcttctgaa	3300
gagactgcaa gaaagaatat aaagggaatg attgataatg cttggaaaaa ggttaatgga	3360
aatgtttca caactaacca agttccattt ctttcatcat tcatgaataa tgcaactaac	3420
atggcaagag tagcacactc attatataaa gacggtgatg gttttggtga tcaagaaaaa	3480
ggacctagaa cacatattct tagtttatta ttccaacct tagtaaatta actgcagggt	3540
tcaaacata gattaaaaaa ttaaaggagg ggaaaaaatg gcagagtata taatagcagt	3600



ES 2 674 984 T3

agatgagttc gataacgaaa taggatcaat agaaaagatg gaagctcata gaaaaggaaac 3660  
 acttcataga gcattcagta ttttagtttt taactcaaag aatcaacttt tattacagaa 3720  
 aagaaatgta aagaaatata actctccagg attatggaca aacacttggt gtagtcaccc 3780  
 aagatatggt gaatctcttc atgatgctat atacagaaga ttaaaagaag agatgggatt 3840  
 tacttgcgaa cttgaagaag tattctcatt catatataag gtaaaacttg aagataattt 3900  
 atttgagaat gaatatgacc atgtatttat tggtaaatat gatggtgaga taattgttaa 3960  
 taaagatgaa gttgatgatt ttaaattgggt agacattaat gaagttaaaa aggacataat 4020  
 agaaagacct gaggcataata cttactgggt taagtatctt gtaaataaag ctgaaaataa 4080  
 gatatttaaa taaaagcttg gcaactggccg tcgttttaca acgctcgtgac tgggaaaacc 4140  
 ctggcgttac ccaacttaat cgccttgag cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata 4200  
 gcgaagaggc cgcaccgat cgccttccc aacagttgag cagcctgaat ggcaatggc 4260  
 gctagcataa aaataagaag cctgcatttg caggcttctt atttttatgg cgcgcccca 4320  
 ttattttttt gaacaattga caattcattt cttatttttt attaatgat agtcaaaagg 4380  
 cataacagtg ctgaatagaa agaaatttac agaaaagaaa attatagaat ttagtatgat 4440  
 taattatact catttatgaa tgtttaattg aatacaaaaa aaaatacttg ttatgtattc 4500  
 aattacgggt taaaatatag acaagttgaa aaatttaata aaaaaataag tcctcagctc 4560  
 ttatatatta agctaccaac ttagtatata agccaaaact taaatgtgct accaacacat 4620  
 caagccgta gagaactcta tctatagcaa tatttcaaat gtaccgacat acaagagaaa 4680  
 cattaactat atatattcaa ttatgagat tatcttaaca gatataaatg taaattgcaa 4740  
 taagtaagat ttagaagttt atagcctttg tgtattggaa gcagtagca aaggcttttt 4800  
 ttttgataa aaattagaag tatatttatt ttttcataat taatttatga aaatgaaagg 4860  
 gggtagcaaa agtgacagag gaaagcagta tcttatcaaa taacaaggta ttagcaatat 4920  
 cattattgac tttagcagta aacattatga cttttatagt gctttagct aagtagtacg 4980  
 aaagggggag ctttaaaaag ctcttggaa tacatagaat tcataaatta atttatgaaa 5040  
 agaagggcgt atatgaaaac ttgtaaaaat tgcaaagagt ttattaaaga tactgaaata 5100  
 tgcaaaaatac attcgttgat gattcatgat aaaacagtag caacctattg cagtaaatac 5160  
 aatgagtaaa gatggttaca taaagggaaa gtccaatgta ttaattgttc aaagatgaac 5220  
 cgatagggat ggtgtgccat aaaaatgaga tgttttacag aggaagaaca gaaaaagaa 5280  
 cgtacatgca ttaaataatta tgcaaggagc tttaaaaaag ctcatgtaaa gaagagtaaa 5340  
 aagaaaaaat aatttattta ttaatttaat attgagagtg ccgacacagt atgcactaaa 5400  
 aaatatactt gtggtgtagt gagccgatac aaaaggatag tcaactcgcat tttcataata 5460  
 catcttatgt tatgattatg tgtcgggtggg acttcacgac gaaaaccac aataaaaaaa 5520  
 gagttcgggg tagggttaag catagttgag gcaactaaac aatcaagcta ggatagcag 5580  
 tagcagaccg taaggtcgtt gtttaggtgt gttgtaatac atacgctatt aagatgtaaa 5640

ES 2 674 984 T3

aatacggata ccaatgaagg gaaaagtata atttttggat gtagtttggt tgttcatcta 5700  
 tgggcaaaact acgtccaag cegtttccaa atctgctaaa aagtatatcc tttctaaaat 5760  
 caaagtcaag tatgaaatca taataaagt ttaattttga agttattatg atattatggt 5820  
 tttctattaa aataaattaa gtatatagaa tagtttaata atagtatata cttaatgtga 5880  
 taagtgtctg acagtgtcac agaaaggatg attgttatgg attataagcg gccggccgaa 5940  
 gcaaaacttaa gagtgtgttg atagtgcagt atcttaaaat tttgtataat aggaattgaa 6000  
 gttaaattag atgctaaaaa tttgtaatta agaaggagtg attaccatgaa caaaaatata 6060  
 aatatattctc aaaacttttt aacgagtgaa aaagtactca accaaataat aaaacaattg 6120  
 aattttaaag aaaccgatac cgtttacgaa attggaacag gtaaagggca tttacgacg 6180  
 aaactggcta aaataagtaa acaggtaacg tctattgaat tagacagtca tctattcaac 6240  
 ttatcgtcag aaaaattaaa actgaatact cgtgtcactt taattcacca agatattcta 6300  
 cagtttcaat tccctaacaa acagaggat aaaattggtg ggagtattcc ttaccattta 6360  
 agcacacaaa ttattaaaaa agtggttttt gaaagccatg cgtctgacat ctatctgatt 6420  
 gttgaagaag gattctacaa gcgtaccttg gatattcacc gaacactagg gttgctcttg 6480  
 cacactcaag tctcgattca gcaattgctt aagctgccag cggaatgctt tcatcctaaa 6540  
 ccaaaaagtaa acagtgtctt aataaaaactt acccgccata ccacagatgt tccagataaa 6600  
 tattggaagc tatatacgta ctttgtttca aaatgggtca atcgagaata tcgtcaactg 6660  
 tttactaaaa atcagtttca tcaagcaatg aaacacgcc aagtaaacaa ttttaagtacc 6720  
 gttacttatg agcaagtatt gtctattttt aatagttatc tattatttaa cgggaggaaa 6780  
 taattctatg agtgcgtttt gtaaatttgg aaagttacac gttactaaag ggaatgtggt 6840  
 t 6841

<210> 86  
 <211> 36  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido idi\_F2

<400> 86  
 aggcaactga gatggcagag tatataatag cagtag 36

10 <210> 87  
 <211> 47  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido idi\_R2

<400> 87  
 aggcgcaagc ttggcgcacc ggttattta aatatcttat tttcagc 47

20 <210> 88  
 <211> 5075  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> plásmido pMTL83245-Pfor-idi

ES 2 674 984 T3

<400> 88  
aaactccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 60  
gcgctagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 120  
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 180  
gagctaccaa ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
tacctcgctc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 360  
accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
ggttcgtgca cacagcccag ctgggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480  
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggtg 540  
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat 600  
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 660  
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 720  
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcttatt cccctgattc tgtggataac 780  
cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc 840  
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca gggccccctg caggataaaa 900  
aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat tttttatca ggaaacagct 960  
atgaccgcgg ccgcaatatg atatttatgt ccattgtgaa agggattata ttcaactatt 1020  
attccagtta cgttcataga aattttcctt tctaaaatat tttattccat gtcaagaact 1080  
ctgtttattt cattaagaa ctataagtac aaagtataag gcatttgaaa aaataggcta 1140  
gtatattgat tgattattha ttttaaaatg cctaagttaa atatatacat attataacaa 1200  
taaaataagt attagtgtag gatttttaa tagagtatct attttcagat taaatttttg 1260  
attatttgat ttacattata taatattgag taaagtattg actagcaaaa ttttttgata 1320  
ctttaatttg tgaaatttct tatcaaaagt tatatttttg aataattttt attgaaaaat 1380  
acaactaaaa aggattatag tataagtgtg tgtaattttg tgttaaattt aaagggagga 1440  
aatgaacatg aaacatatgg tgaccatgat tacgaattcg agctcggtag ccggggatcc 1500  
tctagttgta tattaataa gtagaatata taagatactt aatttaatta aagatagtta 1560  
agtacttttc aatgtgcttt tttagatgtt taatacaaat ctttaattgt aaaagaaatg 1620  
ctgtactatt tactgttcta gtgacgggat taaactgtat taattataaa taaaaataa 1680  
gtacagttgt ttaaaattat attttgattt aaatctaata gtacgatgta agttatttta 1740  
tactattgct agtttaataa aaagatttaa ttatatactt gaaaaggaga ggaactcgag 1800

ES 2 674 984 T3

atggcagagt atataatagc agtagatgag ttcgataacg aaataggatc aatagaaaag 1860  
atggaagctc atagaaaagg aacacttcat agagcattca gtattttagt ttttaactca 1920  
aagaatcaac ttttattaca gaaaagaaat gtaaagaaat atcactctcc aggattatgg 1980  
acaaacactt gttgtagtca cccaagatat ggtgaatctc ttcgatgatc tatatacaga 2040  
agattaaaag aagagatggg atttacttgc gaacttgaag aagtattctc attcatatat 2100  
aaggtaaaac ttgaagataa tttatgtgag aatgaatatg accatgtatt tattggtaaa 2160  
tatgatggtg agataattgt taataaagat gaagttgatg attttaaagtg ggtagacatt 2220  
aatgaagtta aaaaggacat aatagaaaga cctgaggcat atacttactg gtttaagtat 2280  
cttgtaaata aagctgaaaa taagatattt aaataaacgg gtgcgccaag cttggcactg 2340  
gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg ttaccaact taatcgccct 2400  
gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct 2460  
tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgctagc ataaaaataa gaagcctgca 2520  
tttgaggct tcttattttt atggcgcgcc gccattattt ttttgaacaa ttgacaattc 2580  
atctcttatt ttttattaag tgatagtcaa aaggcataac agtgctgaat agaaagaaat 2640  
ttacagaaaa gaaaattata gaatttagta tgattaatta tactcattta tgaatgttta 2700  
attgaataca aaaaaaaaaa cttgttatgt attcaattac gggttaaaat atagacaagt 2760  
tgaaaaattt aataaaaaaa taagtcctca gctcttatat attaagctac caacttagta 2820  
tataagccaa aacttaaatg tgctaccaac acatcaagcc gttagagaac tctatctata 2880  
gcaatatttc aaatgtaccg acatacaaga gaaacattaa ctatatatat tcaatttatg 2940  
agattatctt aacagatata aatgtaaatt gcaataagta agatttagaa gtttatagcc 3000  
tttgtgtatt ggaagcagta cgcaaaggct ttttatttg ataaaaatta gaagtatatt 3060  
tattttttca taattaattt atgaaaatga aagggggtga gcaaagtac agaggaaagc 3120  
agtatcttat caaataacaa ggtattagca atatcattat tgactttagc agtaaacatt 3180  
atgactttta tagtgcttgt agctaagtag tacgaaaggg ggagctttaa aaagctcctt 3240  
ggaatacata gaattcataa attaatattat gaaaagaagg gcgtatatga aaacttgtaa 3300  
aaattgcaaa gagtttatta aagatactga aatattgcaa atacattcgt tgatgattca 3360  
tgataaaaca gtagcaacct attgcagtaa atacaatgag tcaagatggt tacataaagg 3420  
gaaagtccaa tgtattaatt gttcaaagat gaaccgatat ggatgggtg ccataaaaat 3480  
gagatgtttt acagaggaag aacagaaaaa agaacgtaca tgcattaaat attatgcaag 3540  
gagctttaa aaagctcatg taaagaagag taaaagaaa aaataattta tttattaatt 3600  
taatattgag agtgccgaca cagtatgcac taaaaaatat atctgtggtg tagtgagccg 3660  
atacaaaagg atagtcactc gcattttcat aatacatctt atgttatgat tatgtgtcgg 3720  
tgggacttca cgacgaaaac ccacaataaa aaaagagttc ggggtagggt taagcatagt 3780  
tgaggcaact aaacaatcaa gctaggatat gcagtagcag accgtaaggt cgttgtttag 3840

ES 2 674 984 T3

gtgtgttgta atacatcgc tattaagatg taaaaatcgc gataccaatg aagggaaaag 3900  
tataatTTTT ggatgtagtt tgTTTgttca tctatgggca aactacgtcc aaagccgttt 3960  
ccaaatctgc taaaaagtat atcctttcta aaatcaaagt caagtatgaa atcataaata 4020  
aagTTtaatt ttgaagttat tatgatatta tgTTTTtcta ttaaaataaa ttaagtatat 4080  
agaatagttt aataatagta tatacttaat gtgataagtg tctgacagtg tcacagaaag 4140  
gatgattgtt atggattata agcggccggc cgaagcaaac ttaagagtgt gttgatagtg 4200  
cagtatctta aaTTTTgta taataggaat tgaagttaa ttagatgcta aaaTTTTgta 4260  
atfaagaagg agtgattaca tgaacaaaa tataaaatat tctcaaaact tTTtaacgag 4320  
tgaaaaagta ctcaaccaa taataaaaca attgaattta aaagaaaccg ataccgttta 4380  
cgaaattgga acaggtaaag ggcatttaac gacgaaactg gctaaaataa gtaaacaggt 4440  
aacgtctatt gaattagaca gtcatctatt caacttatcg tcagaaaaat taaaactgaa 4500  
tactcgtgtc actTTaattc accaagatat tctacagttt caattcccta acaaacagag 4560  
gtataaaatt gttgggagta ttctttacca tTTaagcaca caaattatta aaaaagtggg 4620  
TTTTgaaagc catgctctg acatctatct gattgttgaa gaaggattct acaagcgtac 4680  
cttgatatt caccgaacac tagggttgct cttgcacact caagtctcga ttcagcaatt 4740  
gcttaagctg ccagcggaaat gctttcatcc taaacaaaa gtaaacagtg tcttaataaa 4800  
acttaccgc cataccacag atgttccaga taaatattgg aagctatata cgtactttgt 4860  
ttcaaatgg gtcaatcgag aatatcgtca actgtttact aaaaatcagt tTcatcaagc 4920  
aatgaaacac gccaaagtaa acaatTTaag taccgttact tatgagcaag tattgtctat 4980  
TTTTaatagt tatctattat ttaacgggag gaaataattc tatgagtcgc tTTtgtaaat 5040  
ttggaaagtt acacgttact aaagggaaatg tgTTT 5075

<210> 89  
<211> 6662  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> plásmido pMTL83245-Pfor-idi-FS

<400> 89  
aaactccttt ttgataatct catgacaaa atcccTTaac gtgagTTTTc gttccactga 60  
gCGtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctTTTTt tctgcgcgta 120  
atctgctgct tgcaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgTTt gccggatcaa 180  
gagctaccaa ctctTTTTcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
tacctcgtc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 360  
accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480

10

ES 2 674 984 T3

cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta 540  
 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat 600  
 ctttatagtc ctgtcggggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 660  
 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 720  
 ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac 780  
 cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgcgca gccgaacgac cgagcgcagc 840  
 gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca gggccccctg caggataaaa 900  
 aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat ttttttatca ggaaacagct 960  
 atgaccgagg ccgcaatag atatttatgt ccattgtgaa agggattata ttcaactatt 1020  
 attccagtta cgttcataga aattttctt tctaaaatat tttattccat gtcaagaact 1080  
 ctgtttattt cattaagaa ctataagtac aaagtataag gcatttgaaa aaataggcta 1140  
 gtatatgatg tgattattta ttttaaatg cctaagttaa atatatacat attataacaa 1200  
 taaaataagt attagttagg gatttttaaa tagagtatct attttcagat taaattttg 1260  
 attatttgat ttacattata taatattgag taaagtattg actagcaaaa ttttttgata 1320  
 ctttaatttg tgaaatttct tatcaaaagt tatatttttg aataattttt attgaaaaat 1380  
 acaactaaaa aggattatag tataagtgtg tgtaattttg tgtaaaattt aaagggagga 1440  
 aatgaacatg aaacatatgg tgaccatgat tacgaattcg agctcggtag ccggggatcc 1500  
 tctagttgta tattaataa gtagaataca taagatactt aatttaatta aagatagtta 1560  
 agtacttttc aatgtgcttt tttagatggt taatacaaat ctttaattgt aaaagaaatg 1620  
 ctgtactatt tactgttcta gtgacgggat taaactgtat taattataaa taaaaataa 1680  
 gtacagttgt ttaaaattat attttgattt aaatctaata gtacgatgta agttatttta 1740  
 tactattgct agtttaataa aaagatttaa ttatatactt gaaaaggaga ggaactcgag 1800  
 atggcagagt atataatagc agtagatgag ttcgataacg aaataggatc aatagaaaag 1860  
 atggaagctc atagaaaagg aacacttcat agagcattca gtattttagt ttttaactca 1920  
 aagaatcaac ttttattaca gaaaagaaat gtaagaaat atcactctcc aggattatgg 1980  
 acaaacactt gttgtagtca cccaagatat ggtgaatctc ttcgatgagc tatatacaga 2040  
 agattaaaag aagagatggg atttacttg cgaacttgaag aagtattctc attcatatat 2100  
 aaggtaaac ttgaagataa tttatttgag aatgaatag accatgtatt tattggtaaa 2160  
 tatgatggtg agataattgt taataaagat gaagttgatg attttaaatg ggtagacatt 2220  
 aatgaagtta aaaaggacat aatagaaaga cctgaggcat atacttactg gtttaagtat 2280  
 cttgtaaata aagctgaaaa taagatattt aaataaacgg gtgcccgaag cttttaaagg 2340  
 aggggaaaaa atggaattta gagtacattt acaggcagac aacgaacaga aaatatttca 2400  
 aaatcaaatg aaaccagagc cagaagcatc atatcttata aatcaagaa gaagtgctaa 2460  
 ttataacca aacatttggg aaaacgattt tcttgatcag tctttaatat caaaatatga 2520

ES 2 674 984 T3

tggatgatgaa tatagaaaac tttcagaaaa gttaatagaa gaagtaaaga tatacatatc 2580  
 agcagagact atggatttag ttgctaaatt agaacttata gattctgtta gaaaacttgg 2640  
 acttgctaact ctttttgaga aagaaataaa ggaagcatta gacagtatag cagcaataga 2700  
 atcagataat ttaggaacta gagacgatct ttaatggaaca gctcttcatt ttaagattct 2760  
 tagacagcat ggatataagg taagtcaaga tatatttggg agatttatgg atgagaaagg 2820  
 aacattagaa aatcatcact ttgcacactt aaaaggaatg ttagaattat ttgaggcaag 2880  
 taatcttggg tttgaagggt aagacatatt agatgaagct aaagcatctc ttacacttgc 2940  
 tcttagagat tcaggacata tttgttatcc agactcaaac ttaagtagag atgtagttca 3000  
 tagtttagaa ttacctagtc atagaagagt tcaatgggtc gatgtaaaat ggcagattaa 3060  
 tgcatacgaa aaagatattt gtagagtaaa tgcaacttta ttagagttag caaagttaaa 3120  
 ttttaagtgt gttcaagctc agcttcagaa gaatcttaga gaagctagta gatggtgggc 3180  
 taatcttggg ttcgcagata atttaaagtt tgctagagat agacttgtag agtgtttttc 3240  
 atgcgcagta ggtgtagcat ttgaaccaga gcattcatct tttagaatat gtttaactaa 3300  
 ggtaattaat cttgttctta ttatagatga tgtatacgat atatatggat ctgaagaaga 3360  
 gttaaaacat tttacaaatg ctgttgatag atgggacagt agagaaacag aacagcttcc 3420  
 tgaatgcatg aaaatgtggt ttcaagtatt atataacact acttgcgaaa tagcaagaga 3480  
 gatagaagaa gaaaacgggt ggaatcaagt attacctcaa cttactaagg tttgggctga 3540  
 tttttgtaag gctcttttag ttgaagcaga gtggtacaat aatcacata ttccaacatt 3600  
 agaagaatat cttagaacag gatgtatatc aagtagtga tctgtacttt tagttcactc 3660  
 tttcttttca ataactcatg aagggtacaaa agaaatggct gatttcttac ataaaaatga 3720  
 agatctttta tacaacataa gtcttatagt aagattaaac aatgatttag gtacatcagc 3780  
 tgctgaacag gaaagagggt attctccttc ttctatagtt tgctatatga gagaagttaa 3840  
 tgcttctgaa gagactgcaa gaaagaatat aaagggaatg attgataatg cttggaaaaa 3900  
 ggttaatgga aatgtttca caactaacca agttccattt ctttcatcat tcatgaataa 3960  
 tgcaactaac atggcaagag tagcacactc attatataaa gacggtgatg gttttggtga 4020  
 tcaagaaaaa ggacctagaa cacatattct tagtttatta ttccaacctt tagtaaatta 4080  
 agctagcata aaaataagaa gcctgcattt gcaggcttct tatttttatg gcgcgccgcc 4140  
 attatttttt tgaacaattg acaattcatt tcttattttt tattaagtga tagtcaaaag 4200  
 gcataacagt gctgaataga aagaaattta cagaaaagaa aattatagaa tttagtatga 4260  
 ttaattatac tcatttatga atgtttaatt gaatacaaaa aaaaatactt gttatgtatt 4320  
 caattacggg ttaaaatata gacaagtga aaaatttaat aaaaaataa gtcctcagct 4380  
 cttatatatt aagctaccaa cttagtatat aagccaaaac ttaaatgtgc taccaacaca 4440  
 tcaagccgtt agagaactct atctatagca atatttcaaa tgtaccgaca tacaagagaa 4500  
 acattaacta tatatattca atttatgaga ttatcttaac agatataaat gtaaattgca 4560

ES 2 674 984 T3

ataagtaaga tttagaagtt tatagccttt gtgtattgga agcagtacgc aaaggctttt 4620  
 ttatttgata aaaattagaa gtatatttat tttttcataa ttaatttatg aaaatgaaag 4680  
 ggggtgagca aagtgacaga ggaaagcagt atcttatcaa ataacaaggt attagcaata 4740  
 tcattattga ctttagcagt aacattatg acttttatag tgctttagc taagtagtac 4800  
 gaaaggggga gctttaaaaa gctccttgga atacatagaa ttcataaatt aatttatgaa 4860  
 aagaagggcg tatatgaaaa cttgtaaaaa ttgcaaagag tttattaaag atactgaaat 4920  
 atgcaaaata cattcgttga tgattcatga taaaacagta gcaacctatt gcagtaaata 4980  
 caatgagtca agatgtttac ataaaggaa agtccaatgt attaattggt caaagatgaa 5040  
 ccgatatgga tgggtgcca taaaaatgag atgttttaca gaggaagaac agaaaaaga 5100  
 acgtacatgc attaaatatt atgcaaggag ctttaaaaaa gctcatgtaa agaagagtaa 5160  
 aaagaaaaa taattttattt attaatataa tattgagagt gccgacacag tatgcactaa 5220  
 aaaatatac tgtggtgtag tgagccgata caaaaggata gtcactcgca ttttcataat 5280  
 acatcttatg ttatgattat gtgtcgggtg gacttcacga cgaaaacca caataaaaaa 5340  
 agagttcggg gtagggtaa gcatagttga ggcaactaaa caatcaagct aggatatgca 5400  
 gtagcagacc gtaaggtcgt tgtttagggtg tgttgaata catagctat taagatgtaa 5460  
 aaatacggat accaatgaag ggaaaagtat aatttttggga tgtagtttgt ttgttcatct 5520  
 atgggcaaac tacgtccaaa gccgtttcca aatctgctaa aaagtatatc ctttctaaaa 5580  
 tcaaaagtcaa gtatgaaatc ataaataaag tttaatattg aagtattat gatattatgt 5640  
 ttttctatta aaataaatta agtatataga atagtttaat aatagtatat acttaatgtg 5700  
 ataagtgtct gacagtgtca cagaaaggat gattgttatg gattataagc ggccggccga 5760  
 agcaaaactta agagtgtggt gatagtgagc tatcttaaaa ttttgataa taggaattga 5820  
 agttaaatta gatgctaaaa atttgtaatt aagaaggagt gattacatga acaaaaatat 5880  
 aaaatattct caaaactttt taacgagtga aaaagtact aaccaataa taaaacaatt 5940  
 gaatttaaaa gaaaccgata ccgtttacga aattggaaca ggtaaagggc atttaacgac 6000  
 gaaactggct aaaataagta aacaggtaac gtctattgaa ttagacagtc atctattcaa 6060  
 cttatcgtca gaaaaattaa aactgaatac tcgtgtcact ttaattcacc aagatattct 6120  
 acagtttcaa ttccctaaca aacagaggta taaaattggt gggagtattc cttaccattt 6180  
 aagcacacia attattaaaa aagtgtttt tgaagccat gcgtctgaca tctatctgat 6240  
 tgttgaagaa ggattctaca agcgtacctt ggatattcac cgaacactag ggttgctctt 6300  
 gcacactcaa gtctcgattc agcaattgct taagctgcca gcggaatgct ttcactctaa 6360  
 accaaaagta aacagtgtct taataaaact taccgccat accacagatg ttccagataa 6420  
 atattggaag ctatatacgt actttgtttc aaaatgggtc aatcgagaat atcgtcaact 6480  
 gtttactaaa aatcagtttc atcaagcaat gaaacacgcc aaagtaaca atttaagtac 6540  
 cgttacttat gagcaagtat tgtctatttt taatagttat ctattattta acgggaggaa 6600  
 ataattctat gagtcgcttt tgtaaattg gaaagttaca cgttactaaa gggaatgtgt 6660  
 tt 6662

5

<210> 90  
 <211> 7077  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> plásmido pMTL83245-Pfor-idi-ispA-FS



ES 2 674 984 T3

<400> 90  
aaactccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 60  
gcgtagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 120  
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 180  
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
tacctcgctc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 360  
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480  
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggtg 540  
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat 600  
ctttatagtc ctgctggggt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 660  
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc 720  
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcttatt cccctgattc tgtggataac 780  
cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc 840  
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca gggccccctg caggataaaa 900  
aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat ttttttatca ggaaacagct 960  
atgaccgagg ccgaccgag actagttgta tattaaaata gtagaataca taagatactt 1020  
aatttaatta aagatagtta agtacttttc aatgtgcttt tttagatggt taatacaaat 1080  
ctttaattgt aaaagaaatg ctgtactatt tactgttcta gtgacgggat taaactgtat 1140  
taattataaa taaaaaataa gtacagttgt ttaaaattat attttgtatt aaatctaata 1200  
gtacgatgta agttatttta tactattgct agtttaataa aaagatttaa ttatatactt 1260  
gaaaaggaga ggaactcgag atggcagagt atataatagc agtagatgag ttcgataacg 1320  
aataggatc aatagaaaag atggaagctc atagaaaagg aacacttcat agagattca 1380  
gtattttagt ttttaactca aagaatcaac ttttattaca gaaaagaaat gtaaagaaat 1440  
atcactctcc aggattatgg acaaacactt gttgtagtca cccaagatat ggtgaatctc 1500  
ttcatgatgc tatatacaga agattaaaag aagagatggg atttacttgc gaacttgaag 1560  
aagtattctc attcatatat aaggtaaaac ttgaagataa tttatttgag aatgaatatg 1620

ES 2 674 984 T3

accatgtatt tattggtaaa tatgatggtg agataattgt taataaagat gaagttgatg	1680
atlttaaatg ggtagacatt aatgaagtta aaaaggacat aatagaaaga cctgaggcat	1740
atacttactg gtttaagtat cttgtaaata aagctgaaaa taagatattt aaataaacccg	1800
gtcagtaacg aatagaatta gaaaaacaaa ggaggcaaga caatggattt cccacaacaa	1860
ttagaagcat gtgtaaaaca ggctaatacag gcacttagta gatttattgc tcctcttcct	1920
tttcaaaata caccagtagt agaaactatg caatacggtg cacttttagg tggtaaaga	1980
ttaagaccat tcttagtata tgctacagga cacatgtttg gtgtatcaac taatacttta	2040
gacgctccag ctgctgctgt tgaatgtatt catgcttatt ctttaataca tgatgactta	2100
ccagcaatgg atgacgatga ttttaagaaga ggtttaccta catgtcatgt taaatttggg	2160
gaagctaata caatttttagc aggtgacgct ttacaaactt tagctttttc tatactttca	2220
gatgcagaca tgcctgaagt ttcagataga gatagaattt ctatgatatc agagcttgca	2280
tctgcatcag gaatagctgg aatgtgcggt ggtcaagcac ttgattttaga tgcagaaggt	2340
aaacacgtac cacttgatgc tttagagaga atacatagac ataaaacagg tgctcttata	2400
agagcagcag taagattagg tgctttaagt gctggtgaca agggtagaag agcacttcca	2460
gtacttgata agtatgcaga aagtatagga ttagcttttc aagttcaaga tgacatactt	2520
gacgttggtg gtgatactgc tacttttagga aaaagacagg gtgcagatca gcaattagga	2580
aaatctacat accctgcttt acttggatta gaacaggcta gaaagaaagc aagagactta	2640
atagatgacg caagacaaag tcttaaacag ttagctgaac aatcacttga cacaagtgca	2700
cttgaagcac ttgcagatta tattatacag agaaacaagt aaaagctttt aaaggagggg	2760
aaaaaatgga atttagagta catttacagg cagacaacga acagaaaata tttcaaaatc	2820
aatgaaacc agagccagaa gcatcatatc ttataaatca aagaagaagt gctaattata	2880
aaccaaacat ttgaaaaaac gattttcttg atcagctttt aatatcaaaa tatgatggtg	2940
atgaatatag aaaactttca gaaaagttaa tagaagaagt aaagatatac atatcagcag	3000
agactatgga tttagttgct aaattagaac ttatagattc tggtagaaaa cttggacttg	3060
ctaactttt tgagaaagaa ataaaggaag cattagacag tatagcagca atagaatcag	3120
ataatttagg aactagagac gatctttatg gaacagctct tcattttaag attcttagac	3180
agcatggata taaggtaagt caagatatat ttggtagatt tatggatgag aaaggaacat	3240
tagaaaatca tcactttgca cacttaaaag gaatgttaga attatttgag gcaagtaatc	3300
ttggatttga aggtgaagac atattagatg aagctaaagc atctcttaca cttgctctta	3360
gagattcagg acatatttgt tatccagact caaacttaag tagagatgta gttcatagtt	3420
tagaattacc tagtcataga agagttcaat ggttcgatgt aaaatggcag attaatgcat	3480
acgaaaaaga tatttgtaga gtaaatgcaa ctttattaga gttagcaaag ttaaatttta	3540
atgttgttca agctcagctt cagaagaatc ttagagaagc tagtagatgg tgggctaac	3600
ttggtttcgc agataattta aagtttgcta gagatagact thtagagtgt tttcatgcg	3660

ES 2 674 984 T3

cagtaggtgt agcatttgaa ccagagcatt catcttttag aatatgttta actaaggtaa 3720  
 ttaatcttgt tcttattata gatgatgtat acgatatata tggatctgaa gaagagttaa 3780  
 aacattttac aaatgctgtt gatagatggg acagtagaga aacagaacag cttcctgaat 3840  
 gcatgaaaaat gtgttttcaa gtattatata aactacttg cgaaatagca agagagatag 3900  
 aagaagaaaa cggttggaat caagtattac ctcaacttac taaggtttg gctgattttt 3960  
 gtaaggctct tttagttgaa gcagagtggg acaataaatc acatattcca acattagaag 4020  
 aatatcttag aaacggatgt atatcaagta gtgtatctgt acttttagtt cactctttct 4080  
 tttcaataac tcatgaaggt acaaaagaaa tggctgattt cttacataaa aatgaagatc 4140  
 ttttatacaa cataagctct atagtaagat taaacaatga tttaggtaca tcagctgctg 4200  
 aacaggaaag aggtgattct ccttcttcta tagtttgcta tatgagagaa gttaatgctt 4260  
 ctgaagagac tgcaagaaag aatataaagg gaatgattga taatgcttg aaaaaggtta 4320  
 atggaaaatg tttcacaaact aaccaagttc ctttctttc atcattcatg aataatgcaa 4380  
 ctaacatggc aagagtagca cactcattat ataaagacgg tgatggtttt ggtgatcaag 4440  
 aaaaaggacc tagaacacat attcttagtt tattattcca accttttagta aattaagcta 4500  
 gcataaaaaat aagaagcctg cttttgcagg cttcttattt ttatggcgcg ccgccattat 4560  
 tttttgaac aattgacaat tcatttctta tttttatta agtgatagtc aaaaggcata 4620  
 acagtgtcga atagaaagaa atttacagaa aagaaaatta tagaatttag tatgattaat 4680  
 tatactcatt tatgaatggt taattgaata caaaaaaaaa tacttgttat gtattcaatt 4740  
 acgggttaaa atatagacaa gttgaaaaat ttaataaaaa aataagtcct cagctcttat 4800  
 atattaagct accaacttag tatataagcc aaaacttaaa tgtgctacca acacatcaag 4860  
 ccgtagaga actctatcta tagcaatatt tcaaatgtac cgacatacaa gagaaacatt 4920  
 aactatata attcaattta tgagattatc ttaacagata taaatgtaaa ttgcaataag 4980  
 taagatttag aagtttatag cttttgtgta ttggaagcag tacgcaaagg cttttttatt 5040  
 tgataaaaaat tagaagtata tttatTTTTT cataattaat ttatgaaaat gaaagggggt 5100  
 gagcaaagtg acagaggaaa gcagtatctt atcaataaac aaggatttag caatatcatt 5160  
 attgacttta gcagtaaaca ttatgacttt tatagtgctt gtagctaagt agtacgaaag 5220  
 ggggagcttt aaaaagctcc ttggaataca tagaattcat aaattaattt atgaaaagaa 5280  
 gggcgtatat gaaaacttgt aaaaattgca aagagtttat taaagatact gaaatatgca 5340  
 aaatacattc gttgatgatt catgataaaa cagtagcaac ctattgcagt aaatacaatg 5400  
 agtcaagatg tttacataaa gggaaagtcc aatgtattaa ttgttcaaag atgaaccgat 5460  
 atggatgggt tgccataaaa atgagatggt ttacagagga agaacagaaa aaagaacgta 5520  
 catgcattaa atattatgca aggagcttta aaaaagctca tgtaaagaag agtaaaaaga 5580  
 aaaaataatt tttttattaa tttaatattg agagtgccga cacagtatgc actaaaaaat 5640  
 atatctgtgg tgtagtgagc cgatacaaaa ggatagtcac tcgcattttc ataatacatc 5700

ES 2 674 984 T3

ttatgttatg attatgtgtc ggtgggactt caccgacgaaa acccacaata aaaaaagagt 5760  
tcggggtagg gtttaagcata gttgaggcaa ctaaacaatc aagctaggat atgcagtagc 5820  
agaccgtaag gtcggtgttt aggtgtgttg taatacatac gctattaaga tgtaaaaata 5880  
cggataccia tgaagggaaa agtataattt ttggatgtag tttgtttggt catctatggg 5940  
caactacgt ccaaagccgt ttccaaatct gctaaaaagt atatcctttc taaaatcaaa 6000  
gtcaagtatg aaatcataaa taaagtttaa ttttgaagtt attatgatat tatgtttttc 6060  
tattaaata aattaagtat atagaatagt ttaataatag tatatactta atgtgataag 6120  
tgtctgacag tgtcacagaa aggatgattg ttatggatta taagcggccg gccgaagcaa 6180  
acttaagagt gtgttgatag tgcagtatct taaaattttg tataatagga attgaagtta 6240  
aattagatgc taaaaatttg taattaagaa ggagtgatta catgaacaaa aatataaaat 6300  
attctcaaaa ctttttaacg agtgaaaaag tactcaacca aataataaaa caattgaatt 6360  
taaaagaaac cgataccggt tacgaaattg gaacaggtaa agggcattta acgacgaaac 6420  
tggctaaaat aagtaaacag gtaacgtcta ttgaattaga cagtcaccta ttcaacttat 6480  
cgtcagaaaa attaaaactg aatactcgtg tcactttaat tcaccaagat attctacagt 6540  
ttcaattccc taacaaacag aggtataaaa ttgttggag tattccttac catttaagca 6600  
caciaaattat taaaaaagtg gtttttgaaa gccatgcgct tgacatctat ctgattgttg 6660  
aagaaggatt ctacaagcgt accttgata ttcaccgaac actaggggtg ctcttgaca 6720  
ctcaagtctc gattcagcaa ttgcttaagc tgccagcggg atgctttcat cctaaaccaa 6780  
aagtaaacag tgtcttaata aaacttacc gccataccac agatgttcca gataaatatt 6840  
ggaagctata tacgtacttt gtttcaaaat gggcaatcg agaataatcg caactgttta 6900  
ctaaaaatca gtttcatcaa gcaatgaaac acgccaaagt aaacaattta agtaccgtta 6960  
cttatgagca agtattgtct atttttaata gttatctatt atttaacggg aggaaataat 7020  
tctatgagtc gcttttgtaa atttgaaag ttacacgta ctaaagggaa tgtgttt 7077

<210> 91  
<211> 10090  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> plásmido pMTL 8314-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS

<400> 91  
aaactccttt ttgataatct catgacaaa atcccctaac gtgagttttc gttccactga 60  
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 120  
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 180  
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
tacctcgtc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 360

10

ES 2 674 984 T3

accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480  
 cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggta 540  
 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat 600  
 ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 660  
 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc 720  
 ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac 780  
 cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc 840  
 gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca gggccccctg caggataaaa 900  
 aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat ttttttatca ggaaacagct 960  
 atgaccgcgg ccgctaggtc tagaatatcg atacagataa aaaaatatat aatacagaag 1020  
 aaaaaattat aaattttggt tataatataa agtatagtaa ttttaagtta aacctcgtga 1080  
 aaacgctaac aaataatagg aggtcaattg atgatagctg ttccatttaa cgctggaaaa 1140  
 ataaaagttt taattgaggc attagaatct ggaattatt catcaataaa atcagatgta 1200  
 tatgacggaa tgttatatga tgcaccagat caccttaaat cattagtaa cagatttgta 1260  
 gaacttaata atataactga gccattagca gtaactatac agacaaatct tcctcctca 1320  
 agaggctctg gatctagtc agctgttgct gttgcttttg taagagcaag ttatgatctc 1380  
 ttaggaaaaa gtttaactaa agaagagctt atagaaaagg ctaattgggc tgaacaaata 1440  
 gctcatggaa agccatctgg aatagataca caaacaatag tatctggaaa gcctgtttgg 1500  
 tttcaaaagg gacatgcaga aacacttaaa actctttcac ttgatggata catggtagta 1560  
 attgatacag gtgttaaagg aagtacaaga caggctgtag aagatgttca taaactttgc 1620  
 gaagatcctc aatatatgag tcacgtaaaa cacataggaa aacttgact tagagcatct 1680  
 gatgttattg aacatcataa ctttgaagca cttgctgata tattcaatga atgtcatgct 1740  
 gatttaaagg ctcttacagt aagtcatgac aaaatagaac agttaatgaa gataggaaaa 1800  
 gaaaatggtg ctatagctgg taaattaact ggtgctggta gaggtgggtc aatgttatta 1860  
 cttgcaaaag acttaccaac tgcaagaat atagttaaag cagtagagaa agctggtgca 1920  
 gcacatactt ggattgaaaa tttaggtggt taagtcgaca aagacactaa aaaattataa 1980  
 aagtaaagga ggacattaaa tgatacaagt aaaggcacca ggaaaattat atatagcagg 2040  
 tgaatagcct gttacagaac caggatataa atctgttctt atagctcttg atagatttgt 2100  
 tacagctact attgaggaag ctgatcaata caaaggaaca atacattcaa aggcattaca 2160  
 tcacaatcca gtaactttta gtagagatga agattctatt gttatatcag acccacacgc 2220  
 agcaaaacaa cttaattatg tagtaactgc tatagaaata tttgagcaat atgcaaaatc 2280  
 atgtgacata gcaatgaagc attttcattt aactatagat tctaacttag atgatagtaa 2340  
 tggacataag tatggacttg gatcttctgc tgcgttttta gtttcagtaa ttaaagtact 2400

ES 2 674 984 T3

taacgaatth tatgatatga aactttcaaa cttttatata tataagttag cagtaattgc 2460  
 taatatgaaa ttacagagtt tatcttcatg cggatgatata gcagtaagtg tttattcagg 2520  
 ttggttagct tattctacat ttgacatga atgggtaaaa caccagatag aagatacaac 2580  
 agttgaagaa gtacttatta aaaattggcc tggattacac atagagccac ttcaagctcc 2640  
 tgaaaaatag gaagttctta taggttgac aggtagtcca gctagtagtc ctcatthtgt 2700  
 ttctgaagtt aaaagactta agtcagatcc ttcattttac ggtgatttct tagaagattc 2760  
 acatagatgt gtagaaaaat taattcatgc attcaaaact aataatatta aggggtgtca 2820  
 gaaaatggta agacagaata gaactattat acaaagaatg gataaggaag caacagttga 2880  
 tatagagact gagaagttaa aatatttatg tgatattgct gaaaaatatt atgggtgcaag 2940  
 taaaacttca ggtgctgggt gtgggtgattg cggataaact ataataaata aggatgtaga 3000  
 caaagagaaa atatatgatg aatggactaa acatggaata aagcctctta agtttaatat 3060  
 ttatcatgga caataacat ggtcaataat ctacaataa ataaaagaaa ggaggcaaaa 3120  
 atatgataaa atctgaaaa gcaagagcac aactaatat agcacttata aatattggg 3180  
 gtaagaaaga tgaggcatta ataataccea tgaataact aatatcagta actttagaaa 3240  
 agttttatac tgaacaaaa gttacattta acgatcagct tactcaagat caattttggc 3300  
 ttaatgggtga aaaagtttct ggaaaagaat tagaaaagat ttcaaagtat atggatattg 3360  
 ttgaaaatag agctggaata gattggatg ctgagataga atctgataat tttgttctta 3420  
 cagctgctgg tcttgctagt tctgctagt cttatgcagc attagctgct gcatgtaacc 3480  
 aagcacttga tttacagtta agtgataaag acttaagtag attagctaga attggatcag 3540  
 gatcagcatc aagatcaata tacgggtggt ttgcagaatg ggaaaaagga tataatgacg 3600  
 aaacttctta tgctgttcca ttagaaagta atcactttga agatgatctt gctatgattt 3660  
 ttgtagtaat aaaccaacat tctaaaaagg ttccttcaag atatggaatg tctcttacia 3720  
 gaaatacaag tagattctat caatattggt tagaccatat tgatgaagat cttgcagaag 3780  
 caaaggcagc aatacaagat aaggatttta agagattagg tgaagttatt gaagagaatg 3840  
 gacttagaat gcatgctaca aatcttggat caactccacc ttttacttac ttagtacaag 3900  
 agtcatacga tgtaatggca ttagtacctg agtgtagaga agcaggatat ccatgctatt 3960  
 tcactatgga tgctggacct aatgtaaaaa tacttgtaga gaagaaaaac aaacaacaga 4020  
 taatagataa acttttaact cagttcgata ataatacagat aatagatagt gatattatag 4080  
 ctacaggtat tgaaattata gaataaacta gttgtatatt aaaatagtag aatacataag 4140  
 atacttaatt taattaaaga tagttaagta cttttcaatg tgctttttta gatgtttaat 4200  
 acaaatcttt aattgtaaaa gaaatgctgt actatttact gttctagtga cgggattaaa 4260  
 ctgtattaat tataaataaa aaataagtac agttgtttaa aattatattt tgtattaaat 4320  
 ctaatagtac gatgtaagtt attttatact attgctagt taataaaaag atttaattat 4380  
 atacttgaag aggagaggaa ctcgagatgg cagagtatat aatagcagta gatgagttcg 4440

ES 2 674 984 T3

ataacgaaat aggatcaata gaaaagatgg aagctcatag aaaaggaaca cttcatagag 4500  
 cattcagtat tttagttttt aactcaaaga atcaactttt attacagaaa agaatgtaa 4560  
 agaaatatca ctctccagga ttatggacaa acacttgttg tagtcacca agatatggtg 4620  
 aatctcttca tgatgctata tacagaagat taaaagaaga gatgggattt acttgccaac 4680  
 ttgaagaagt attctcattc atatataagg taaaacttga agataattta tttgagaatg 4740  
 aatatgacca tgtatttatt ggtaaatatg atggtgagat aattgttaat aaagatgaag 4800  
 ttgatgattt taaatgggta gacattaatg aagttaaaaa ggacataata gaaagacctg 4860  
 aggcatatac ttactggttt aagtatcttg taaataaagc tgaaaataag atatttaaat 4920  
 aaaccggtca gtaacgaata gaattagaaa aacaaaggag gcaagacaat ggatttccca 4980  
 caacaattag aagcatgtgt aaaacaggct aatcaggcac ttagtagatt tattgctcct 5040  
 cttccttttc aaaatacacc agtagtagaa actatgcaat acgggtgcaact tttaggtggt 5100  
 aaaagattaa gaccattctt agtatatgct acaggacaca tgtttggtgt atcaactaat 5160  
 actttagacg ctccagctgc tgctgttgaa tgtattcatg cttattcttt aatacatgat 5220  
 gacttaccag caatggatga cgatgattta agaagaggtt tacctacatg tcatgttaaa 5280  
 tttggtgaag ctaatgcaat ttagcaggt gacgctttac aaacttagc tttttctata 5340  
 ctttcagatg cagacatgcc tgaagtttca gatagagata gaatttctat gatatcagag 5400  
 cttgcatctg catcaggaat agctggaatg tgcggtggtc aagcacttga tttagatgca 5460  
 gaaggtaaac acgtaccact tgatgcttta gagagaatac atagacataa aacaggtgct 5520  
 cttataagag cagcagtaag attaggtgct ttaagtgctg gtgacaaggg tagaagagca 5580  
 cttccagtac ttgataagta tgcagaaagt ataggattag cttttcaagt tcaagatgac 5640  
 atacttgacg ttgttggtga tactgctact ttaggaaaaa gacaggggtgc agatcagcaa 5700  
 ttaggaaaaa ctacataccc tgctttactt ggattagaac aggctagaaa gaaagcaaga 5760  
 gacttaatag atgacgcaag acaaagtctt aaacagttag ctgaacaatc acttgacaca 5820  
 agtgcacttg aagcacttgc agattatatt atacagagaa acaagtaaaa gcttttaag 5880  
 gaggggaaaa aatggaattt agagtacatt tacaggcaga caacgaacag aaaatatttc 5940  
 aaaatcaaat gaaaccagag ccagaagcat catatcttat aaatcaaaga agaagtgcta 6000  
 attataaacc aaacatttg gaaaaacgatt ttcttgatca gtctttaata tcaaatatg 6060  
 atggtgatga atatagaaaa ctttcagaaa agttaataga agaagtaaag atatacatat 6120  
 cagcagagac tatggattta gttgctaaat tagaacttat agattctggt agaaaacttg 6180  
 gacttgctaa tctttttgag aaagaaataa aggaagcatt agacagtata gcagcaatag 6240  
 aatcagataa tttaggaact agagacgatc tttatggaac agctcttcat tttagattc 6300  
 ttagacagca tggatataag gtaagtcaag atatatttg tagatttatg gatgagaaag 6360  
 gaacattaga aaatcatcac tttgcacact taaaaggaat gttagaatta tttgaggcaa 6420  
 gtaatcttgg atttgaaggt gaagacatat tagatgaagc taaagcatct cttacacttg 6480

ES 2 674 984 T3

ctcttagaga ttcaggacat atttgttatt cagactcaaa ctttaagtaga gatgtagttc 6540  
 atagttaga attacctagt catagaagag ttcaatgggt cgatgtaaaa tggcagatta 6600  
 atgcatacga aaaagatatt tgtagagtaa atgcaacttt attagagtta gcaaagttaa 6660  
 attttaattgt tgttcaagct cagcttcaga agaactcttag agaagctagt agatggtggg 6720  
 ctaatcttgg tttcgcagat aatttaaagt ttgctagaga tagacttgta gagtgtttt 6780  
 catgctcagt aggtgtagca tttgaaccag agcattcatt ttttagaata tgtttaacta 6840  
 aggtaattaa tcttgttctt attatagatg atgtatacga tatatatgga tctgaagaag 6900  
 agttaaaca ttttacaat gctgttgata gatgggacag tagagaaaca gaacagcttc 6960  
 ctgaatgcat gaaaatgtgt tttcaagtat tatataacac tacttgcgaa atagcaagag 7020  
 agatagaaga agaaaacggt tggaatcaag tattacctca acttactaag gtttgggctg 7080  
 atttttgtaa ggctctttta gtgaagcag agtggtaaca taaatcacat attccaacat 7140  
 tagaagaata tcttagaac ggatgtatat caagtagtgt atctgtactt ttagttcact 7200  
 ctttcttttc aataactcat gaaggtacaa aagaaatggc tgatttctta cataaaaatg 7260  
 aagatctttt atacaacata agtctttag taagattaaa caatgattta ggtacatcag 7320  
 ctgctgaaca ggaaagagg gattctcctt cttctatagt ttgctatatg agagaagtta 7380  
 atgcttctga agagactgca agaaagaata taaagggat gattgataat gcttggaaaa 7440  
 aggttaattg aaaatgtttc acaactaacc aagttccatt tctttcatca ttcattgaata 7500  
 atgcaactaa catggcaaga gtagcacact cattatataa agacgggat ggttttggtg 7560  
 atcaagaaaa aggacctaga acacatattc ttagtttatt attccaacct ttagtaaatt 7620  
 aagctagcat aaaaataaga agcctgcatt tgcaggcttc ttatttttat ggctgcccgc 7680  
 cattatttt ttgaacaatt gacaattcat ttctatttt ttattaagt atagtcaaaa 7740  
 ggcataacag tgctgaatag aaagaaatt acagaaaaga aaattataga atttagtatg 7800  
 attaatata ctatttatg aatgtttaat tgaatacaaa aaaaaatact tgttatgtat 7860  
 tcaattacgg gttaaaatat agacaagttg aaaaatttaa taaaaaata agtcctcagc 7920  
 tcttatatat taagctacca acttagtata taagccaaaa cttaaatgtg ctaccaacac 7980  
 atcaagccgt tagagaactc tatctatagc aatatttcaa atgtaccgac atacaagaga 8040  
 aacattaact atatatattc aatttatgag attatcttaa cagatataaa tgtaaattgc 8100  
 aataagtaag atttagaagt ttatagcctt tgtgtattgg aagcagtagc caaaggcttt 8160  
 tttatttgat aaaaattaga agtatattta tttttcata attaatatt gaaaatgaaa 8220  
 gggggtgagc aaagtgacag aggaaagcag tatcttatca aataacaagg tattagcaat 8280  
 atcattattg acttttagcag taaacattat gacttttata gtgctttag ctaagtagta 8340  
 cgaaaggggg agctttaaaa agctccttgg aatacataga attcataaat taatttatga 8400  
 aaagaagggc gtatatgaaa acttgtaaaa attgcaaga gtttattaaa gatactgaaa 8460  
 tatgcaaaat acattcgttg atgattcatg ataaaacagt agcaacctat tgcagtaaat 8520



ES 2 674 984 T3

acaatgagtc aagatgttta cataaagga aagtccaatg tattaattgt tcaaagatga 8580  
accgatatgg atggtgtgcc ataaaaatga gatgttttac agaggaagaa cagaaaaaag 8640  
aacgtacatg cattaaatat tatgcaagga gctttaaaaa agctcatgta aagaagagta 8700  
aaaagaaaa ataatttatt tattaattta atattgagag tgccgacaca gtatgacta 8760  
aaaaatatat ctgtggtgta gtgagccgat acaaaaggat agtcactcgc attttcataa 8820  
tacatcttat gttatgatta tgtgtcggtg ggacttcacg acgaaaaccc acaataaaaa 8880  
aagagttcgg ggtagggtta agcatagtgt aggcaactaa acaatcaagc taggatatgc 8940  
agtagcagac cgtaaggctg ttgtttaggt gtgttgtaat acatacgcta ttaagatgta 9000  
aaaatacggg taccaatgaa gggaaaagta taatttttg atgtagtttg tttgttcac 9060  
tatgggcaaa ctacgtccaa agccgtttcc aaatctgcta aaaagtatat cttttctaaa 9120  
atcaaagtca agtatgaat cataaataaa gtttaatttt gaagttatta tgatattatg 9180  
tttttctatt aaaataaatt aagtatatag aatagtttaa taatagtata tacttaatgt 9240  
gataagtgtc tgacagtgtc acagaaagga tgattgttat ggattataag cggccggcca 9300  
gtgggcaagt tgaaaaattc acaaaaatgt ggtataatat ctttgttcat tagagcgata 9360  
aacttgaatt tgagagggaa cttagatggt atttgaaaa attgataaaa atagttggaa 9420  
cagaaaagag tattttgacc actactttgc aagtgtacct tgtacctaca gcatgaccgt 9480  
taaagtggat atcacacaaa taaaggaaaa gggaaatgaaa ctatatcctg caatgcttta 9540  
ttatattgca atgattgtaa accgccattc agagtttagg acggcaatca atcaagatgg 9600  
tgaattgggg atatatgatg agatgatacc aagctataca atatttcaca atgatactga 9660  
aacattttcc agcctttgga ctgagtgtaa gtctgacttt aaatcatttt tagcagatta 9720  
tgaaagtgat acgcaacggt atggaaaca tcatagaatg gaaggaaagc caaatgctcc 9780  
ggaaaacatt tttaatgtat ctatgatacc gtggcaacc ttcgatggct ttaatctgaa 9840  
tttgcagaaa ggatatgatt atttgattcc ttttttact atggggaaat attataaaga 9900  
agataacaaa attatacttc ctttggcaat tcaagttcat cacgcagtat gtgacggatt 9960  
tcacatttgc cgttttgtaa acgaattgca ggaattgata aatagttaac ttcaggtttg 10020  
tctgtaacta aaaacaagta ttttaagcaa aacatcgtag aaatacggtg ttttttgta 10080  
ccctaagttt 10090

<210> 92  
<211> 25  
<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> oligonucleótido repHF

<400> 92  
aagaagggcg tatatgaaaa cttgt 25

10 <210> 93  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> oligonucleótido catR

<400> 93  
ttcgtttaca aaacggcaaa tgtga 25

<210> 94  
<211> 20

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido MK-RTPCR-F  
  
 5 <400> 94  
 gtgctgtag aggtggtca 20  
  
 <210> 95  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido MK-RTPCR-R  
  
 <400> 95  
 ccaagtatgt gctgcaccag 20  
  
 15 <210> 96  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> oligonucleótido PMK-RTPCR-F  
  
 <400> 96  
 atatcagacc cacacgcagc 20  
  
 <210> 97  
 <211> 24  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido PMK-RTPCR-R  
  
 <400> 97  
 30 aatgctcat tgctatgca catg 24  
  
 <210> 98  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> oligonucleótido PMD-RTPCR-F  
  
 <400> 98  
 gcagaagcaa aggagcaat 20  
  
 <210> 99  
 40 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido PMD-RTPCR-R  
  
 <400> 99  
 45 ttgatccaag attgtagca tgc 23  
  
 <210> 100  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido idi-RTPCR-F  
  
 <400> 100  
 ggacaaacac ttgtgtagt cacc 24  
  
 5 <210> 101  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 10 <223> oligonucleótido idi-RTPCR-R  
  
 <400> 101  
 tcaagtcgc aagtaaacc ca 22  
  
 <210> 102  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido ispA-RTPCR-F  
  
 <400> 102  
 20 accagcaatg gatgacgatg 20  
  
 <210> 103  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> oligonucleótido ispA-RTPCR-R  
  
 <400> 103  
 agttgtaaa gcgtcacctg c 21  
  
 <210> 104  
 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido FS-RTPCR-F  
  
 <400> 104  
 35 aagctagtag atggtgggct 20  
  
 <210> 105  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido FS-RTPCR-R  
  
 <400> 105  
 aatgctacac ctactgcgca 20  
  
 <210> 106  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 50 <223> oligonucleótido ermB-F

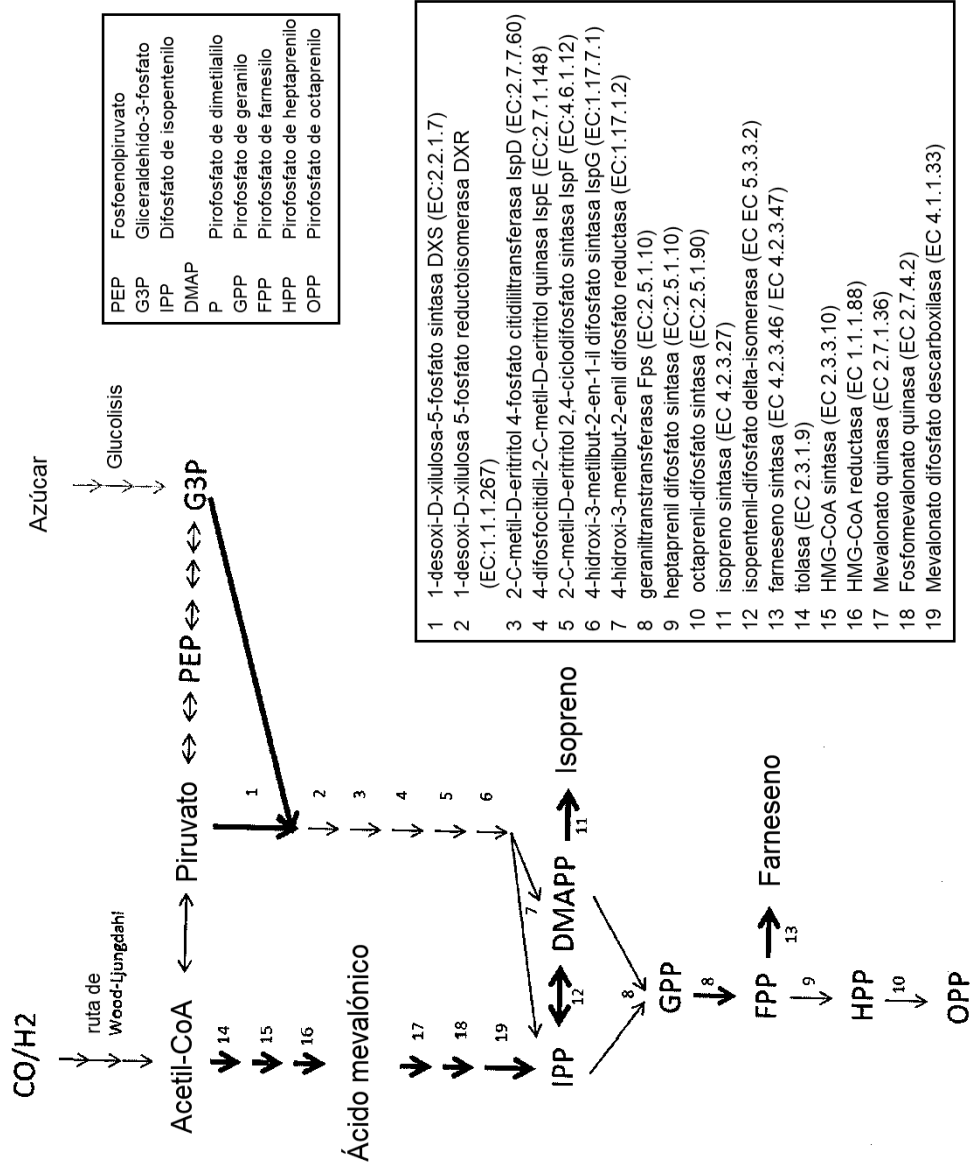
<400> 106  
 tttgtaatta agaaggag 18  
  
 <210> 107  
 <211> 18  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido ermB-R  
  
 <400> 107  
 10 gtagaatcct tctcaac 18  
  
 <210> 108  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> oligonucleótido GnK-F  
  
 <400> 108  
 tcaggacctt ctggaactgg 20  
  
 20 <210> 109  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido GnK-R  
  
 25 <400> 109  
 acctcccctt ttctggaga 20  
  
 <210> 110  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido FOT4L-F  
  
 <400> 110  
 caggttcgg tgctgaccta 20  
  
 35 <210> 111  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 40 <223> oligonucleótido FOT4L-F  
  
 <400> 111  
 aactccgccg ttgtattca 20

## REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de uno o más terpenos y/o sus precursores, por fermentación microbiana, comprendiendo el método proporcionar un sustrato gaseoso que comprende CO a un biorreactor que contiene un cultivo de una bacteria acetógena carboxidotrófica recombinante y fermentar el cultivo para producir uno o más terpenos y/o sus precursores a partir del sustrato gaseoso,
- 5 en donde el terpeno o su precursor se selecciona del grupo que consiste en ácido mevalónico, pirofosfato de isopentenilo (IPP), pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), isopreno, pirofosfato de geranilo (GPP), pirofosfato de farnesilo (FPP), y farneseno.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el terpeno o su precursor se selecciona del grupo que consiste en pirofosfato de geranilo (GPP), pirofosfato de farnesilo (FPP) y farneseno.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en donde la bacteria comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican:
- (a) una enzima en una ruta del mevalonato seleccionada del grupo que consiste en tiolasa (EC 2.3.1.9); HMG-CoA sintasa (EC 2.3.3.10); HMG-CoA reductasa (EC 1.1.1.88); mevalonato quinasa (EC 2.7.1.36); fosfomevalonato quinasa (EC 2.7.4.2); y mevalonato difosfato descarboxilasa (EC 4.1.1.33);
- 15 (b) una enzima en una ruta de la DXS seleccionada del grupo que consiste en 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa DXS (EC:2.2.1.7); 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa DXR (EC:1.1.1.267); 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa IspD (EC:2.7.7.60); 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa IspE (EC:2.7.1.148); 2-C-metil-D-eritritol 2;4-ciclodifosfato sintasa IspF (EC:4.6.1.12); 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa IspG (EC:1.17.7.1); y 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (EC:1.17.1.2); o
- 20 (c) una enzima en una ruta de biosíntesis de terpenos seleccionada del grupo que consiste en geraniltranstransferasa Fps (EC:2.5.1.10); heptaprenil difosfato sintasa (EC:2.5.1.10); octaprenil-difosfato sintasa (EC:2.5.1.90); isopreno sintasa (EC 4.2.3.27); isopentenil-difosfato delta-isomerasa (EC 5.3.3.2); y farneseno sintasa (EC 4.2.3.46 / EC 4.2.3.47).
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en donde la bacteria comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican una enzima en una ruta de biosíntesis de terpenos seleccionada del grupo que consiste en geraniltranstransferasa Fps (EC:2.5.1.10); heptaprenil difosfato sintasa (EC:2.5.1.10); octaprenil-difosfato sintasa (EC:2.5.1.90); isopreno sintasa (EC 4.2.3.27); isopentenil-difosfato delta-isomerasa (EC 5.3.3.2); y farneseno sintasa (EC 4.2.3.46 / EC 4.2.3.47).
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en donde el terpeno o su precursor es el isopreno, y la bacteria comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una isopreno sintasa.
6. El método de la reivindicación 1, en donde el terpeno o su precursor es el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y en donde la bacteria comprende un ácido nucleico exógeno que codifica la isopentenil-difosfato delta-isomerasa.
- 35 7. El método de la reivindicación 1, en donde la bacteria comprende ácidos nucleicos exógenos que codifican la isopreno sintasa, isopentenil-difosfato delta-isomerasa y 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa DXS.
8. El método de la reivindicación 1, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium metilotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii*, y *Thermoanaerobacter kiuvi*.
- 40 9. El método de la reivindicación 8, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium metilotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii*, y *Thermoanaerobacter kiuvi*.
- 45 10. El método de la reivindicación 8, en donde la bacteria es *Clostridium autoethanogenum*.
11. El método de la reivindicación 1, en donde el sustrato gaseoso comprende al menos 20% de CO.
- 50 12. El método de la reivindicación 1, en donde el sustrato gaseoso comprende además al menos uno de CO<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>.
13. El método de la reivindicación 1, en donde el sustrato gaseoso se obtiene de un procedimiento industrial seleccionado del grupo que consiste en fabricación de productos de metales ferrosos, fabricación de productos no

ferrosos, refinación del petróleo, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de humo, producción de amoníaco, producción de metanol y fabricación de coque.

14. El método de la reivindicación 1, en donde el sustrato gaseoso es gas de síntesis.



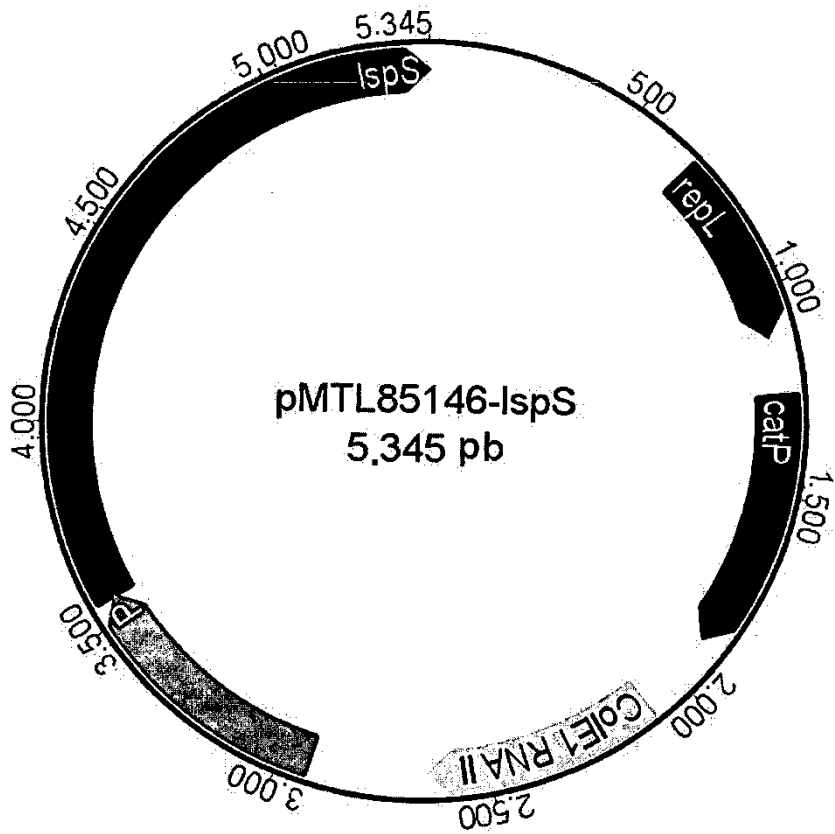


FIG. 2



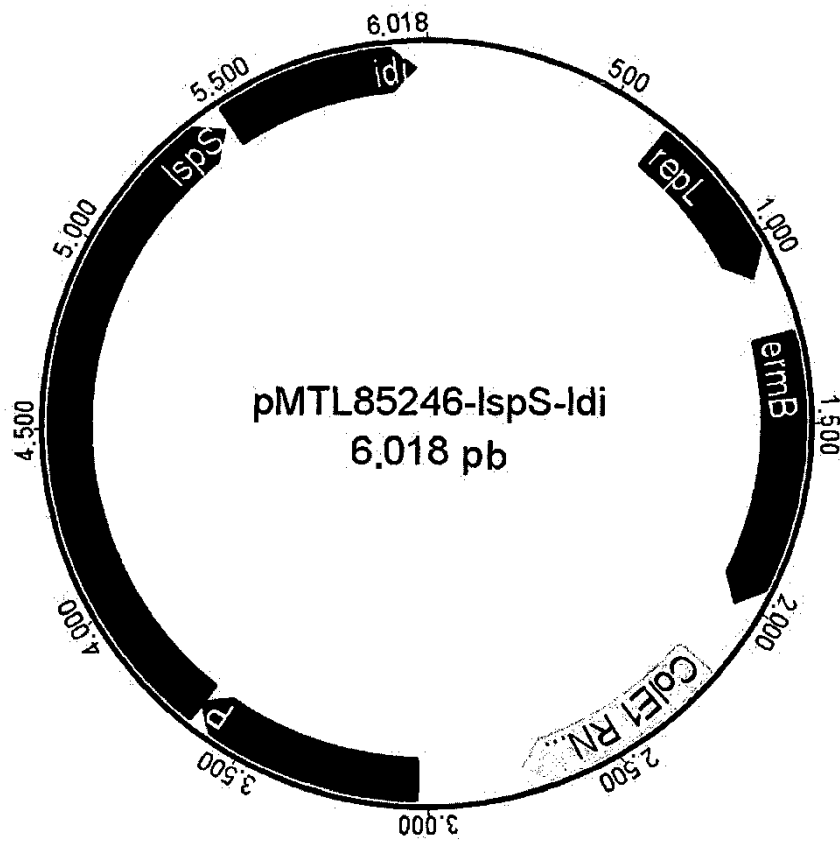


FIG. 3

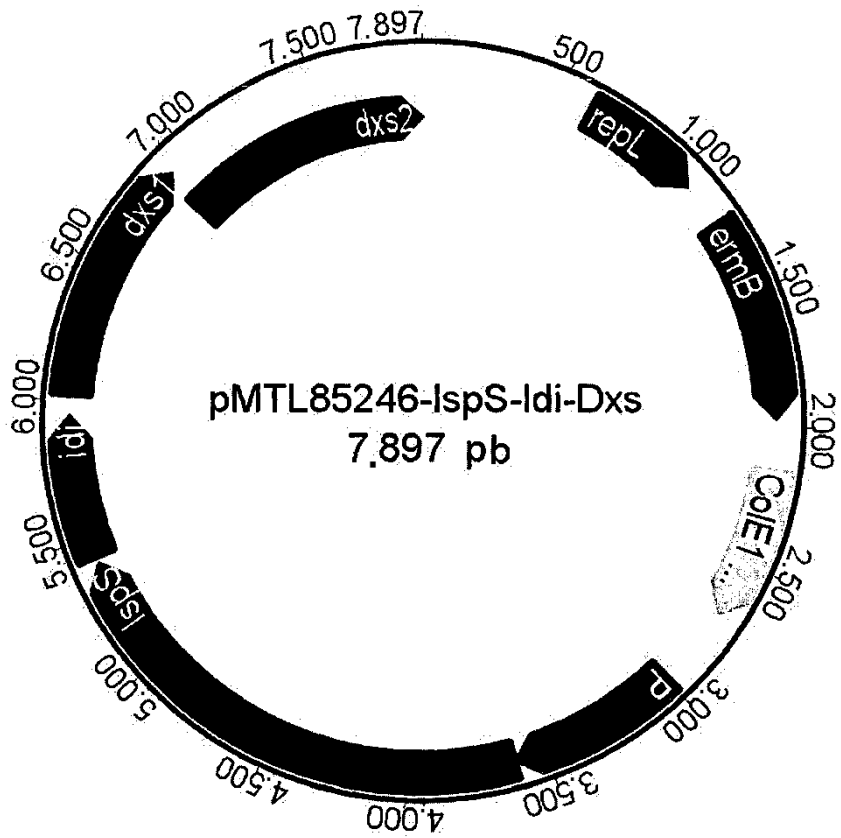
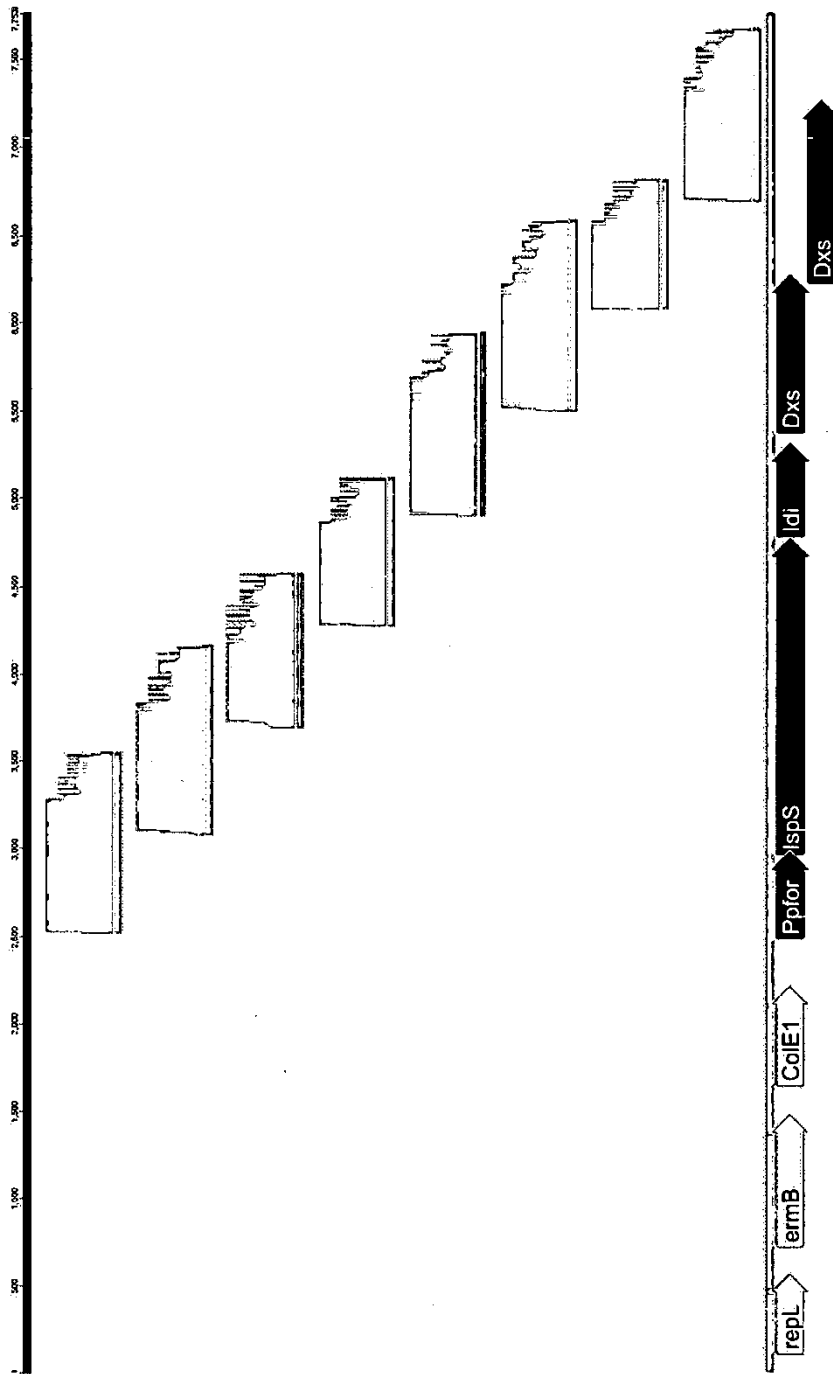


FIG. 4



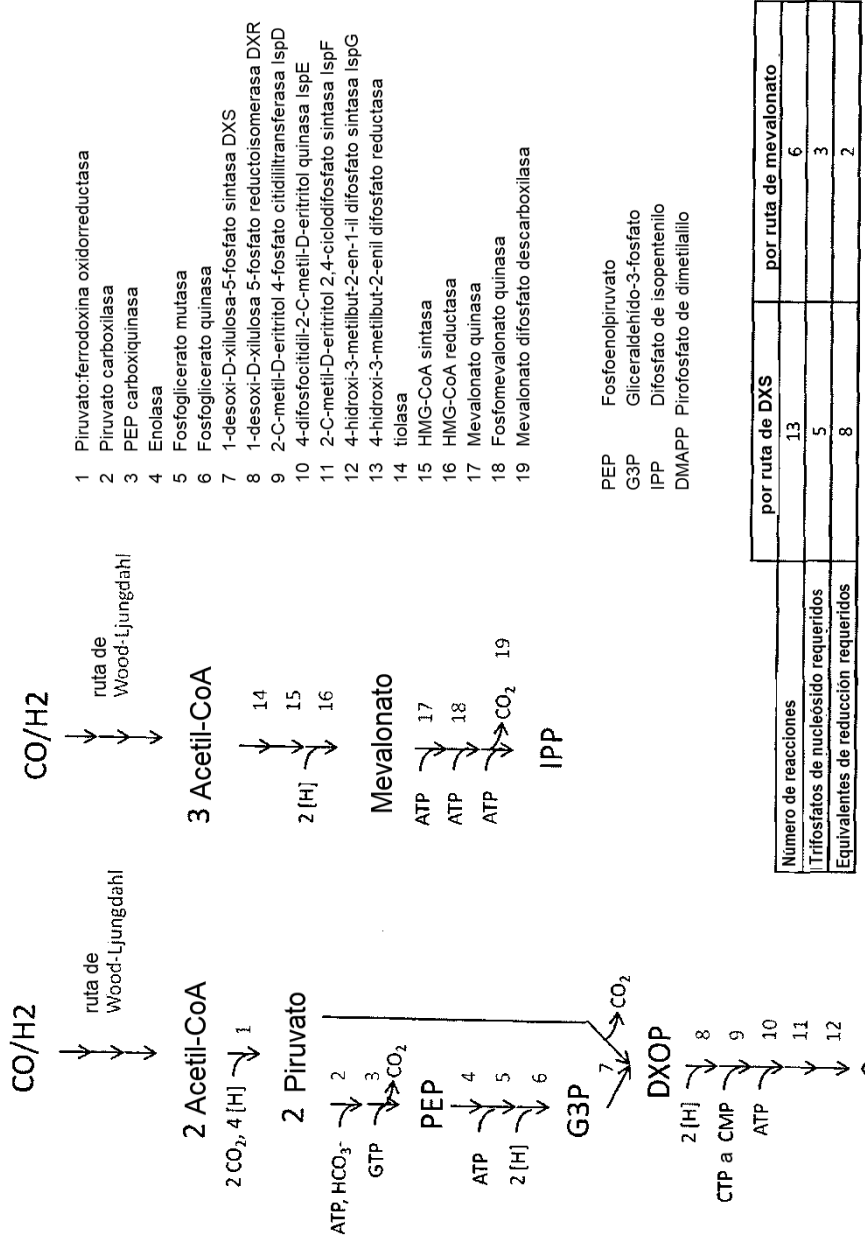


FIG. 6

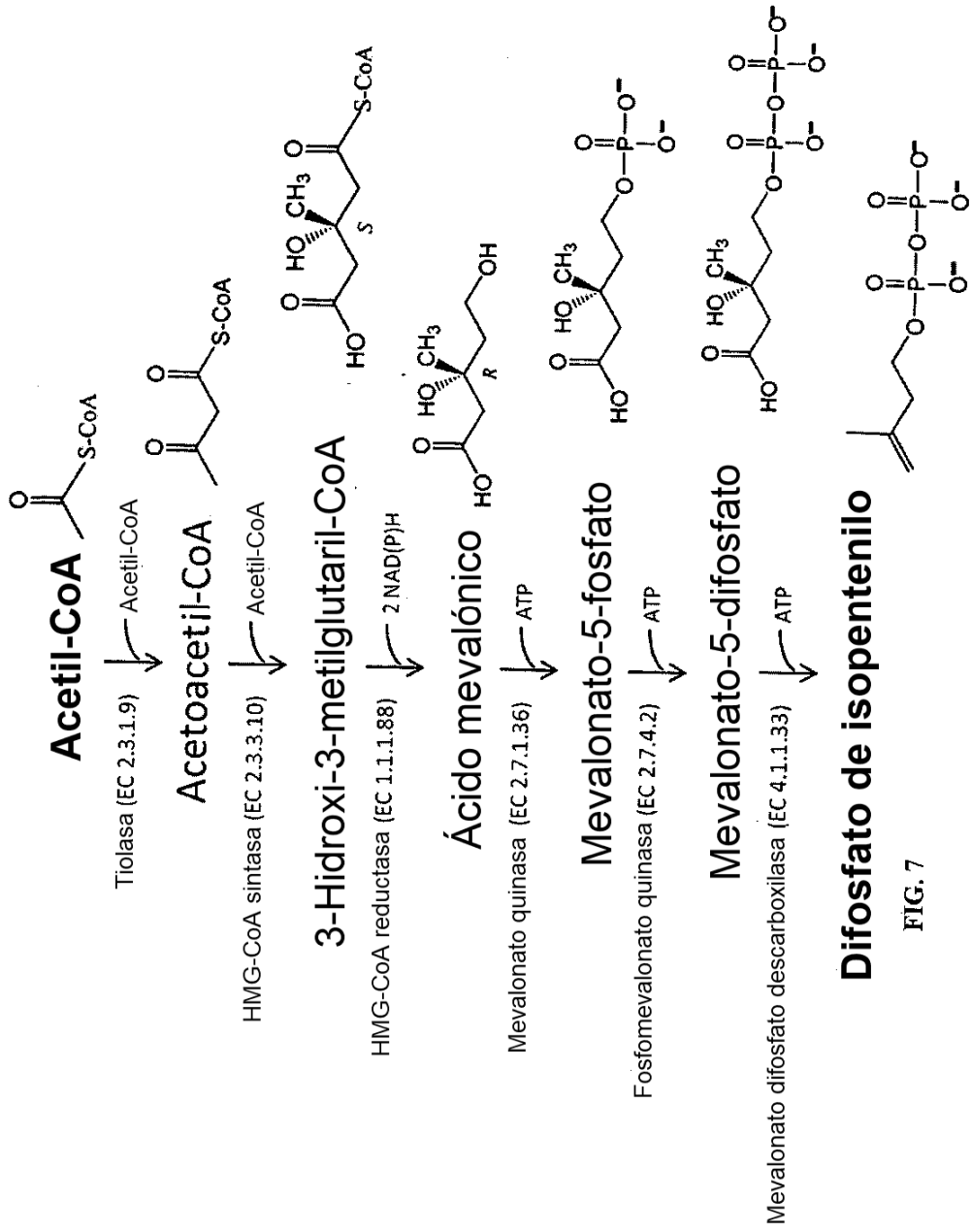


FIG. 7

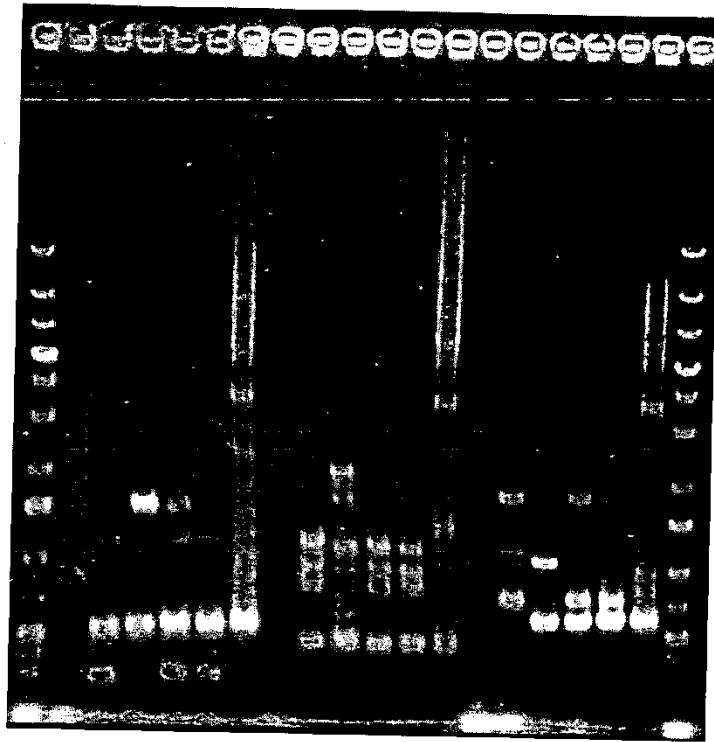
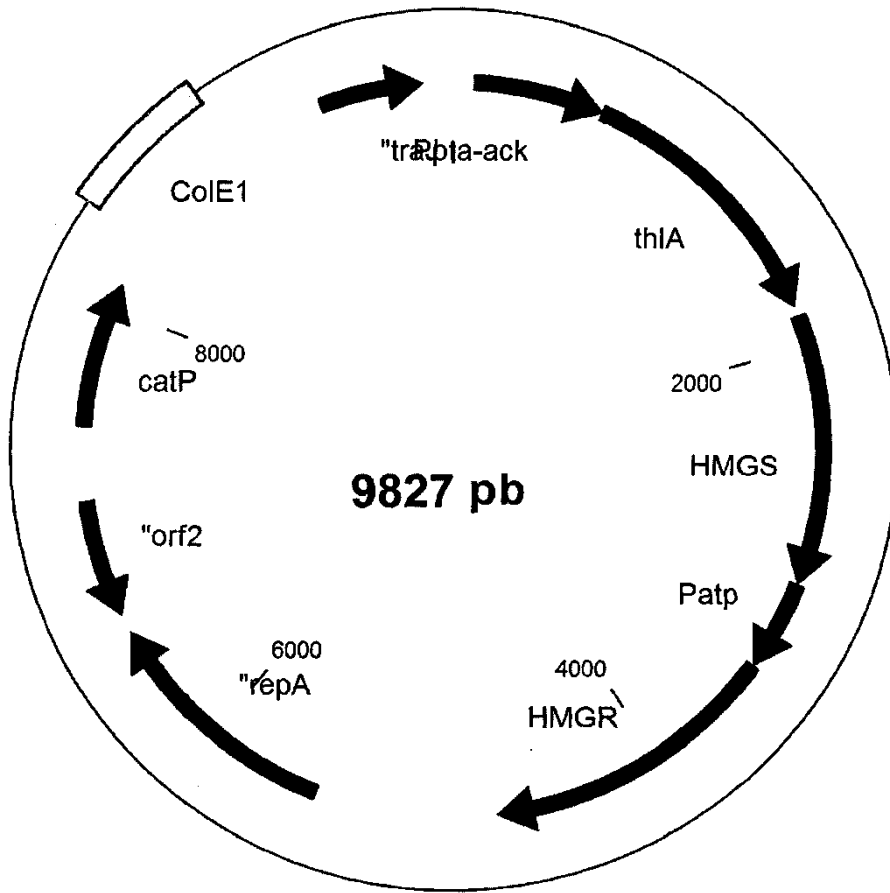


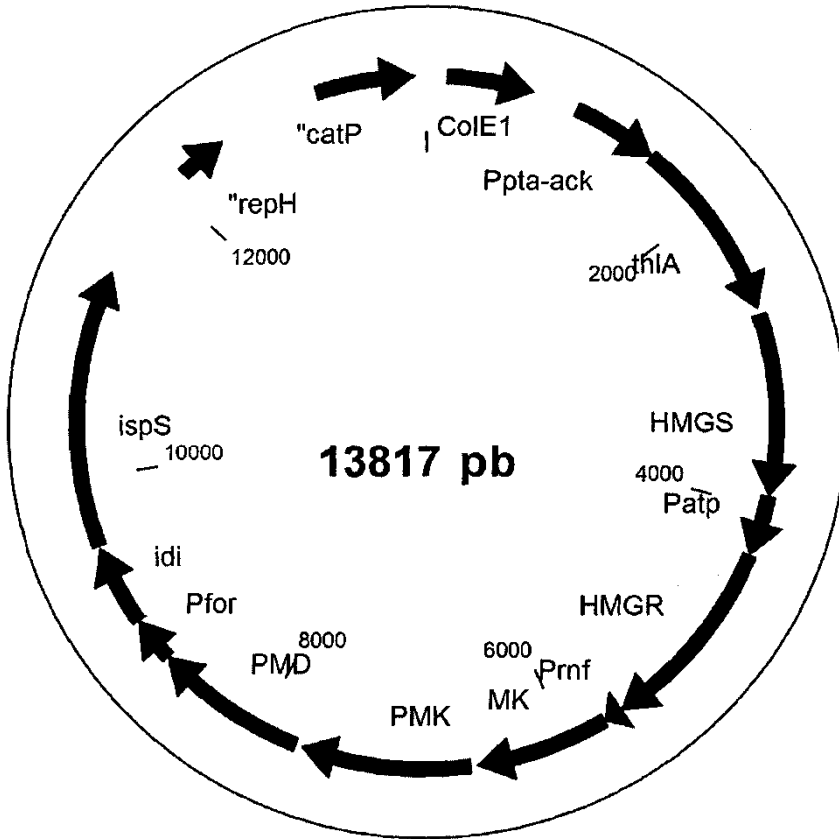
FIG. 8

**pMTL8215-Pptaack-thiA-HMGS-Patp-HMGR**



**FIG. 9**

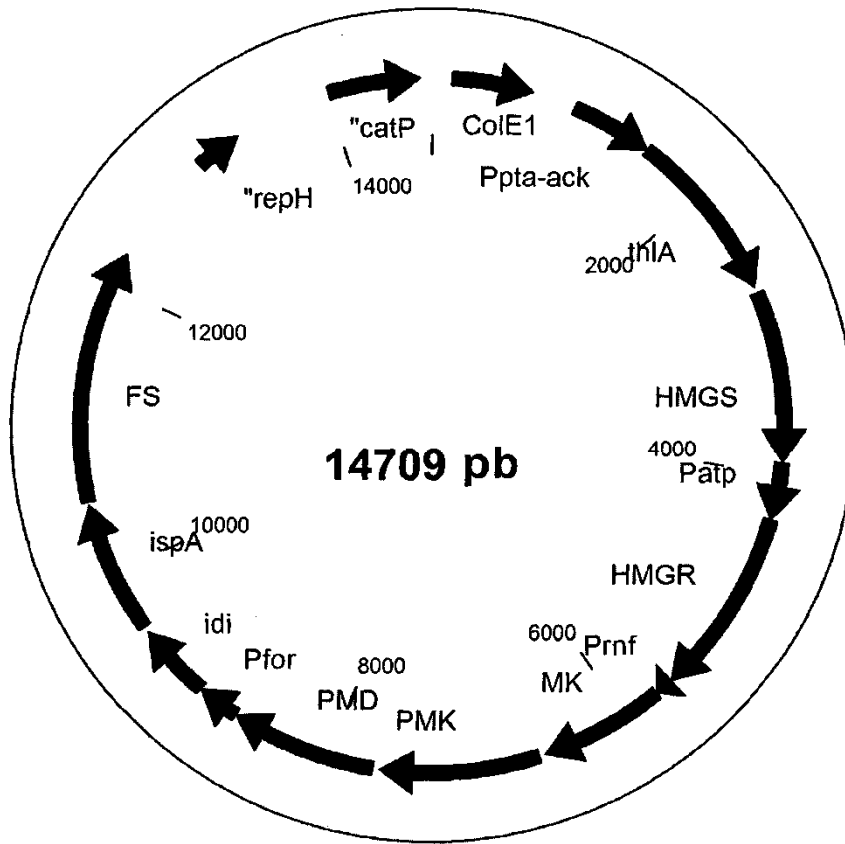
**pMTL83145-thiA-HMGS-Patp-HMGR-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispS**



**FIG. 10**



**pMTL83145-thiA-HMGS-Patp-HMGR-Prnf-MK-PMK-PMD-Pfor-idi-ispA-FS**



**FIG. 11**

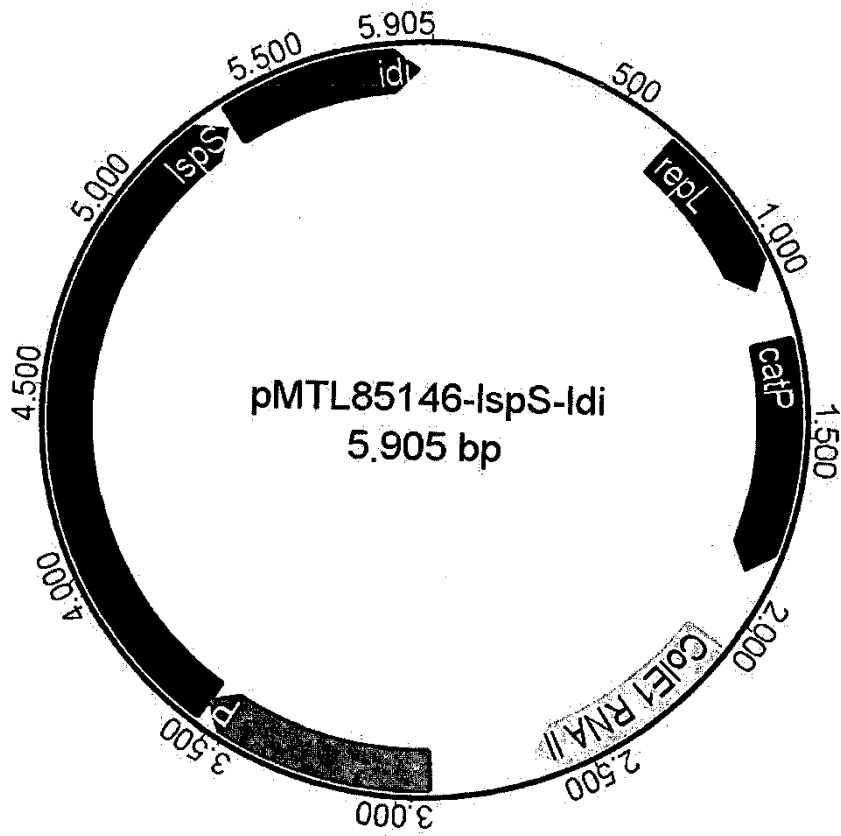
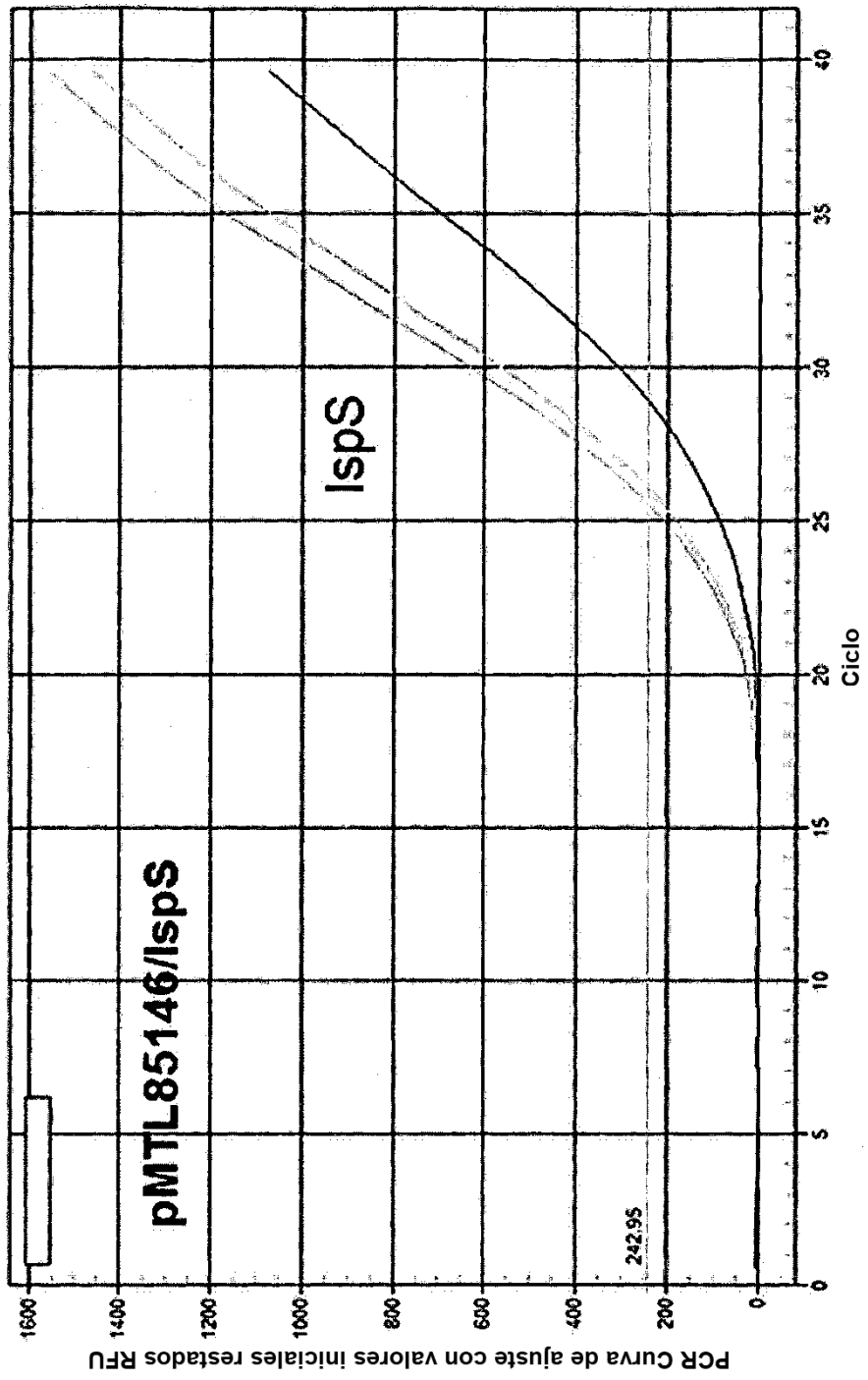
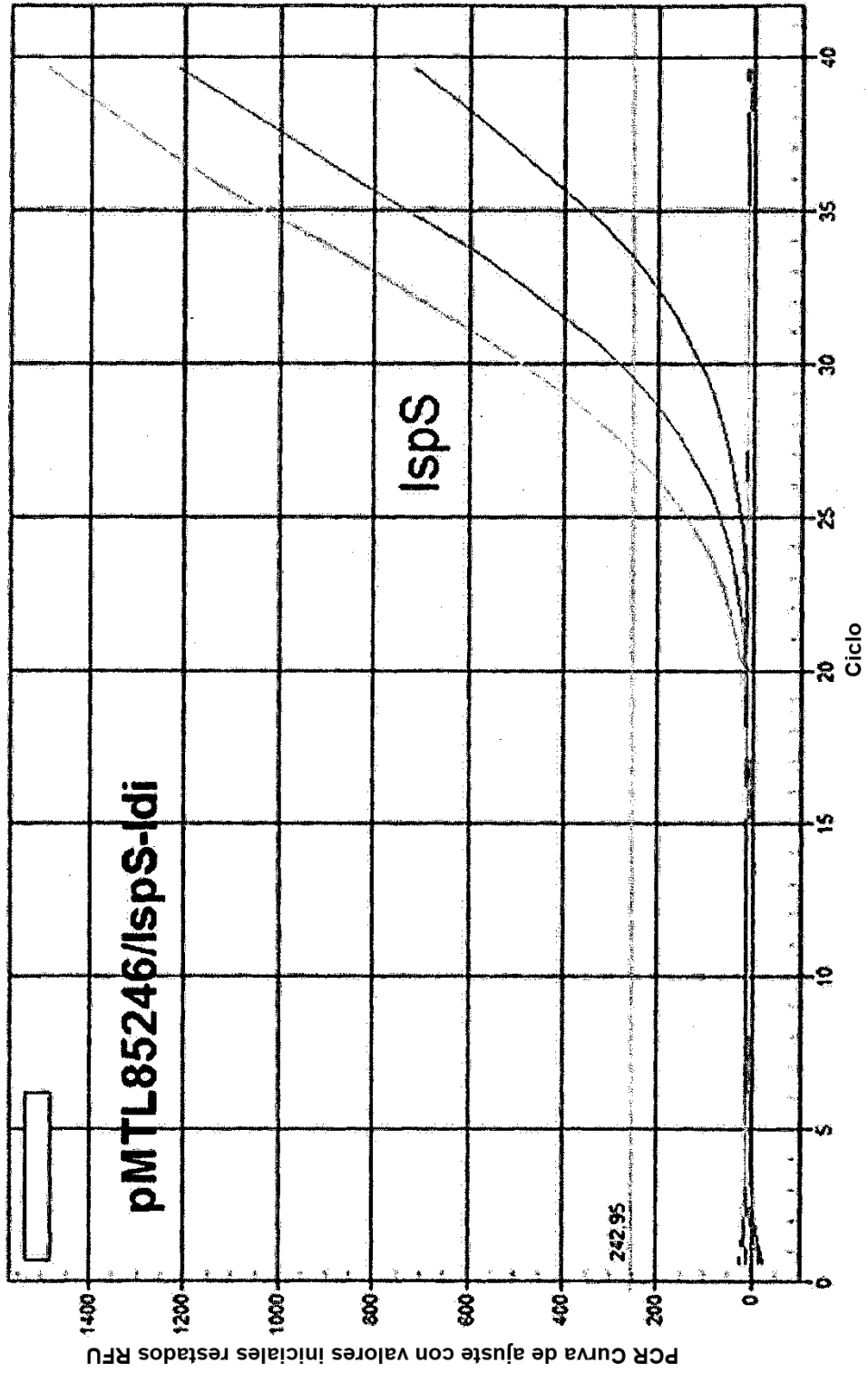


FIG. 12





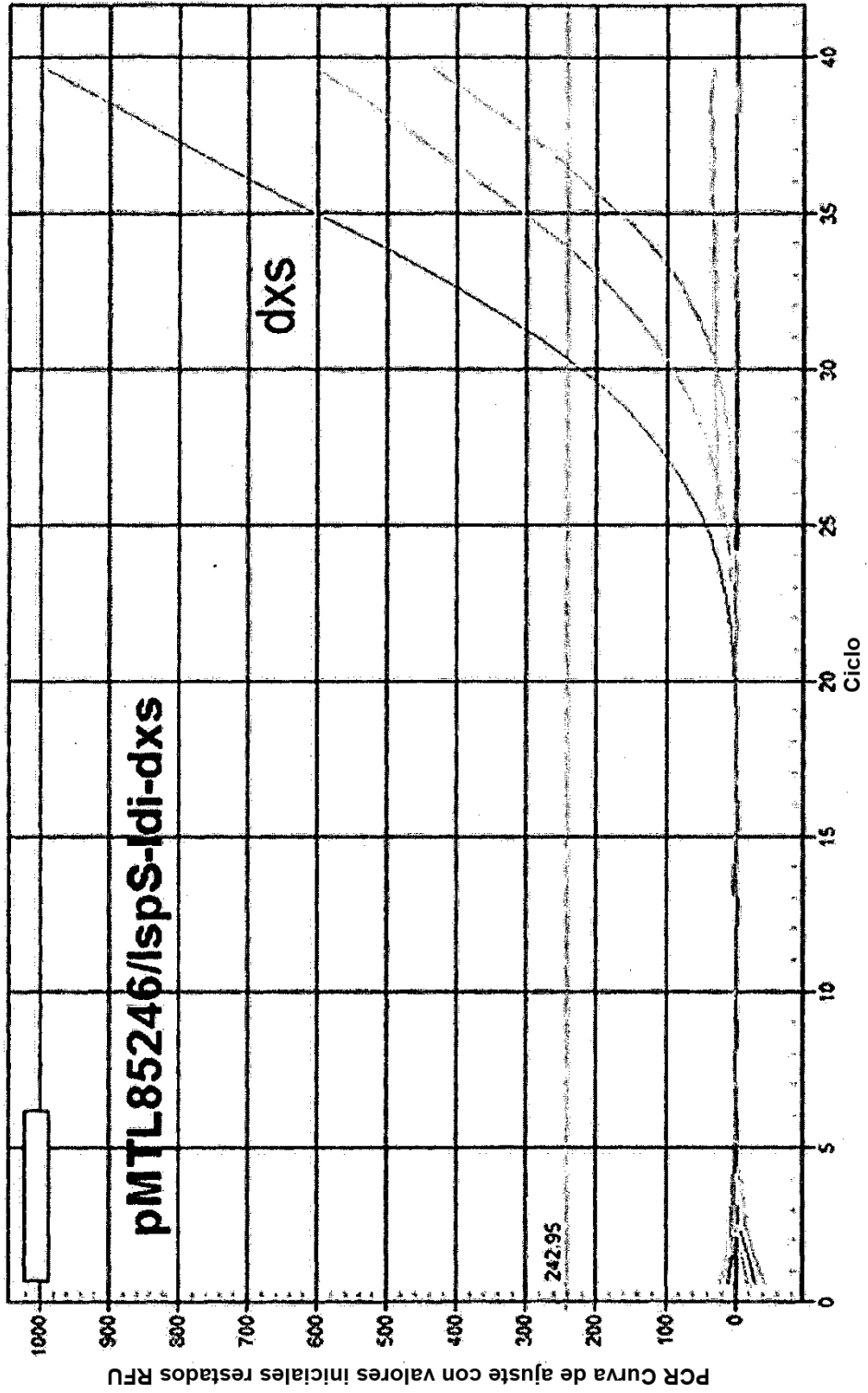




FIG. 16

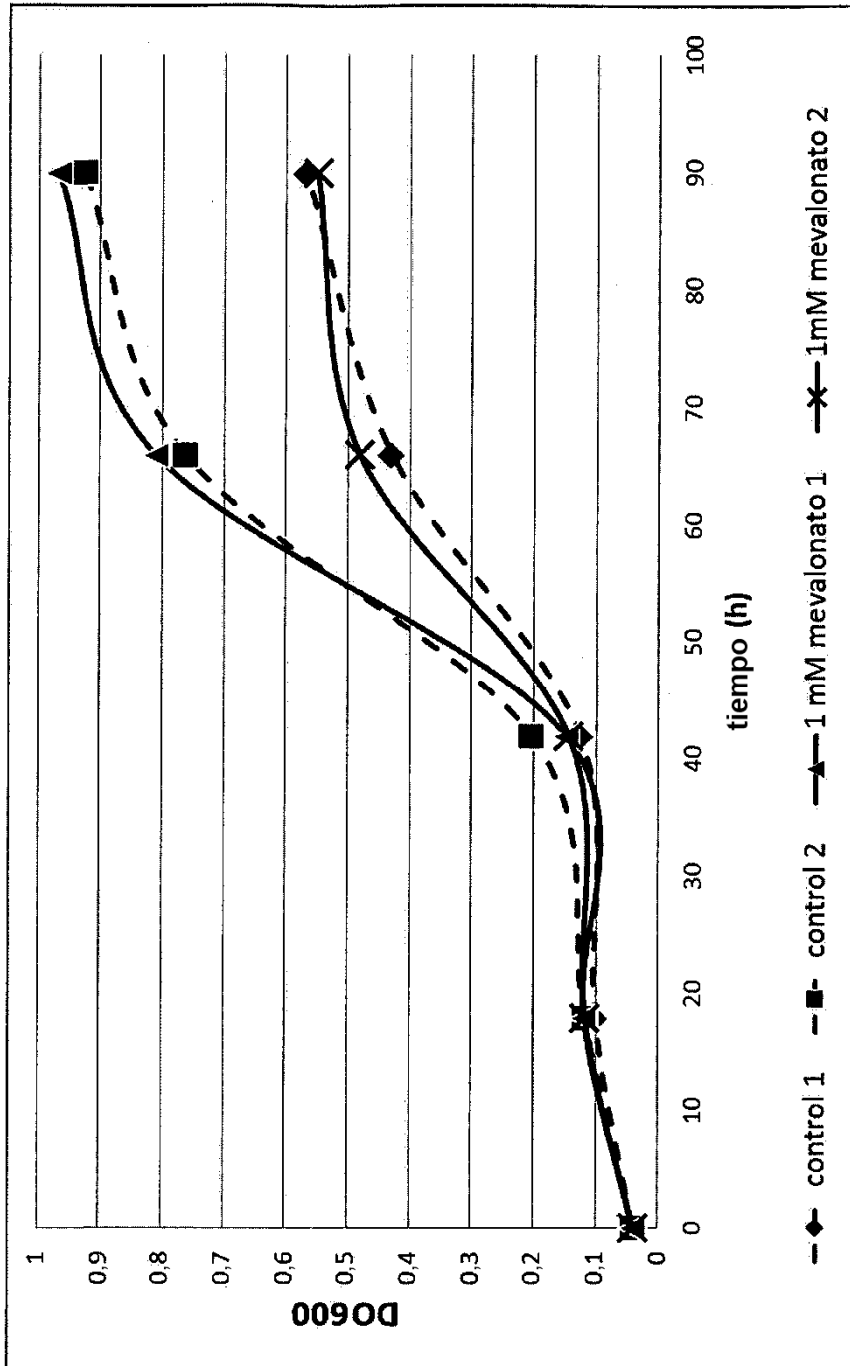


FIG. 17

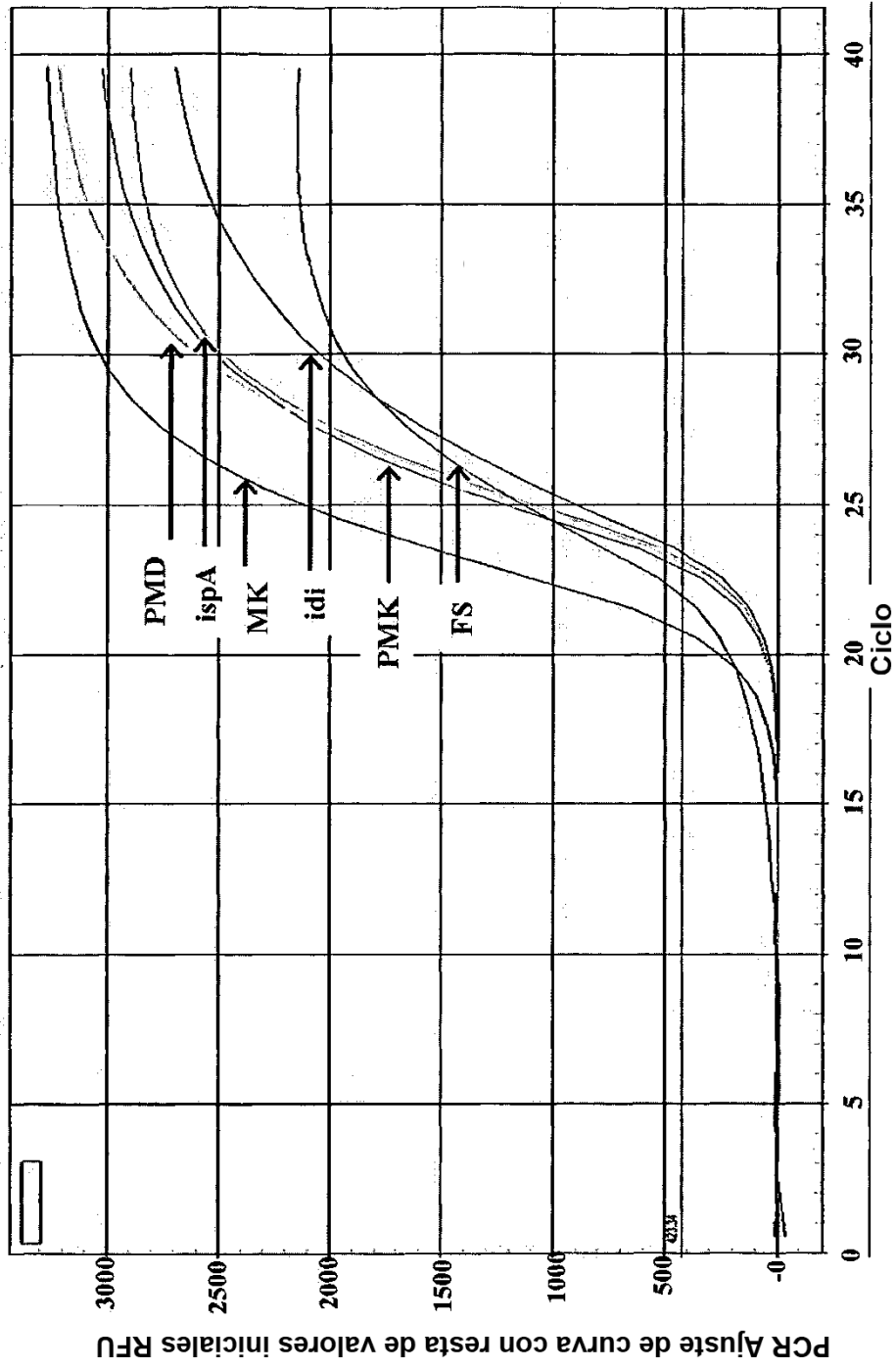


FIG. 18



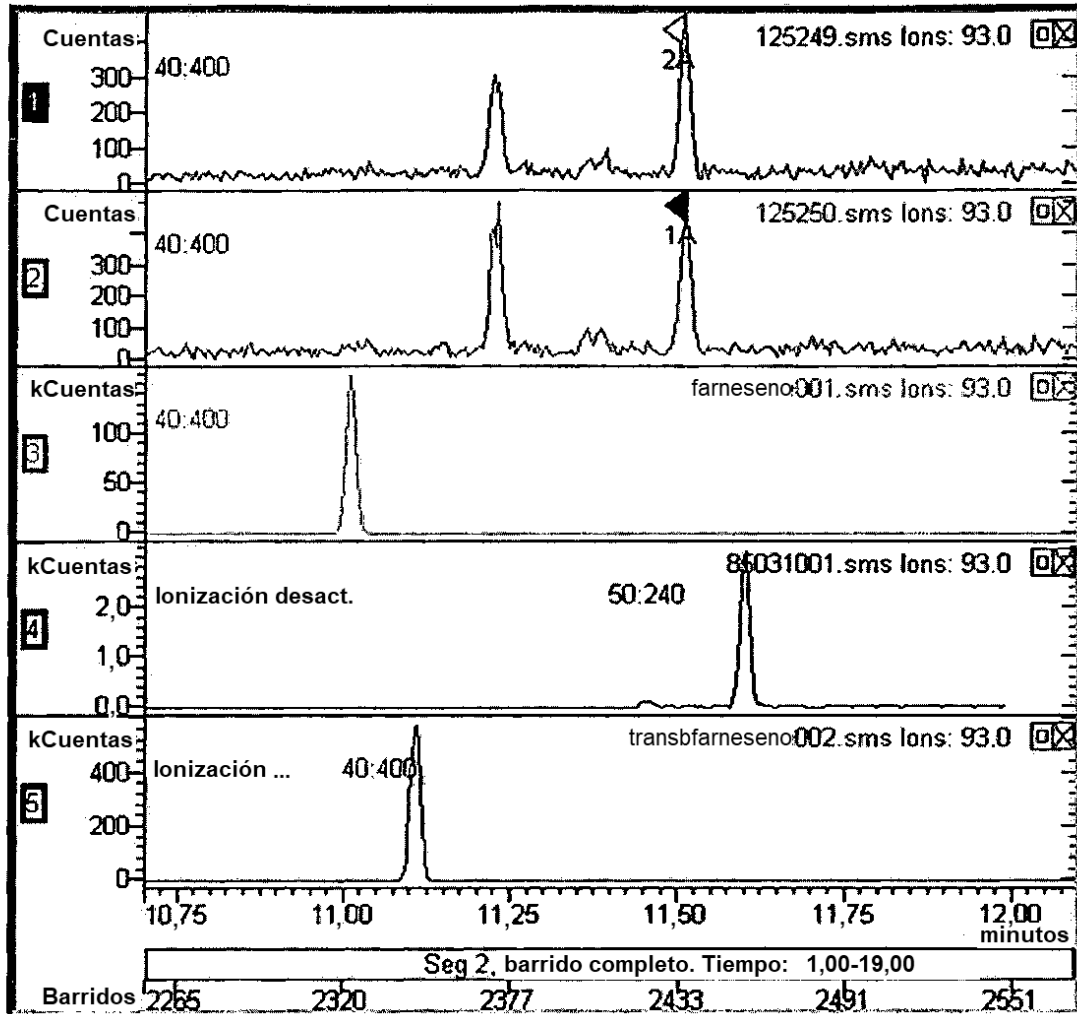


FIG. 19

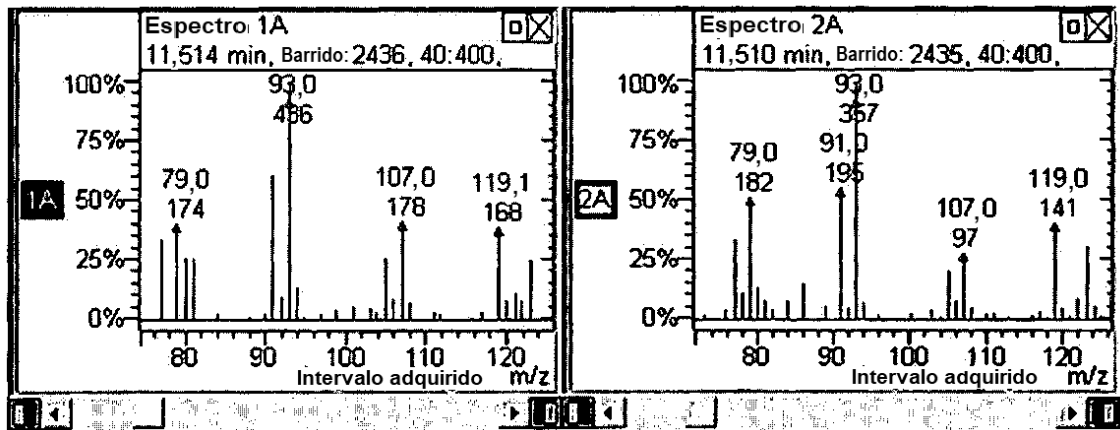


FIG. 20

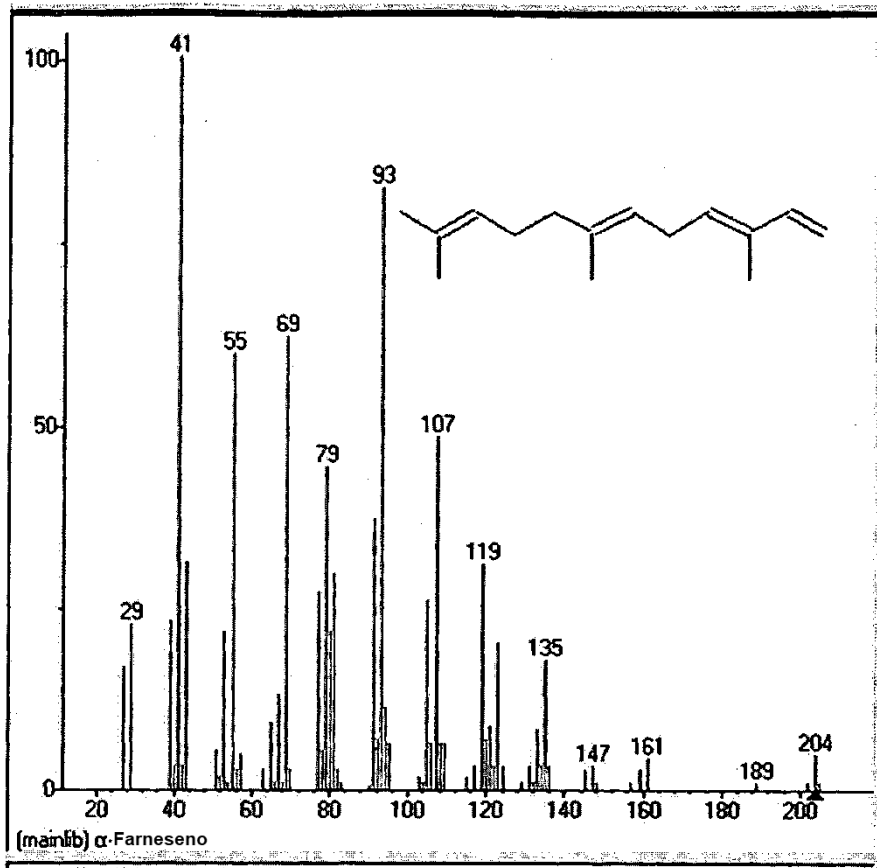


FIG. 21