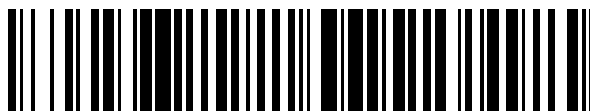


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 930**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 7/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2015 PCT/EP2015/052523**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15118111**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2015 E 15738594 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 3102674**

54 Título: **Microorganismo modificado con un comportamiento de separación de biomasa mejorado**

30 Prioridad:

07.02.2014 EP 14154287

05.05.2014 EP 14167002

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

06.03.2019

73 Titular/es:

BASF SE (100.0%)

Carl-Bosch-Strasse 38

67056 Ludwigshafen am Rhein, DE

72 Inventor/es:

KRAWCZYK, JOANNA MARTYNA;

HAEFNER, STEFAN;

SCHRÖDER, HARTWIG;

DANTAS COSTA, ESTHER;

ZELDER, OSKAR;

VON ABENDROTH, GREGORY;

WITTMANN, CHRISTOPH;

STELLMACHER, RENÉ y

BECKER, JUDITH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 702 930 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microorganismo modificado con un comportamiento de separación de biomasa mejorado

La presente invención se refiere a un microorganismo modificado, a un procedimiento para producir un compuesto orgánico y al uso de un microorganismo modificado.

5 Los compuestos orgánicos, como los pequeños ácidos dicarboxílicos que tienen 6 o menos carbonos, son sustancias químicas comercialmente importantes con muchos usos. Por ejemplo, los diácidos pequeños incluyen 1,4-diácidos, como el ácido succínico, el ácido málico y el ácido tartárico, y la molécula de 5 carbonos, ácido itacónico. Otros diácidos incluyen el ácido oxálico de dos carbonos, el ácido malónico de tres carbonos, el ácido glutárico de cinco carbonos y el ácido adípico de 6 carbonos y también existen muchos derivados de dichos diácidos.

10 Como grupo, los diácidos pequeños tienen cierta similitud química y sus usos en la producción de polímeros pueden proporcionar propiedades especializadas a la resina. Esta versatilidad les permite integrarse fácilmente en los mercados de infraestructura de productos químicos derivados. Por ejemplo, las moléculas de 1,4-diácido cumplen con muchos de los usos del producto químico anhídrido maleico a gran escala, ya que se convierten en una variedad de productos químicos industriales (tetrahydrofurano, butirolactona, 1,4-butanodiol, 2-pirrolidona) y derivados de succinato succindiamida, succinonitrilo, diaminobutano y ésteres de succinato. El ácido tartárico tiene varios usos en las industrias de alimentos, cuero, metal e impresión. El ácido itacónico forma el material de partida para la producción de 3-metilpirrolidona, metil-BDO, metil-THF y col.

15 En particular, el ácido succínico o el succinato, estos términos se usan indistintamente en el presente documento, ha despertado un gran interés porque se ha utilizado como un precursor de muchos productos químicos de importancia industrial en las industrias alimentaria, química y farmacéutica. De hecho, un informe del Departamento de Energía de los EE. UU. describe que el ácido succínico es uno de los 12 principales componentes químicos fabricados a partir de biomasa. Por lo tanto, la capacidad de producir diácidos en bacterias sería de importancia comercial significativa.

20 El documento WO-A-2009/024294 desvela una cepa bacteriana productora de ácido succínico, que es un miembro de la familia de *Pasteurellaceae*, originalmente aislada del rumen, y capaz de utilizar glicerol como fuente de carbono y cepas variantes y mutantes derivadas de la misma que conservan dicha capacidad, en particular, una cepa bacteriana designada DD1 depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania) con el número de depósito DSM 18541 (ID 06-614) y que tiene la capacidad de producir ácido succínico. La cepa DD1 pertenece a la especie *Basfia succiniciproducens* y a la familia *Pasteurellaceae* según lo clasificado por Kuhnert et al., 2010. Las mutaciones de estas cepas, en las que se ha alterado el gen *ldhA* y/o el gen *pflD* o el gen *pflA*, se desvelan en el documento WO-A-2010/092155, estando estas cepas mutantes caracterizadas por un aumento significativo de la producción de ácido succínico a partir de fuentes de carbono como el glicerol o mezclas de glicerol y carbohidratos como la maltosa, en condiciones anaerobias en comparación con el tipo silvestre DD1 desvelado en el documento WO-A-2009/024294.

25 Sin embargo, cuando se utilizan cepas bacterianas como las desveladas en el documento WO-A-2009/024294 o en el documento WO-A-2010/092155 para la producción de compuestos orgánicos tales como ácido succínico, todavía es mejorable la selectividad de las fuentes de carbono para la conversión en los compuestos orgánicos deseados y también el rendimiento del compuesto orgánico deseado.

30 Además, se ha observado que cuando se usan las cepas bacterianas de la técnica anterior, a veces es difícil separar la biomasa del caldo de fermentación al final del procedimiento de fermentación. Normalmente, la producción fermentativa de compuestos orgánicos, como el ácido succínico, comprende las etapas de cultivar los microorganismos en condiciones de cultivo adecuadas en un medio que comprende al menos una fuente de carbono asimilable para permitir que el microorganismo produzca el compuesto orgánico deseado y la posterior recuperación de los compuestos orgánicos del caldo de fermentación, en el que, en una primera etapa del procedimiento de recuperación, los microorganismos (es decir, la biomasa) se separan generalmente del medio de cultivo mediante, por ejemplo, sedimentación o centrifugación. Cuando se usan los microorganismos de la técnica anterior, la biomasa no se puede separar fácilmente del caldo de fermentación, que, como parte del caldo de fermentación está atrapado de alguna manera en la biomasa, lo que a veces conduce a la pérdida de una cierta cantidad del caldo de fermentación (y por lo tanto también a una pérdida de una cierta cantidad del compuesto orgánico deseado).

35 El documento WO 2014/018596 A2 desvela un aislado de la bacteria *Escherichia coli* (E. coli) que comprende un nivel reducido de actividad β -galactosidasa, una vía defectuosa de síntesis de ácido colónico, una mutación en una proteasa intracelular dependiente de adenosina-5'-trifosfato (ATP), una mutación en el gen *lacA*, una mutación en el gen *thyA*, y un ácido nucleico aislado que codifica una enzima $\alpha(1,2)$ fucosiltransferasa que acepta lactosa y el uso de esa bacteria para la producción de un oligosacárido fucosilado.

40 El documento WO 2013/087884 A1 desvela el uso de un microorganismo mutado y/o transformado que comprende un cambio genético que conduce a una expresión modificada de los reguladores transcripcionales de la proteína de control de la respiración aerobia ArcA y el regulador de isocitrato liasa IclR, para regular al alza al menos uno de los

genes del operón ácido colánico, en el que dicho operón comprende los genes *cpsG*, *cpsB*, *gmd* y *fcl* que codifican una fosfomanomutasa, una manosa-1-fosfato guanililtransferasa, GDP-manosa 4,6-deshidratasa y GDP-fucosa sintasa, respectivamente.

Por lo tanto, era un objeto de la presente invención superar las desventajas de la técnica anterior.

5 En particular, un objeto de la presente invención era proporcionar microorganismos que pueden usarse para la producción fermentativa de compuestos orgánicos tales como ácido succínico y que no solo producen los productos orgánicos deseados, tales como ácido succínico, a partir de fuentes de carbono asimilables tales como glicerol, glucosa, sacarosa, xilosa, lactosa, fructosa o maltosa en grandes cantidades, preferentemente solo con cantidades bajas de productos secundarios, pero que también se puedan separar fácilmente del caldo de fermentación en el
10 procedimiento posterior de recuperación del compuesto orgánico, con solo una pequeña cantidad de caldo de fermentación atrapado en la biomasa.

Una contribución para lograr los objetivos mencionados anteriormente es proporcionada por un microorganismo modificado tal como se define en la reivindicación 1.

15 Sorprendentemente, se ha descubierto que una reducción de la actividad de la enzima que está codificada por el gen *wcaJ* (esta enzima presumiblemente es una glucosa transferasa), por ejemplo, mediante una delección del gen *wcaJ*, da como resultado un microorganismo que, después de la producción fermentativa de compuestos orgánicos como el ácido succínico en un medio de cultivo apropiado, se puede separar, como la biomasa, del medio de cultivo más fácilmente que el microorganismo correspondiente en el que la actividad de este La enzima no ha disminuido. Cuando se usa el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención, queda atrapado en la biomasa
20 que se separa en el procedimiento de purificación menos caldo de fermentación, lo que significa que se puede obtener una mayor cantidad de caldo de fermentación por gramo de biomasa utilizado en el procedimiento de fermentación (y por lo tanto una mayor una cantidad del compuesto orgánico deseado, tal como ácido succínico), a partir del cual se aísla el compuesto orgánico.

25 En este contexto, la expresión “un microorganismo modificado que tiene, en comparación con su tipo silvestre, una actividad reducida de la enzima que está codificada por el gen x”, en el que el gen x es el gen *fruA* y opcionalmente, como se describe más adelante, el gen *ldhA*, el gen *pflA* y/o el gen *pflD*, la expresión “tipo silvestre” se refiere a un microorganismo en el que la actividad enzima que está codificada por el gen x no ha disminuido, es decir, se refiere a un microorganismo cuyo genoma está presente en un estado como el de antes de la introducción de una modificación genética del gen x. Preferentemente, la expresión “tipo silvestre” se refiere a un microorganismo (por ejemplo, bacterias, células de levadura, células fúngicas, etc.) cuyo genoma, en particular cuyo gen x, está presente
30 en un estado tal como el que se genera naturalmente como resultado de la evolución. La expresión se usa tanto para todo el microorganismo como para genes individuales. Como consecuencia, la expresión “tipo silvestre” preferentemente no abarca, en particular, a aquellos microorganismos, o aquellos genes, cuyas secuencias genéticas han sido modificadas por el hombre, al menos en parte, por medio de procedimientos recombinantes. La expresión “microorganismo modificado” por lo tanto, incluye un microorganismo que ha sido alterado, modificado o diseñado genéticamente (por ejemplo, modificado genéticamente) de manera tal que exhibe un genotipo y/o fenotipo alterado, modificado o diferente (por ejemplo, cuando la modificación genética afecta a las secuencias de ácidos nucleicos codificantes del microorganismo) en comparación con el microorganismo de tipo silvestre natural del que se derivó. De acuerdo con una realización particular preferida del microorganismo modificado de acuerdo con la
40 presente invención, el microorganismo modificado es un microorganismo recombinante, lo que significa que el microorganismo se ha obtenido usando ADN recombinante. La expresión “ADN recombinante” como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de ADN que resultan del uso de procedimientos de laboratorio (clonación molecular) para reunir material genético de múltiples fuentes, creando secuencias que de otra manera no se encontrarían en organismos biológicos. Un ejemplo de dicho ADN recombinante es un plásmido en el que se ha insertado una secuencia de ADN heterólogo.

45 El tipo silvestre del que se derivan los microorganismos de acuerdo con la presente invención pertenece a la familia *Pasteurellaceae*.

“*Pasteurellaceae*” comprende una gran familia de proteobacterias gramnegativas con miembros que van desde bacterias como *Haemophilus influenzae* hasta los comensales de la mucosa animal y humana. La mayoría de los
50 miembros viven como comensales en las superficies mucosas de aves y mamíferos, especialmente en el tracto respiratorio superior. *Pasteurellaceae* por lo general, tienen forma de barra y son un grupo notable de anaerobios facultativos. Se distinguen de las *Enterobacteriaceae* relacionadas por la presencia de oxidasa, y de la mayoría de otras bacterias similares por la ausencia de flagelos. Las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* se han clasificado en varios géneros según las propiedades metabólicas y existen secuencias del ARN 16S y del ARN 23S. Muchas de las *Pasteurellaceae* contienen genes de la piruvato-formiato-liasa y son capaces de fermentar anaerobiamente las
55 fuentes de carbono en ácidos orgánicos.

En este contexto, se prefiere además que el tipo silvestre del que se deriva el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención pertenezca al género *Basfia* y se prefiere particularmente que el tipo silvestre del cual se deriva el microorganismo modificado pertenezca a la especie *Basfia succiniciproducens*.

60

Lo más preferentemente, el tipo silvestre del cual se deriva el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención, es *Basfia succiniciproducens*-cepa DD1 depositado en virtud del Tratado de Budapest en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH), Alemania, con el número de depósito DSM 18541. Esta cepa se aisló originalmente del rumen de una vaca de origen alemán. Las bacterias *Pasteurella* se pueden aislar del tracto gastrointestinal de los animales y, preferentemente, de los mamíferos. La cepa bacteriana DD1, en particular, puede aislarse del rumen bovino y es capaz de utilizar glicerol (incluyendo glicerol crudo) como fuente de carbono. Otras cepas del género *Basfia* que pueden usarse para preparar el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención son la cepa de *Basfia* que ha sido depositada con el número de depósito DSM 22022 o las cepas de *Basfia* que se depositaron en la Colección de Cultivos de la Universidad de Göteborg (CCUG), Suecia, con los números de depósito CCUG 57335, CCUG 57762, CCUG 57763, CCUG 57764, CCUG 57765 o CCUG 57766. Dichas cepas se aislaron originalmente del rumen de vacas de origen alemán o suizo.

En este contexto, se prefiere particularmente que el tipo silvestre del que se deriva el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención tenga un ADNr 16S de **SEQ ID NO: 1** o una secuencia, que muestra una homología de secuencia de al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 99,9 % con la **SEQ ID NO: 1**. También se prefiere que el tipo silvestre del que se deriva el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención tenga un ADNr 23S de **SEQ ID NO: 2** o una secuencia, que muestra una homología de secuencia de al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 99,9 % con la **SEQ ID NO: 2**.

La identidad en valores porcentuales a los que se hace referencia en relación con los diversos polipéptidos o polinucleótidos que se van a usar para el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención se calcula, preferentemente, como identidad de los residuos en la longitud completa de las secuencias alineadas, tal como, por ejemplo, la identidad calculada (para secuencias bastante similares) con la ayuda del programa needle del software de bioinformática EMBOSS (Versión 5.0.0, <http://emboss.sourceforge.net/what/>) con los parámetros predeterminados que son, es decir, apertura de un hueco (penalización por apertura de un hueco): 10.0, extensión de un hueco (penalización por extensión de un hueco): 0.5, y archivo de datos (archivo de matriz de puntuación incluido en el paquete): EDNAFUL.

Cabe señalar que los microorganismos recombinantes de acuerdo con la presente invención no solo pueden derivarse de los microorganismos de tipo silvestre mencionados anteriormente, especialmente de *Basfia succiniciproducens*-cepa DD1, sino también a partir de variantes de estas cepas. En este contexto la expresión “una variante de una cepa” comprende cada cepa que tiene las mismas o esencialmente las mismas características que la cepa de tipo silvestre. En este contexto, se prefiere particularmente que el ADNr 16S de la variante tenga una identidad de al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 99 %, más preferentemente al menos el 99,5 %, más preferentemente al menos el 99,6 %, más preferentemente al menos el 99,7 %, más preferentemente al menos el 99,8 % y lo más preferentemente al menos 99,9 % con el tipo silvestre del que se ha derivado la variante. También es particularmente preferido que el ADNr 23 S de la variante tenga una identidad de al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 99 %, más preferentemente al menos el 99,5 %, más preferentemente al menos el 99,6 %, más preferentemente al menos el 99,7 %, más preferentemente al menos el 99,8 % y lo más preferentemente al menos el 99,9 % con el tipo silvestre del que se ha derivado la variante. Una variante de una cepa en el sentido de esta definición se puede obtener, por ejemplo, tratando la cepa de tipo silvestre con un agente químico mutagenizante, rayos X o luz UV.

El microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque, en comparación con su tipo silvestre, la actividad de la enzima que está codificada por el gen *wcaJ* se reduce.

La reducción de la actividad enzimática ($\Delta_{\text{actividad}}$) se define como sigue:

$$\Delta_{\text{actividad}} = 100\% - \left(\frac{\text{actividad del microorganismo modificado}}{\text{actividad del tipo silvestre}} \times 100\% \right)$$

en la que, al determinar $\Delta_{\text{actividad}}$, la actividad en el tipo silvestre y la actividad en el microorganismo modificado se determinan exactamente en las mismas condiciones. Los procedimientos para la detección y determinación de la actividad de la enzima que está codificada por el gen *wcaJ* se pueden encontrar, por ejemplo, en Nothaft y col.: “In vivo analysis of HPr reveals a fructose-specific phosphotransferase system that confers high-affinity uptake in *Streptomyces coelicolor*”, *Journal of bacteriology*, Vol. 185 (3), páginas 929-937.

La actividad reducida de las enzimas desvelada en el presente documento, en particular la actividad reducida de la enzima codificada por el gen *wcaJ*, la lactato deshidrogenasa y/o piruvato formiato liasa, puede ser una reducción de la actividad enzimática de al menos un 50 %, en comparación con la actividad de dicha enzima en el tipo silvestre del microorganismo, o una reducción de la actividad enzimática de al menos un 90 %, o más preferentemente una reducción de la actividad enzimática de al menos un 95 %, o más preferentemente una reducción de la actividad enzimática de al menos un 98 %, o incluso más preferentemente una reducción de la actividad enzimática de al menos un 99 % o incluso más preferentemente una reducción de la actividad enzimática de al menos un 99,9 %. La

expresión “*actividad reducida de la enzima que está codificada por el gen wcaJ*” o - como se describe a continuación - “*una actividad lactato deshidrogenasa reducida*” o “*una actividad piruvato formiato liasa reducida*”, también abarca un microorganismo modificado que no tiene actividad detectable de estas enzimas.

5 La expresión “*actividad reducida de una enzima*” incluye, por ejemplo, la expresión de la enzima por dicho microorganismo manipulado genéticamente (por ejemplo, diseñado genéticamente) a un nivel inferior al expresado por el tipo silvestre de dicho microorganismo. Las manipulaciones genéticas para reducir la expresión de una enzima pueden incluir, entre otras, delecionar el gen o partes del mismo que codifican la enzima, alterar o modificar secuencias reguladoras o sitios asociados con la expresión del gen que codifica la enzima (por ejemplo, eliminando promotores fuertes o promotores reprimibles), modificando proteínas (p. ej., proteínas reguladoras, supresores, potenciadores, activadores transcripcionales y similares) implicados en la transcripción del gen que codifica la enzima y/o la traducción del producto génico, o cualquier otro medio convencional de disminución de la expresión de una rutina génica particular en la técnica (que incluye, pero no se limita a, el uso de moléculas de ácido nucleico antisentido o ARNi u otros procedimientos para desactivar o bloquear la expresión de la proteína diana). Más adelante, se pueden introducir elementos desestabilizadores en el ARNm o introducir modificaciones genéticas que conduzcan al deterioro de los sitios de unión ribosomal (RBS) del ARN. También es posible cambiar el uso del codón del gen de manera que disminuya la eficiencia y la velocidad de traducción.

También se puede obtener una actividad reducida de una enzima introduciendo una o más mutaciones genéticas que conducen a una actividad reducida de la enzima. Además, una reducción de la actividad de una enzima también puede incluir una inactivación (o la expresión reducida) de las enzimas activadoras que son necesarias para activar la enzima cuya actividad se va a reducir. Mediante este último enfoque, la enzima cuya actividad se va a reducir se mantiene preferentemente en un estado inactivado.

Los microorganismos que tienen una actividad reducida de la enzima codificada por el gen *wcaJ* pueden ocurrir naturalmente, es decir, debido a mutaciones espontáneas. Un microorganismo puede modificarse para que carezca o reduzca significativamente de la actividad de la enzima que está codificada por el gen *wcaJ* por diversas técnicas, como el tratamiento químico o la radiación. Para este fin, los microorganismos serán tratados, por ejemplo, por un agente químico mutagenizante, rayos X o luz UV. En una etapa posterior, se seleccionarán los microorganismos que tienen una actividad reducida de la enzima que está codificada por el gen *wcaJ*. Los microorganismos modificados también se pueden obtener mediante técnicas de recombinación homóloga cuyo objetivo es mutar, interrumpir o escindir el gen *wcaJ* en el genoma del microorganismo o sustituir el gen con un gen correspondiente que codifica una enzima que, en comparación con la enzima codificada por el gen de tipo silvestre, tiene una actividad reducida.

De acuerdo con la presente invención, una reducción de la actividad de la enzima codificada por el gen *wcaJ* se logra mediante una delección del gen *wcaJ* o mediante una introducción de al menos una mutación en el gen *wcaJ*. En el contexto de la introducción de al menos una mutación en el gen *wcaJ*, la al menos una mutación conduce a la expresión de una enzima truncada codificada por el gen *wcaJ* en el que al menos 100 aminoácidos, preferentemente al menos 125 aminoácidos, más preferido al menos 150 aminoácidos y lo más preferido al menos 160 aminoácidos de la enzima de tipo silvestre codificada por el gen *wcaJ* se delecionan del extremo C terminal. Tal enzima truncada codificada por el gen *wcaJ* puede, por ejemplo, obtenerse insertando o delecionando nucleótidos en las posiciones apropiadas dentro del gen *wcaJ*, lo que conduce a una mutación de cambio de marco, en la que, mediante esta mutación de cambio de marco, se introduce un codón de parada. Por ejemplo, la inserción de un nucleótido en el codón que codifica la lisina entre la timina en la posición 81 y la adenina en la posición 82 conduce a una mutación de cambio de marco mediante la cual se introduce un codón de parada como se muestra en la **SEQ ID NO: 16**. Tales mutaciones del gen *wcaJ* puede introducirse, por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio, seguido de una introducción del gen modificado en el genoma del microorganismo mediante recombinación. Las variantes del gen *wcaJ* se pueden generar mediante la mutación de la secuencia del gen *wcaJ* **SEQ ID NO: 3** mediante PCR. Se puede utilizar el “*Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit*” (Stratagene) para llevar a cabo una mutagénesis dirigida. Se puede realizar una mutagénesis aleatoria sobre toda la secuencia codificante, o sólo una parte de la misma, de **SEQ ID NO: 3** con el “*GeneMorph II Random Mutagenesis Kit*” (Stratagene).

A continuación, se describe una técnica adecuada para la recombinación, en particular para introducir una mutación o para delecionar secuencias.

50 Esta técnica también se conoce a veces como la “recombinación de Campbell” en el presente documento (Leenhouts y col. Appl Env Microbiol. (1989), vol. 55, páginas 394-400). “Campbell in”, como se usa en el presente documento, se refiere a un transformante de una célula hospedadora original en la que una molécula de ADN de doble cadena circular completa (por ejemplo, un plásmido) se ha integrado en un cromosoma mediante un solo evento de recombinación homóloga (un evento de entrecruzamiento) y esto da como resultado efectivamente la inserción de una versión linealizada de dicha molécula de ADN circular en una primera secuencia de ADN del cromosoma que es homóloga con una primera secuencia de ADN de dicha molécula de ADN circular. “Campbellled in” se refiere a la secuencia de ADN linealizada que se ha integrado en el cromosoma de un transformante “Campbell in”. Un “Campbell in” contiene una duplicación de la primera secuencia de ADN homóloga, cada copia de la cual incluye y rodea una copia del punto de entrecruzamiento de recombinación homóloga.

60

“Campbell out”, como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que desciende de un transformante “Campbell in”, en el que se produjo un segundo evento de recombinación homóloga (un evento de entrecruzamiento) entre una segunda secuencia de ADN que está contenida en el ADN insertado linealizado del ADN “Campbell in”, y una segunda secuencia de ADN de origen cromosómico, que es homóloga a la segunda secuencia de ADN de dicho inserto linealizado, dando como resultado el segundo evento de recombinación la delección (expulsión) de una parte de la secuencia de ADN integrada, pero, lo que es más importante, dando también resultado a una porción (que puede ser de tan solo una base) del Campbell integrado en el ADN que permanece en el cromosoma, de manera tal que en comparación con la célula hospedadora original, la célula “Campbell out” contiene uno o más cambios intencionales en el cromosoma (por ejemplo, sustitución de una sola base, sustitución de múltiples bases, inserción de un gen heterólogo o secuencia de ADN, inserción de una copia o copias adicionales de un gen homólogo o un gen homólogo modificado, o inserción de una secuencia de ADN que comprende más de uno de los ejemplos mencionados anteriormente y citados más arriba). Una célula “Campbell out” se obtiene, preferentemente, mediante una contra selección contra un gen que está contenido en una parte (la parte que se desea eliminar) de la secuencia de ADN “Campbell in”, por ejemplo el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que es letal cuando se expresa en una célula que crece en presencia de aproximadamente 5 % a 10 % de sacarosa. Con o sin una contra selección, se puede obtener o identificar una célula “Campbell out” deseada mediante la selección de la célula deseada, utilizando cualquier fenotipo seleccionable, como, entre otros, la morfología de la colonia, el color de la colonia, la presencia o la ausencia de resistencia a los antibióticos, presencia o ausencia de una secuencia de ADN dada por la reacción en cadena de la polimerasa, presencia o ausencia de una auxotrofia, presencia o ausencia de una enzima, hibridación de ácidos nucleicos de colonias, detección de anticuerpos, etc. El término “Campbell in” y “Campbell out” también se puede utilizar como verbos en varios tiempos para referirse al procedimiento descrito anteriormente.

Se entiende que los eventos de recombinación homóloga que conducen a una “Campbell in” o “Campbell out” pueden ocurrir en un rango de bases de ADN dentro de la secuencia de ADN homóloga, y dado que las secuencias homólogas serán idénticas entre sí por al menos parte de este rango, generalmente no es posible especificar exactamente dónde ocurrió el evento de entrecruzamiento. En otras palabras, no es posible especificar con precisión qué secuencia fue originalmente del ADN insertado y cuál fue originalmente del ADN cromosómico. Además, la primera secuencia de ADN homóloga y la segunda secuencia de ADN homóloga generalmente están separadas por una región de no homología parcial, y es esta región de no homología la que permanece depositada en un cromosoma de la célula “Campbell out”.

Preferentemente, la primera y la segunda secuencia de ADN homólogo tienen al menos aproximadamente 200 pares de bases de longitud, y pueden tener hasta varios miles de pares de bases de longitud. Sin embargo, el procedimiento puede hacerse para trabajar con secuencias más cortas o más largas. Por ejemplo, la longitud de la primera y la segunda secuencia homólogas puede variar de aproximadamente 500 a 2.000 bases, y la obtención de un “Campbell out” a partir de un “Campbell in” es posible al disponer la primera y la segunda secuencia homóloga de modo que sean aproximadamente de la misma longitud, preferentemente con una diferencia de menos de 200 pares de bases y lo más preferentemente, siendo el más corto de los dos al menos el 70 % de la longitud del más largo en pares de bases.

El gen *wcaJ* cuya actividad se reduce en el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en:

a) ácidos nucleicos que tienen la secuencia nucleotídica de **SEQ ID NO: 3**;

b) ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;

c) ácidos nucleicos que son al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 % o al menos 99,9 %, lo más preferentemente 100 % idénticos al ácido nucleico de a) o b), donde la identidad es la identidad en la longitud total de los ácidos nucleicos de a) o b);

d) ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 % o al menos 99,9 %, lo más preferentemente 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de a) o b), donde la identidad es la identidad en la longitud total de la secuencia de aminoácidos codificada por los ácidos nucleicos de a) o b);

e) ácidos nucleicos capaces de hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia complementaria de cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con a) o b); y

f) ácidos nucleicos que codifican la misma proteína que cualquiera de los ácidos nucleicos de a) o b), pero que difieren de los ácidos nucleicos de a) o b) anteriores debido a la degeneración del código genético.

El término “hibridación” como se usa en el presente documento incluye “cualquier procedimiento por el cual una hebra de molécula de ácido nucleico se une con una hebra complementaria mediante emparejamiento de bases” (J. Coombs (1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, Nueva York). La hibridación y la fuerza de la hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre las moléculas de ácido nucleico) se ven afectadas por factores tales como

el grado de complementariedad entre las moléculas de ácido nucleico, la rigurosidad de las condiciones involucradas, la T_m del híbrido formado, y la relación G:C dentro de las moléculas de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, el término “T_m” se utiliza en referencia a la “temperatura de fusión”. La temperatura de fusión es la temperatura a la cual una población de moléculas de ácido nucleico de doble cadena se convierte en medio disociada en cadenas simples. La ecuación para calcular la T_m de las moléculas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica. Como lo indican las referencias estándar, una estimación simple del valor de T_m se puede calcular mediante la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$, cuando una molécula de ácido nucleico está en solución acuosa en NaCl 1 M (ver, por ejemplo, Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization (1985)). Otras referencias incluyen cálculos más sofisticados, que tienen en cuenta las características estructurales y de secuencia para el cálculo de T_m. Las condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la materia y se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

En particular, la expresión “condiciones de rigurosidad” se refiere a las condiciones en las que 100 nucleótidos contiguos o más, 150 nucleótidos contiguos o más, 200 nucleótidos contiguos o más o 250 nucleótidos contiguos o más que son un fragmento o idénticos a la molécula de ácido nucleico complementario (ADN, ARN, ADNss o ARNss) se hibridan en condiciones equivalentes a la hibridación en dodecil sulfato de sodio (SDS) al 7 %, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 2 x SSC, SDS al 0,1 % a 50 °C o 65 °C, preferentemente a 65 °C, con una molécula de ácido nucleico específica (ADN; ARN, ADNss o ARNss). Preferentemente, las condiciones de hibridación son equivalentes a la hibridación en dodecil sulfato de sodio (SDS) al 7 %, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 1 x SSC, SDS al 0,1 % a 50 °C o 65 °C, preferentemente 65 °C, más preferentemente las condiciones de hibridación son equivalentes a la hibridación en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7 %, Na-PO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 0,1 x SSC, SDS al 0,1 % a 50 °C o 65 °C, preferentemente 65 °C. Preferentemente, los nucleótidos complementarios se hibridan con un fragmento o la totalidad de ácidos nucleicos de *wcaJ*. De modo alternativo, las condiciones de hibridación preferidas abarcan la hibridación a 65 °C en 1 x SSC o a 42 °C en 1 x SSC y 50 % de formamida, seguido de lavado a 65 °C en 0,3 x SSC o hibridación a 50 °C en 4 x SSC o a 40 °C en 6 x SSC y 50 % de formamida, seguido de lavado a 50 °C en 2 x SSC. Otras condiciones de hibridación preferidas son SDS al 0,1 %, SSD 0,1 y 65 °C.

El gen *wcaJ* que puede deletarse mediante la “recombinación de Campbell” mencionada anteriormente o en la que se introduce al menos una mutación mediante la “recombinación de Campbell” mencionada anteriormente que comprende un ácido nucleico como se definió anteriormente.

Ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 3** corresponde al gen *wcaJ* de *Basfia succiniciproducens*-cepa DD1.

De acuerdo con una realización preferida del microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención, este microorganismo no solo se caracteriza por una actividad reducida de la enzima codificada por el gen *wcaJ*, sino también, en comparación con el tipo silvestre, por

- i) una actividad piruvato formiato liasa reducida,
- ii) una actividad lactato deshidrogenasa reducida, o
- iii) una actividad piruvato formiato liasa reducida y una actividad lactato deshidrogenasa reducida.

Los microorganismos modificados que son deficientes en actividad lactato deshidrogenasa y/o que son deficientes en actividad piruvato formiato liasa se desvelan en el documento WO-A-2010/092155, US 2010/0159543 y WO-A-2005/052135, que desvelan diferentes enfoques para reducir la actividad lactato deshidrogenasa y/o piruvato formiato liasa en un microorganismo, preferentemente en una célula bacteriana del género *Pasteurella*, particularmente preferido en *Basfia succiniciproducens*-cepa DD1. Los procedimientos para determinar la actividad piruvato formiato liasa se desvelan, por ejemplo, por Asanuma N. e Hino T. en “Effects of pH and Energy Supply on Activity and Amount of Pyruvate-Formate-Lyase in *Streptococcus bovis*”, Appl. Environ. Microbiol. (2000), Vol. 66, páginas 3773-3777 y los procedimientos para determinar la actividad lactato deshidrogenasa se desvelan, por ejemplo, por Bergmeyer, H.U., Bergmeyer J. y Grassl, M. (1983-1986) en “Methods of Enzymatic Analysis”, 3ª Edición, Volumen III, páginas 126-133, Verlag Chemie, Weinheim.

En este contexto, se prefiere que la reducción de la actividad lactato deshidrogenasa se logre mediante una inactivación del gen *ldhA* (que codifica la lactato deshidrogenasa; LdhA; EC 1.1.1.27 o EC 1.1.1.28) y la reducción de la piruvato formiato liasa se logra mediante una inactivación del gen *pflA* (que codifica un activador de piruvato formiato liasa; PflA; EC 1.97.1.4) o el gen *pflD* (que codifica la piruvato formiato liasa; PflD; EC 2.3.1.54), en el que la inactivación de estos genes (es decir, *ldhA*, *pflA* y *pflD*) se logra preferentemente mediante una delección de estos genes o partes de los mismos, mediante una delección de un elemento regulador de estos genes o al menos una parte de los mismos o mediante una introducción de al menos una mutación en estos genes, particularmente preferida por medio de “la recombinación de Campbell” como se describe anteriormente.

El gen *ldhA* cuya actividad se reduce en el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención, comprende preferentemente un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en:

α1) ácidos nucleicos que tienen la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 10**;

α2) ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**;

5 α3) ácidos nucleicos que son al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 % o al menos 99,9 %, lo más preferentemente 100 % idénticos al ácido nucleico de α1) o α2), donde la identidad es la identidad en la longitud total de los ácidos nucleicos de α1) o α2);

10 α4) ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 % o al menos 99,9 %, lo más preferentemente 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de α1) o α2), donde la identidad es la identidad en la longitud total de la secuencia de aminoácidos codificada por los ácidos nucleicos de α1) o α2);

15 α5) ácidos nucleicos capaces de hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia complementaria de cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con α1) o α2); y

α6) ácidos nucleicos que codifican la misma proteína que cualquiera de los ácidos nucleicos de α1) o α2), pero que difieren de los ácidos nucleicos de α1) o α2) anteriores debido a la degeneración del código genético.

20 El gen *pflA* cuya actividad está reducida en el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención, comprende preferentemente un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en:

β1) ácidos nucleicos que tienen la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 12**;

β2) ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 13**;

25 β3) ácidos nucleicos que son al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 % o al menos 99,9 %, lo más preferentemente 100 % idénticos al ácido nucleico de β1) o β2), donde la identidad es la identidad en la longitud total de los ácidos nucleicos de β1) o β2);

30 β4) ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 % o al menos 99,9 %, lo más preferentemente 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de β1) o β2), donde la identidad es la identidad en la longitud total de la secuencia de aminoácidos codificada por los ácidos nucleicos de β1) o β2);

β5) ácidos nucleicos capaces de hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia complementaria de cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con β1) o β2); y

35 β6) ácidos nucleicos que codifican la misma proteína que cualquiera de los ácidos nucleicos de β1) o β2), pero que difieren de los ácidos nucleicos de β1) o β2) anteriores debido a la degeneración del código genético.

El gen *pflD* cuya actividad está reducida en el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención, comprende preferentemente un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en:

γ1) ácidos nucleicos que tienen la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 14**;

40 γ2) ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 15**;

γ3) ácidos nucleicos que son al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 % o al menos 99,9 %, lo más preferentemente 100 % idénticos al ácido nucleico de γ1) o γ2), donde la identidad es la identidad en la longitud total de los ácidos nucleicos de γ1) o γ2);

45 γ4) ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 % o al menos 99,9 %, más preferentemente 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de γ1) o γ2), donde la identidad es la identidad en la longitud total de la secuencia de aminoácidos codificada por los ácidos nucleicos de γ1) o γ2);

50 γ5) ácidos nucleicos capaces de hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia complementaria de

cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con $\gamma 1$) o $\gamma 2$); y

$\gamma 6$) ácidos nucleicos que codifican la misma proteína que cualquiera de los ácidos nucleicos de $\gamma 1$) o $\gamma 2$), pero que difieren de los ácidos nucleicos de $\gamma 1$) o $\gamma 2$) anteriores debido a la degeneración del código genético.

En este contexto, se prefiere que el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención comprenda además:

A) una deleción del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo, una deleción de un elemento regulador del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *ldhA*;

B) una deleción del gen *pflD* o al menos una parte del mismo, una deleción de un elemento regulador del gen *pflD* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *pflD*;

C) una deleción del gen *pflA* o al menos una parte del mismo, una deleción de un elemento regulador del gen *pflA* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *pflA*;

D) una deleción del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo, una deleción de un elemento regulador del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *ldhA*

y

una deleción del gen *pflD* o al menos una parte del mismo, una deleción de un elemento regulador del gen *pflD* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *pflD*;

o

E) una deleción del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo, una deleción de un elemento regulador del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *ldhA*

y

una deleción del gen *pflA* o al menos una parte del mismo, una deleción de un elemento regulador del gen *pflA* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *pflA*.

Realizaciones particulares preferidas de los microorganismos modificados de acuerdo con la presente invención son:

– células bacterianas modificadas de la familia *Pasteurellaceae*, en particular se prefiere del género *Basfia* y aún más preferido de la especie *Basfia succiniciproducens*, en la cual el gen *wcaJ* ha sido delecionado o en la que al menos se ha introducido una mutación en el gen *wcaJ*, en el que la introducción de la al menos una mutación conduce preferentemente a la expresión de una enzima en la cual al menos 100 aminoácidos, preferentemente al menos 125 aminoácidos, más preferentemente al menos 150 aminoácidos y lo más preferido al menos 160 aminoácidos de la enzima de tipo silvestre codificada por el gen *wcaJ* se han delecionado del extremo C terminal;

– células bacterianas modificadas de la familia *Pasteurellaceae*, en particular se prefiere del género *Basfia* y aún más preferido de la especie *Basfia succiniciproducens*, en la cual el gen *wcaJ* ha sido delecionado o en la que al menos se ha introducido una mutación en el gen *wcaJ*, en el que la introducción de la al menos una mutación conduce preferentemente a la expresión de una enzima en la cual al menos 100 aminoácidos, preferentemente al menos 125 aminoácidos, más preferentemente al menos 150 aminoácidos y lo más preferido al menos 160 aminoácidos de la enzima de tipo silvestre codificada por el gen *wcaJ* se han delecionado del extremo C terminal, y en la cual, en comparación con el tipo silvestre, la actividad lactato deshidrogenasa está reducida, preferentemente por una modificación del gen *ldhA*, en particular por una modificación del gen *ldhA* que tiene la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 10 y que codifica una LdhA que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 11;

– células bacterianas modificadas de la familia *Pasteurellaceae*, en particular se prefiere del género *Basfia* y aún más preferido de la especie *Basfia succiniciproducens*, en la cual el gen *wcaJ* ha sido delecionado o en la que al menos se ha introducido una mutación en el gen *wcaJ*, en el que la introducción de la al menos una mutación conduce preferentemente a la expresión de una enzima en la cual al menos 100 aminoácidos, preferentemente al menos 125 aminoácidos, más preferentemente al menos 150 aminoácidos y lo más preferido al menos 160 aminoácidos de la enzima de tipo silvestre codificada por el gen *wcaJ* se han delecionado del extremo C terminal, y en la cual, en comparación con el tipo silvestre, la actividad piruvato formiato liasa está reducida, preferentemente por una modificación del gen *pflA* o el gen *pflD*, en particular por una modificación del gen *pflA* que tiene la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 y que codifica una PflA que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 13 o por una modificación del gen *pflD* que tiene la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 14 y que codifica una PflD que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 15;

– células bacterianas modificadas de la familia *Pasteurellaceae*, en particular se prefiere del género *Basfia* y aún más preferido de la especie *Basfia succiniciproducens*, en la cual el gen *wcaJ* ha sido delecionado o en la que al menos se ha introducido una mutación en el gen *wcaJ*, en el que la introducción de la al menos una mutación

conduce preferentemente a la expresión de una enzima en la cual al menos 100 aminoácidos, preferentemente al menos 125 aminoácidos, más preferentemente al menos 150 aminoácidos y lo más preferido al menos 160 aminoácidos de la enzima de tipo silvestre codificada por el gen *wcaJ* se han deletado del extremo C terminal, y en la cual, en comparación con el tipo silvestre, la actividad, y en la cual, en comparación con el tipo silvestre, la actividad lactato deshidrogenasa y piruvato formiato liasa está reducida, preferentemente por una modificación del gen *ldhA* y del gen *pflA*, preferentemente por una modificación del gen *ldhA* y el gen *pflA*, en particular por una modificación del gen *ldhA* que tiene la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la **SEQ ID NO: 10** y que codifica una LdhA que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la **SEQ ID NO: 11** o por una modificación del gen *pflA* que tiene la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la **SEQ ID NO: 12** y que codifica una PflA que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la **SEQ ID NO: 13**, o por una modificación del gen *ldhA* y del gen *pflD*, en particular por una modificación del gen *ldhA* que tiene la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la **SEQ ID NO: 10** y que codifica una LdhA que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la **SEQ ID NO: 11** o por una modificación del gen *pflD* que tiene la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la **SEQ ID NO: 14** y que codifica una PflD que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la **SEQ ID NO: 15**.

Además, se proporciona una contribución para resolver los problemas mencionados al principio por un procedimiento para producir un compuesto orgánico o un producto orgánico secundario que sea diferente del compuesto orgánico como se define en la reivindicación 8.

En la etapa I) del procedimiento el microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención se cultiva en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono asimilable para permitir que el microorganismo modificado produzca el compuesto orgánico, obteniendo así un caldo de fermentación que comprende el compuesto orgánico. Compuestos orgánicos preferidos que pueden producirse por el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprenden ácidos carboxílicos tales como ácido fórmico, ácido láctico, ácido propiónico, ácido 2-hidroxipropiónico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido 3-hidroxibutírico, ácido acrílico, ácido pirúvico o sales de estos ácidos carboxílicos, ácidos dicarboxílicos tales como ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido glutárico, ácido itacónico, ácido adípico o sales de los mismos, ácidos tricarboxílicos tales como ácido cítrico o sales de los mismos, alcoholes tales como metanol o etanol, aminoácidos tales como L-asparagina, ácido L-aspartico, L-arginina, L-isoleucina, L-glicina, L-glutamina, ácido L-glutámico, L-cisteína, L-serina, L-tirosina, L-triptófano, L-treonina, L-valina, L-histidina, L-prolina, L-metionina, L-lisina, L-leucina, etc.

De acuerdo con una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención, el compuesto orgánico es ácido succínico. La expresión "ácido succínico", como se usa en el contexto de la presente invención, debe entenderse en su sentido más amplio y también abarca sales del mismo (es decir, succinato), como por ejemplo sales de metales alcalinos, como sales de Na⁺ y K⁺ o sales alcalinotérreas, como sales de Mg²⁺ y Ca²⁺ o sales de amonio o anhídridos del ácido succínico.

El microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención se incuba, preferentemente, en el medio de cultivo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 10 a 60 °C o 20 a 50 °C o 30 a 45 °C a un pH de 5,0 a 9,0 o 5,5 a 8,0 o 6,0 a 7,0.

Preferentemente, el compuesto orgánico, especialmente el ácido succínico, se produce en condiciones anaerobias. Las condiciones anaerobias pueden establecerse por medio de técnicas convencionales, como por ejemplo desgasificando los constituyentes del medio de reacción y manteniendo las condiciones anaerobias introduciendo dióxido de carbono o nitrógeno o mezclas de los mismos y opcionalmente hidrógeno a un caudal de, por ejemplo, 0,1 a 1 o 0,2 a 0,5 vvm. Las condiciones aerobias se pueden establecer por medio de técnicas convencionales, como por ejemplo introduciendo aire u oxígeno a un caudal de, por ejemplo, 0,1 a 1 o 0,2 a 0,5 vvm. Si procede, se puede aplicar una ligera sobre presión de 0,1 a 1,5 bar en el procedimiento.

La fuente de carbono asimilable se selecciona preferentemente de sacarosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa, maltoheptaosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, glicerol y sus mezclas de las mismas o composiciones que contienen al menos uno de dichos compuestos, o se seleccionan de productos de descomposición del almidón, celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa. Preferentemente, la fuente de carbono asimilable comprende D-glucosa, maltosa, sacarosa, glicerol o una mezcla de al menos dos de estos compuestos, en el que mezclas de glicerol y D-glucosa, glicerol y sacarosa, glicerol y D-xilosa, glicerol y maltosa y D-glucosa y fructosa son particularmente preferidas.

La concentración inicial de la fuente de carbono asimilable se ajusta preferentemente a un valor en un rango de 5 a 100 g/l, preferentemente de 5 a 75 g/l y más preferentemente de 5 a 50 g/l y se puede mantener en dicho rango durante el cultivo. El pH del medio de reacción se puede controlar mediante la adición de bases adecuadas como, por ejemplo, amoníaco gaseoso, NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃, NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, KHCO₃, Mg(OH)₂, MgCO₃, Mg(HCO₃)₂, Ca(OH)₂, CaCO₃, Ca(HCO₃)₂, CaO, CH₆N₂O₂, C₂H₇N y/o mezclas de los mismos. Estos agentes de neutralización alcalina son especialmente necesarios si los compuestos orgánicos que se forman durante el transcurso del procedimiento de fermentación son ácidos carboxílicos o ácidos dicarboxílicos. En el caso del ácido succínico como compuesto orgánico, Mg(OH)₂ y MgCO₃ son bases particulares preferidas.

5 La etapa de fermentación I) de acuerdo con la presente invención se puede realizar, por ejemplo, en fermentadores agitados, columnas de burbujas y reactores de bucle. Puede encontrar una descripción general de los posibles tipos de procedimientos, incluidos los tipos de agitadores y los diseños geométricos, en Chemiel: "Bio-prozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik", Volumen 1. En el procedimiento de acuerdo con la presente invención, las variantes típicas disponibles son las siguientes variantes conocidas por los expertos en la materia o explicadas, por ejemplo, en Chemiel, Hammes y Bailey: "Biochemical Engineering", tales como alimentación por lotes, alimentación discontinua, alimentación repetida discontinua o también fermentación continua con y sin reciclaje de la biomasa. Dependiendo de la cepa de producción, se pueden efectuar mezclas de aire, oxígeno, dióxido de carbono, hidrógeno, nitrógeno o gases apropiados para lograr un buen rendimiento (YP/S).

10 Las condiciones particularmente preferidas para producir el ácido orgánico, especialmente el ácido succínico, en la etapa I) del procedimiento son:

Fuente de carbono asimilable:	glicerol, sacarosa, D-glucosa, maltosa, glicerol + D-glucosa, glicerol + sacarosa, glicerol + maltosa, glicerol + D-xilosa, D-glucosa + fructosa
Temperatura:	30 a 45 °C
pH:	5,5 a 7,0
Gas suministrado:	CO ₂

15 Además, se prefiere en la etapa I) del procedimiento que la fuente de carbono asimilable se convierta en el compuesto orgánico, preferentemente en ácido succínico, con un rendimiento de carbono YP/S de al menos 0,5 g/g a aproximadamente 1,28 g/g; como por ejemplo un rendimiento de carbono YP/S de al menos 0,6 g/g, de al menos 0,7 g/g, de al menos 0,75 g/g, de al menos 0,8 g/g, de al menos 0,85 g/g, de al menos 0,9 g/g, de al menos 0,95 g/g, de al menos 1,0 g/g, de al menos 1,05 g/g, de al menos 1,1 g/g, de al menos 1,15 g/g, de al menos 1,20 g/g, de al menos 1,22 g/g, o de al menos 1,24 g/g (compuesto orgánico/carbono, preferentemente ácido succínico/carbono).

20 Además, se prefiere en la etapa I) del procedimiento que la fuente de carbono asimilable se convierta en el compuesto orgánico, preferentemente en ácido succínico, con un rendimiento de productividad específico de al menos 0,6 g/g DCW⁻¹h⁻¹ del compuesto orgánico, preferentemente ácido succínico, o al menos de al menos 0,65 g/g DCW⁻¹h⁻¹, de al menos 0,7 g/g DCW⁻¹h⁻¹, de al menos 0,75 g/g DCW⁻¹h⁻¹ o de al menos 0,77 g/g DCW⁻¹h⁻¹ del compuesto orgánico, preferentemente ácido succínico.

25 Además, se prefiere en la etapa I) del procedimiento que la fuente de carbono asimilable se convierta en el compuesto orgánico, preferentemente en ácido succínico, con un rendimiento espacio-temporal para el compuesto orgánico, preferentemente para el ácido succínico, de al menos 2,2 g/(l x h) o de al menos 2,5 g/(l x h), al menos 2,75 g/(l x h), al menos 3 g/(l x h), al menos 3,25 g/(l x h), al menos 3,5 g/(l x h), al menos 3,7 g/(l x h), al menos 4,0 g/(l x h) al menos 4,5 g/(l x h) o al menos 5,0 g/(l x h) del compuesto orgánico, preferentemente ácido succínico. De acuerdo con otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención en la etapa I) del procedimiento, el microorganismo modificado está convirtiendo al menos 20 g/l, más preferentemente al menos 25 g/l e incluso más preferentemente al menos 30 g/l de fuente de carbono asimilable, preferentemente una fuente de carbono asimilable seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o glicerol, en al menos 20 g/l, más preferentemente al menos 25 g/l e incluso más preferentemente al menos 30 g/l del compuesto orgánico, preferentemente ácido succínico.

35 Los diferentes parámetros de rendimiento descritos en el presente documento ("*rendimiento de carbono*" o "YP/S"; "*rendimiento de productividad específico*"; o "*rendimiento espacio-temporal (STY)*") son bien conocidos en la técnica y se determinan como se describe, por ejemplo, por Song and Lee, 2006. "*Rendimiento de carbono*" e "YP/S" (cada uno expresado en masa del compuesto orgánico producido/masa de fuente de carbono asimilable consumida) se usan en el presente documento como sinónimos. El rendimiento de productividad específico describe la cantidad de un producto, como el ácido succínico, que se produce por h y l de caldo de fermentación L por g de biomasa seca. La cantidad de peso de células secas indicada como "DCW" describe la cantidad de microorganismo biológicamente activo en una reacción bioquímica. El valor se da como g de producto por g de DCW por h (es decir, g/g DCW⁻¹h⁻¹). El rendimiento espacio-temporal (STY) se define como la relación entre la cantidad total de compuesto orgánico formado en el procedimiento de fermentación y el volumen del cultivo, considerado durante todo el tiempo de cultivo. El rendimiento espacio-temporal también se conoce como "*productividad volumétrica*".

45 En la etapa II del procedimiento, el compuesto orgánico, preferentemente ácido succínico, se recupera del caldo de fermentación obtenido en la etapa I) del procedimiento.

50 Normalmente, el procedimiento de recuperación comprende la etapa de separar los microorganismos recombinantes del caldo de fermentación como la llamada "biomasa". Los procedimientos para eliminar la biomasa son conocidos por los expertos en la materia y comprenden filtración, sedimentación, flotación o combinaciones de los mismos. En consecuencia, la biomasa se puede eliminar, por ejemplo, con centrifugadoras, separadores, decantadores, filtros o en un aparato de flotación. Para una recuperación máxima del producto de valor, el lavado de la biomasa suele ser recomendable, por ejemplo, en forma de diafiltración. La selección del procedimiento depende del contenido de biomasa en el caldo de fermentación y de las propiedades de la biomasa, y también de la interacción de la biomasa

con el compuesto orgánico (por ejemplo, el producto de valor). En una realización, el caldo de fermentación se puede esterilizar o pasteurizar. En una realización adicional, el caldo de fermentación se concentra. Dependiendo del requisito, esta concentración se puede hacer por lotes o de manera continua. El rango de presión y temperatura debe seleccionarse de modo que, en primer lugar, no se produzcan daños en el producto y, en segundo lugar, se requiera un uso mínimo del aparato y la energía. La selección adecuada de los niveles de presión y temperatura para una evaporación multietapa en particular permite el ahorro de energía.

El procedimiento de recuperación puede comprender además etapas de purificación adicionales en las que el compuesto orgánico, preferentemente ácido succínico, se purifica adicionalmente. Sin embargo, si el compuesto orgánico se convierte en un producto orgánico secundario mediante reacciones químicas como se describe a continuación y dependiendo del tipo de reacción y las condiciones de reacción, no necesariamente se requiere una purificación adicional del compuesto orgánico. Para la purificación del compuesto orgánico obtenido en la etapa II) del procedimiento, preferentemente para la purificación del ácido succínico, se pueden usar procedimientos conocidos por los expertos en la materia, como por ejemplo cristalización, filtración, electrodiálisis y cromatografía. En el caso del ácido succínico como compuesto orgánico, por ejemplo, el ácido succínico se puede aislar precipitándolo como un producto de succinato de calcio usando hidróxido, óxido, carbonato o hidrógenocarbonato de calcio para neutralizar y filtrar el precipitado. El ácido succínico se recupera del succinato de calcio precipitado mediante acidificación con ácido sulfúrico, seguido de filtración para eliminar el sulfato de calcio (yeso) que precipita. La solución resultante puede purificarse adicionalmente por medio de cromatografía de intercambio iónico con el fin de eliminar los iones residuales no deseados. De modo alternativo, si se han usado hidróxido de magnesio, carbonato de magnesio o mezclas de los mismos para neutralizar el caldo de fermentación, el caldo de fermentación obtenido en la etapa I) del procedimiento puede acidificarse para transformar el succinato de magnesio contenido en el medio en la forma ácida (es decir, ácido succínico), que posteriormente puede cristalizarse enfriando el medio acidificado. Ejemplos de otros procedimientos de purificación adecuados se describen en los documentos EP-A-1 005 562, WO-A-2008/010373, WO-A-2011/082378, WO-A-2011/043443, WO-A-2005/030973, WO-A-2011/123268 y WO-A-2011/064151 y EP-A-2 360 137.

De acuerdo con una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención, el procedimiento comprende además la etapa del procedimiento:

III) convertir el compuesto orgánico contenido en el caldo de fermentación obtenido en la etapa I) del procedimiento o convertir el compuesto orgánico recuperado obtenido en la etapa de procedimiento II) en un producto orgánico secundario que es diferente del compuesto orgánico en al menos una reacción química.

En el caso del ácido succínico como compuesto orgánico, los productos orgánicos secundarios preferidos se seleccionan del grupo que consiste en ésteres de ácido succínico y sus polímeros, tetrahidrofurano (THF), 1,4-butanodiol (BDO), gamma-butirolactona (GBL) y pirrolidonas.

De acuerdo con una realización preferida para la producción de THF, BDO y/o GBL, este procedimiento comprende:

b1) o bien la hidrogenación catalítica directa del ácido succínico obtenido en las etapas I) o II) del procedimiento a THF y/o BDO y/o GBL o

b2) la esterificación química del ácido succínico y/o las sales del ácido succínico obtenidas en las etapas I) o II) del procedimiento en su correspondiente éster di-alquilo inferior y la subsiguiente hidrogenación catalítica de dicho éster a THF y/o BDO y/o GBL.

De acuerdo con una realización preferida para la producción de pirrolidonas, este procedimiento comprende:

b) la conversión química de las sales de amonio del ácido succínico obtenidas en las etapas I) o II) del procedimiento en pirrolidonas de una manera conocida per se.

Para detalles de la preparación de estos compuestos se hace referencia a los documentos US-A-2010/0159543 y WO-A-2010/092155.

Además, se proporciona una contribución para resolver los problemas mencionados al principio mediante el uso del microorganismo modificado de acuerdo con la presente invención para la producción fermentativa de compuestos orgánicos. Compuestos orgánicos preferidos son aquellos compuestos que ya se han mencionado en relación con el procedimiento de acuerdo con la presente invención, siendo el ácido succínico el compuesto orgánico más preferido. Además, las condiciones preferidas para la producción fermentativa de compuestos orgánicos, preferentemente de ácido succínico, son aquellas condiciones que ya se han descrito en relación con la etapa I) del procedimiento del procedimiento de acuerdo con la presente invención.

La invención se explica ahora con más detalle con la ayuda de figuras y ejemplos no limitativos.

La Figura 1 muestra un mapa esquemático del plásmido pSacB (**SEQ ID NO: 5**).

La Figura 2 muestra un mapa esquemático del plásmido pSacB Δ/dhA (**SEQ ID NO: 6**).

La Figura 3 muestra un mapa esquemático del plásmido pSacB $\Delta pflA$ (SEQ ID NO: 7).

La Figura 4 muestra un mapa esquemático del plásmido pSacB $\Delta wcaJ$ (SEQ ID NO: 8).

La Figura 5 muestra un mapa esquemático del plásmido pSacB $\Delta pflD$ (SEQ ID NO: 9).

La Figura 6 muestra un sedimento de células obtenido por sedimentación de diferentes medios de cultivo.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimiento general para la transformación de *Basfia succiniciproducens*

Tabla 1: Nomenclatura de la DD1 de tipo silvestre y mutantes mencionados en los ejemplos

Cepa
DD1 tipo silvestre (depósito DSM 18541)
DD1 $\Delta wcaJ$
DD1 $\Delta ldhA$
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflD$
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflD \Delta wcaJ$
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA$
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA \Delta wcaJ$

10 *Basfia succiniciproducens* DD1 (tipo silvestre) se transformó con ADN mediante electroporación utilizando el siguiente protocolo:

15 Para preparar un cultivo previo, se inoculó DD1 de un lote congelado en 40 ml de BHI (infusión de cerebro y corazón; Becton, Dickinson and Company) en un matraz de agitación de 100 ml. La incubación se realizó durante la noche a 37 °C; 200 rpm. Para preparar el cultivo principal, se colocaron 100 ml de BHI en un matraz de agitación de 250 ml y se inocularon hasta una DO final (600 nm) de 0,2 con el precultivo. La incubación se realizó a 37 °C, 200 rpm. Las células se recogieron a una DO de aproximadamente 0,5, 0,6 y 0,7, el sedimento se lavó una vez con glicerol frío al 10 % a 4 °C y se resuspendió en 2 ml de glicerol al 10 % (4 °C).

20 Se mezclaron 100 μ l de células competentes con 2-8 μ g de ADN de plásmido y se mantuvieron en hielo durante 2 minutos en una cubeta de electroporación con un ancho de 0,2 cm. Electroporación en las siguientes condiciones: 400 Ω ; 25 μ F; 2,5 kV (Gene Pulser, Bio-Rad). Se añadió 1 ml de BHI enfriado inmediatamente después de la electroporación y se realizó la incubación durante aproximadamente 2 horas a 37 °C.

Las células se colocaron en placas con BHI con 5 mg/l de cloranfenicol y se incubaron durante 2 a 5 días a 37 °C hasta que las colonias de los transformantes eran visibles. Los clones se aislaron y se volvieron a sembrar en estría en BHI con 5 mg/l de cloranfenicol hasta que se obtuvo la pureza de los clones.

Ejemplo 2: Generación de construcciones de delección

25 Los plásmidos de mutación/delección se construyeron basándose en el vector pSacB (SEQ ID NO: 5). La Figura 1 muestra un mapa esquemático del plásmido pSacB. Las regiones flanqueantes en 5' y 3' (aproximadamente 1500 pb cada una) del fragmento cromosómico, que deberían deleccionarse, se amplificaron mediante PCR a partir del ADN cromosómico de *Basfia succiniciproducens* y se introdujeron en dicho vector utilizando técnicas estándar. Normalmente, al menos el 80 % del ORF fue objeto de una delección. De esta manera, se construyeron los plásmidos de delección para la lactato deshidrogenasa *ldhA*, pSacB_delta_ *ldhA* (SEQ ID NO: 6), la enzima activadora de la piruvato formiato liasa *pflA*, pSacB_delta_ *pflA* (SEQ ID NO: 7), el supuesto transportador específico de fructosa *wcaJ*, pSacB_delta_ *wcaJ* (SEQ ID NO: 8) y la piruvato formiato liasa *pflD*, pSacB_delta_ *pflD* (SEQ ID NO: 9). Las Figuras 2, 3, 4 y 5 muestran mapas esquemáticos del plásmido pSacB_delta_ *ldhA*, pSacB_delta_ *pflA*, pSacB_delta_ *wcaJ* y pSacB_delta_ *pflD*, respectivamente.

35 En la secuencia plasmídica de pSacB (SEQ ID NO: 5) el gen *sacB* está contenido en las bases 2380-3801. El promotor *sacB* está contenido en las bases 3802-4264. El gen del cloranfenicol está contenido en las bases 526-984. El origen de replicación para *E. coli* (*ori* EC) está contenido en las bases 1477-2337 (ver fig. 1).

40 En la secuencia plasmídica de pSacB_delta_ *ldhA* (SEQ ID NO: 6) la región flanqueante en 5' del gen *ldhA*, que es homóloga al genoma de *Basfia succiniciproducens*, está contenida en las bases 1519-2850, mientras que la región flanqueante en 3' del gen *ldhA*, que es homóloga al genoma de *Basfia succiniciproducens*, está contenida en las bases 62-1518. El gen *sacB* está contenido en las bases 5169-6590. El promotor *sacB* está contenido en las bases 6591-7053. El gen del cloranfenicol está contenido en las bases 3315-3773. El origen de replicación para *E. coli* (*ori* EC) está contenido en las bases 4266-5126 (ver fig. 2).

En la secuencia plasmídica de pSacB_delta_ *pflA* (SEQ ID NO: 7) la región flanqueante en 5' del gen *pflA*, que es homóloga al genoma de *Basfia succiniciproducens*, está contenida en las bases 1506-3005, mientras que la región flanqueante en 3' del gen *pflA*, que es homóloga al genoma de *Basfia succiniciproducens*, está contenida en las bases 6-1505. El gen *sacB* está contenido en las bases 5278-6699, el promotor *sacB* está contenido en las bases 6700-7162. El gen del cloranfenicol está contenido en las bases 3424-3882. El origen de replicación para *E. coli* (*ori* EC) está contenido en las bases 4375-5235 (ver fig. 3).

En la secuencia plasmídica de pSacB_delta_ *wcaJ* (SEQ ID NO: 8) la región flanqueante en 5' del gen *wcaJ*, que es homóloga al genoma de *Basfia succiniciproducens*, está contenida en las bases 1506-3122, mientras que la región flanqueante en 3' del gen *wcaJ*, que es homóloga al genoma de *Basfia succiniciproducens*, está contenida en las bases 6-1505. El gen *sacB* está contenido en las bases 5395-6816. El promotor *sacB* está contenido en las bases 6817-7279. El gen del cloranfenicol está contenido en las bases 3541-3999. El origen de replicación para *E. coli* (*ori* EC) está contenido en las bases 4492-5352 (ver fig. 4).

En la secuencia plasmídica de pSacB_delta_ *pflD* (SEQ ID NO: 9) la región flanqueante en 5' del gen *pflD*, que es homóloga al genoma de *Basfia succiniciproducens*, está contenida en las bases 1533-2955, mientras que la región flanqueante en 3' del gen *pflD*, que es homóloga al genoma de *Basfia succiniciproducens*, está contenida en las bases 62-1532. El gen *sacB* está contenido en las bases 5256-6677. El promotor *sacB* está contenido en las bases 6678-7140. El gen del cloranfenicol está contenido en las bases 3402-3860. El origen de replicación para *E. coli* (*ori* EC) está contenido en las bases 4353-5213 (ver fig. 5).

Ejemplo 3: Generación de cepas productoras de succinato mejoradas

a) *Basfia succiniciproducens* DD1 se transformó como se describió anteriormente con el pSacB_delta_ *ldhA* y fue "Campbellled in" para producir la cepa "Campbell in". La transformación e integración en el genoma de *Basfia succiniciproducens* fue confirmado por PCR para obtener el evento de integración del plásmido en el genoma de *Basfia succiniciproducens*.

La cepa "Campbell in" fue a continuación "Campbellled out" utilizando placas de agar que contenían sacarosa como un medio de selección de contador, seleccionando la pérdida (de función) del gen *sacB*. Por lo tanto, las cepas "Campbell in" se incubaron en 25-35 ml de medio no selectivo (BHI sin antibióticos) a 37 °C, 220 rpm durante la noche. El cultivo durante la noche se extendió luego sobre placas de sacarosa que contenían BHI recién preparado (10 %, sin antibióticos) y se incubó durante la noche a 37 °C ("primera transferencia de sacarosa"). Una sola colonia obtenida de la primera transferencia se sembró nuevamente en placas de sacarosa que contenían BHI recién preparado (10 %) y se incubó durante la noche a 37 °C ("segunda transferencia de sacarosa"). Este procedimiento se repitió hasta un mínimo de cinco transferencias ("tercera, cuarta, quinta transferencia de sacarosa") en sacarosa. La expresión "primera a quinta transferencia de sacarosa" se refiere a la transferencia de una cepa después de la integración cromosómica de un vector que contiene un gen *sacB* de la levansacarosa sobre placas de agar que contienen sacarosa y medio de crecimiento con el fin de seleccionar cepas con la pérdida del gen *sacB* y las secuencias plasmídicas circundantes. Una sola colonia de las quintas placas de transferencia se inoculó en 25-35 ml de medio no selectivo (BHI sin antibióticos) y se incubó a 37 °C, 220 rpm durante la noche. El cultivo de una noche se diluyó en serie y se sembró en placas de BHI para obtener colonias individuales aisladas.

Las cepas "Campbellled out" que contienen la mutación/delección del gen *ldhA* fueron confirmados por la sensibilidad al cloranfenicol. Los mutantes de mutación/delección entre estas cepas se identificaron y confirmaron mediante análisis de PCR. Esto condujo al mutante de delección de *ldhA* de *Basfia succiniciproducens* DD1 Δ *ldhA*.

b) *Basfia succiniciproducens* DD1 Δ *ldhA* fue transformada con pSacB_delta_ *pflD* como se describió anteriormente y "Campbellled in" para producir una cepa "Campbell in". La transformación e integración se confirmó por PCR. La cepa "Campbell in" fue a continuación "Campbellled out" como se describió anteriormente. Los mutantes de delección entre estas cepas se identificaron y confirmaron mediante análisis de PCR. Esto condujo al mutante de doble delección de *ldhA pflD* de *Basfia succiniciproducens* DD1 Δ *ldhA* Δ *pflD*.

c) *Basfia succiniciproducens* DD1 Δ *ldhA* Δ *pflD* fue transformada con pSacB_delta_ *wcaJ* como se describió anteriormente y "Campbellled in" para producir una cepa "Campbell in". La transformación e integración se confirmó por PCR. La cepa "Campbell in" fue a continuación "Campbellled out" como se describió anteriormente. Los mutantes de delección entre estas cepas se identificaron y confirmaron mediante análisis de PCR. Esto condujo al mutante de triple delección de *ldhA pflD wcaJ* de *Basfia succiniciproducens* DD1 Δ *ldhA* Δ *pflD* Δ *wcaJ*.

d) *Basfia succiniciproducens* DD1 Δ *ldhA* fue transformada con pSacB_delta_ *pflA* como se describió anteriormente y "Campbellled in" para producir una cepa "Campbell in". La transformación e integración se confirmó por PCR. La cepa "Campbell in" fue a continuación "Campbellled out" como se describió anteriormente. Los mutantes de delección entre estas cepas se identificaron y confirmaron mediante análisis de PCR. Esto condujo al mutante de doble delección de *ldhA pflA* de *Basfia succiniciproducens* DD1 Δ *ldhA* Δ *pflA*.

e) *Basfia succiniciproducens* DD1 Δ *ldhA* Δ *pflA* fue transformada con pSacB_delta_ *wcaJ* como se describió anteriormente y "Campbellled in" para producir una cepa "Campbell in". La transformación e integración se

confirmó por PCR. La cepa “Campbell in” fue a continuación “Campbelled out” como se describió anteriormente. Los mutantes de delección entre estas cepas se identificaron y confirmaron mediante análisis de PCR. Esto condujo al mutante de triple delección de *ldhA pflA wcaJ* de *Basfia succiniciproducens* DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA \Delta wcaJ$.

- 5 f) *Basfia succiniciproducens* DD1 se transformó con pSacB_delta_wcaJ como se describió anteriormente y “Campbelled in” para producir una cepa de “Campbell in”. La transformación e integración se confirmó por PCR. La cepa “Campbell in” fue a continuación “Campbelled out” como se describió anteriormente. Los mutantes de delección entre estas cepas se identificaron y confirmaron mediante análisis de PCR. Esto condujo al mutante de delección de *wcaJ* de *Basfia succiniciproducens* DD1 $\Delta wcaJ$.

Ejemplo 4: Cultivo de varias cepas DD1 en glucosa y sacarosa

- 10 La productividad de la DD1 se comparó con la productividad de la cepa mutante DD1 $\Delta wcaJ$ en presencia de glucosa o sacarosa como fuente de carbono.

La productividad de la DD1 $\Delta ldhA \Delta pflD$ se comparó con la productividad de la cepa mutante DD1 $\Delta ldhA \Delta pflD \Delta wcaJ$ en presencia de glucosa o sacarosa como fuente de carbono.

- 15 La productividad de la DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA$ se comparó con la productividad de la cepa mutante DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA \Delta wcaJ$ en presencia de glucosa o sacarosa como fuente de carbono.

La productividad se analizó utilizando los medios y las condiciones de incubación que se describen a continuación.

1. Preparación del medio

La composición y preparación del medio de cultivo es como se describe en las siguientes tablas 2, 3, 4 y 5.

Tabla 2: Composición de la solución de oligoelementos.

Solución de oligoelementos	
Compuesto	Concentración final
Ácido cítrico	3,5 g/l
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	1851 mg/l
CaSO ₄ × 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	2040 mg/l
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	12460 mg/l
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	1200 mg/l
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	38 mg/l
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	188 mg/l
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	32 mg/l
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	101 mg/l

20

Tabla 3: Composición de la solución de vitaminas.

Solución de vitaminas	
Compuesto	Concentración final
Tiamina HCl (B1)	500 mg/l
Ácido nicotínico (B3)	500 mg/l
Riboflavina (B2)	20 mg/l
Biotina (B7)	5 mg/l
Ácido pantoténico (B5)	100 mg/l
Piridoxina (B6)	500 mg/l
Cianocobalamina (B12)	5 mg/l
Ácido lipoico	5 mg/l

Tabla 4: Composición del medio LSM para el cultivo en glucosa.

Compuesto	Volumen/Masa	Concentración del lote	Concentración final
Medio 1			
MgCO ₃	2,5 g	100 %	50,00 g/l
Agua	28 ml	-	-
Medio 2			
Ácido succínico	2,5 ml	50 g/l	2,50 g/l
Glucosa	4,00 ml	650 g/l	52,00 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25 ml	500 g/l	2,50 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5 ml	200 g/l	2,00 g/l
K ₂ CO ₃	0,50 ml	200 g/l	2,00 g/l
KH ₂ PO ₄	0,50 ml	100 g/l	1,00 g/l
Na ₂ CO ₃	0,50 ml	200 g/l	2,00 g/l
solución de vitaminas	0,50 ml	25 g/l	0,25 g/l
solución de oligoelementos	0,50 ml	21 g/l	0,21 g/l

Tabla 5: Composición del medio LSM para el cultivo en sacarosa.

Compuesto	Volumen/Masa	Concentración del lote	Concentración final
Medio 1			
MgCO ₃	2,5 g	100 %	50,00 g/l
Agua	28 ml	-	-
Medio 2			
Ácido succínico	2,5 ml	50 g/l	2,50 g/l
Sacarosa	3,85 ml	650 g/l	50,00 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25 ml	500 g/l	2,50 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5 ml	200 g/l	2,00 g/l
K ₂ CO ₃	0,50 ml	200 g/l	2,00 g/l
KH ₂ PO ₄	0,50 ml	100 g/l	1,00 g/l
Na ₂ CO ₃	0,50 ml	200 g/l	2,00 g/l
solución de vitaminas	0,50 ml	25 g/l	0,25 g/l
solución de oligoelementos	0,50 ml	21 g/l	0,21 g/l

5 2. Cultivos y análisis.

Para cultivar las bacterias del cultivo principal de una placa de BHI-agar recién cultivada se usó para inocular hasta una DO600 = 0,75 una botella de 100 ml de suero con tapón de caucho de butilo hermético que contiene 50 ml del medio líquido descrito en las tablas 2 y 3 con una atmósfera de CO₂. Las botellas se incubaron a 37 °C y 160 rpm (diámetro de agitación: 2,5 cm). El consumo de las fuentes de C y la producción de ácidos carboxílicos se cuantificó mediante HPLC (los procedimientos de HPLC se describen en las tablas 10 y 11) después de 24 h o 48 h. El crecimiento celular se midió midiendo la absorbancia a 600 nm (DO600) utilizando un espectrofotómetro (Ultrospec3000, Amersham Biosciences, Uppsala Suecia).

3. Resultados

Los resultados de los experimentos de cultivo con diferentes cepas DD1 se muestran en las tablas 6, 7 y 8. Como se puede ver a partir de estos resultados, una reducción de la actividad de la enzima que está codificada por la célula *ΔwcaJ* conduce a una mayor producción de ácido succínico.

Además, muestras obtenidas por cultivo de la cepa DD1 $\Delta ldhA \Delta pfID/DD1 \Delta ldhA \Delta pfIA$ y la cepa DD1 $\Delta ldhA \Delta pfID \Delta wcaJ/DD1\Delta ldhA \Delta pfIA \Delta wcaJ$ después de 24 horas o 48 horas de incubación se transfirieron a un tubo de 15 ml para medir los volúmenes de sobrenadante obtenidos después de la centrifugación. Como se muestra en la tabla 9, una reducción de la actividad de la enzima que está codificada por la célula $\Delta wcaJ$ conduce a microorganismos modificados que muestran un comportamiento de sedimentación significativamente mejorado (se obtiene un sedimento celular más denso después de la centrifugación) y, por lo tanto, se pueden eliminar más fácilmente del medio de cultivo en el procedimiento de purificación posterior.

Tabla 6: Cultivo de la cepa DD1 y la cepa DD1 $\Delta wcaJ$ en glucosa y sacarosa.

	DD1	DD1 $\Delta wcaJ$	DD1	DD1 $\Delta wcaJ$
sustrato	glucosa	glucosa	sacarosa	sacarosa
tc [h] ^a	24	24	48	48
$\Delta C_{\text{sustrato}}$ [g/l] ^b	48,4	48,4	48,6	48,1
ΔC_{SA} [g/l] ^c (ácido succínico)	26,1	28,2	22,0	24,3
ΔC_{LA} [g/l] ^{c, h} (ácido láctico)	5,1	3,3	11,8	10,0
ΔC_{FA} [g/l] ^{c, h} (ácido fórmico)	4,8	4,2	4,1	4,2
ΔC_{AA} [g/l] ^{c, h} (ácido acético)	7,2	7,2	6,2	6,9
ΔC_{PA} [g/l] ^{c, h} (ácido pirúvico)	0,0	0,0	0,0	0,0
ΔC_P [g/l] ^{c, h} (ácido propiónico)	0,0	0,0	0,0	0,0
ΔC_E [g/l] ^c (etanol)	0,3	0,2	0,3	0,2
Rendimiento de AS (AS/S) [g/g] ^g	0,54	0,58	0,45	0,50
^a tiempo de cultivo ^b consumo de sustrato (glucosa o sacarosa). ^c formación de ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido pirúvico, ácido propiónico y etanol. ^g Rendimiento de AS (ración de AS por sustrato consumido) ^h Los límites de detección para el ácido acético, el ácido láctico, el ácido málico y el ácido fórmico fueron inferiores a 0,01 g/l en el procedimiento de HPLC dado				

Tabla 7: Cultivo de la cepa DD1 $\Delta ldhA \Delta pfID$ y la cepa DD1 $\Delta ldhA \Delta pfID \Delta wcaJ$ en glucosa y sacarosa.

	DD1 $\Delta ldhA \Delta pfID$	DD1 $\Delta ldhA \Delta pfID \Delta wcaJ$	DD1 $\Delta ldhA \Delta pfID$	DD1 $\Delta ldhA \Delta pfID \Delta wcaJ$
sustrato	glucosa	glucosa	sacarosa	sacarosa
tc [h] ^a	24	24	48	48
$\Delta C_{\text{sustrato}}$ [g/l] ^b	49,95	49,95	50,40	50,40
ΔC_{SA} [g/l] ^c (ácido succínico)	31,45	32,80	28,82	36,94
ΔC_{LA} [g/l] ^{c, h} (ácido láctico)	0,22	0,16	0,35	0,22
ΔC_{FA} [g/l] ^{c, h} (ácido fórmico)	0,00	0,00	0,00	0,00
ΔC_{AA} [g/l] ^{c, h} (ácido acético)	2,89	4,48	1,39	5,45
ΔC_{PA} [g/l] ^{c, h} (ácido pirúvico)	1,87	0,94	2,70	0,23
ΔC_P [g/l] ^{c, h} (ácido propiónico)	0,00	0,00	0,00	0,00
ΔC_E [g/l] ^c (etanol)	0,00	0,00	0,00	0,00
Rendimiento de AS (AS/S) [g/g] ^g	0,63	0,66	0,57	0,73
^a tiempo de cultivo ^b consumo de sustrato (glucosa o sacarosa). ^c formación de ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido pirúvico, ácido propiónico y etanol. ^g Rendimiento de AS (ración de AS por sustrato consumido) ^h Los límites de detección para el ácido acético, el ácido láctico, el ácido málico y el ácido fórmico fueron inferiores a 0,01 g/l en el procedimiento de HPLC dado				

Tabla 8: Cultivo de la cepa DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA$ y la cepa DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA \Delta wcaJ$ en glucosa y sacarosa

	DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA$	DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA \Delta wcaJ$	DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA$	DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA \Delta wcaJ$
sustrato	glucosa	glucosa	sacarosa	sacarosa
tc [h] ^a	24	24	48	48
$\Delta C_{\text{sustrato}}$ [g/l] ^b	49,95	49,95	50,40	50,40
ΔC_{SA} [g/l] ^c (ácido succínico)	32,37	31,77	29,36	31,36
ΔC_{LA} [g/l] ^{c, h} (ácido láctico)	0,23	0,28	0,37	0,37
ΔC_{FA} [g/l] ^{c, h} (ácido fórmico)	0,00	0,00	0,00	0,00
ΔC_{AA} [g/l] ^{c, h} (ácido acético)	2,68	2,40	0,90	1,87
ΔC_{PA} [g/l] ^{c, h} (ácido pirúvico)	1,96	2,05	3,16	2,49
ΔC_P [g/l] ^{c, h} (ácido propiónico)	0,00	0,00	0,00	0,00
ΔC_E [g/l] ^c (etanol)	0,00	0,00	0,00	0,00
Rendimiento de AS (AS/S) [g/g] ^g	0,65	0,64	0,58	0,62
^a tiempo de cultivo ^b consumo de sustrato (glucosa o sacarosa). ^c formación de ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido pirúvico, ácido propiónico y etanol. ^g Rendimiento de AS (ración de AS por sustrato consumido) ^h Los límites de detección para el ácido acético, el ácido láctico, el ácido málico y el ácido fórmico fueron inferiores a 0,01 g/l en el procedimiento de HPLC dado				

Tabla 9: Volúmenes de sobrenadante obtenidos después de la centrifugación (4.600 rpm, 10 min) de 10 ml de cultivos bacterianos.

Cepa	Sustrato	Tiempo de cultivo	Volumen de sobrenadante
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflD$	glucosa	24 h	8,0 ml
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflD \Delta wcaJ$	glucosa	24 h	8,8 ml
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA$	glucosa	24 h	8,0 ml
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA \Delta wcaJ$	glucosa	24 h	8,4 ml
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflD$	sacarosa	48 h	8,3 ml
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflD \Delta wcaJ$	sacarosa	48 h	9,0 ml
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA$	sacarosa	48 h	8,3 ml
DD1 $\Delta ldhA \Delta pflA \Delta wcaJ$	sacarosa	48 h	8,6 ml

Tabla 10: Procedimiento de HPLC (ZX-THF50) para el análisis de glucosa, ácido succínico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido acético, ácido pirúvico y etanol

Columna de HPLC	Aminex HPX-87 H, 300 x 7,8 mm (BioRad)
Precolumna	Cation H
Temperatura	50 °C
Caudal de eluyente	0,50 ml/min
Volumen de inyección	5,0 μ l
Detector de red de diodos	Detector IR
Tiempo de ejecución	28 min
Presión máx.	140 bar
Eluyente A	H ₂ SO ₄ 5 mM
Eluyente b	H ₂ SO ₄ 5 mM

(continuación)

Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]	Caudal [ml/min]
	0,0	50	50	0,50
	28,0	50	50	0,50

Tabla 11: Procedimiento de HPLC (Fast-CH) para el análisis de glucosa y sacarosa

Columna de HPLC	Fast Carbohydrate x 7,8 mm (BioRad)			
Precolumna	Cartuchos de recarga con extracción de cenizas (30 °C)			
Temperatura	75 °C			
Caudal de eluyente	1,00 ml/min			
Volumen de inyección	1,0 µl			
Detector de red de diodos	Detector IR			
Tiempo de ejecución	8 min			
Presión máx.	150 bar			
Eluyente A	agua			
Eluyente b	agua			
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]	Caudal [ml/min]
	0,0	50	50	1,00
	8,0	50	50	1,00

5 **SECUENCIAS**

SEQ ID NO: 1 (secuencia nucleotídica del ADNr 16 S de la cepa DD1)

tttgatcctggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgaacggtagcgggaggaaagcttcttcttgcgga
cgagtgccgggacgggtgagtaalgcttggggatctggcttagggaggggataacgacgggaaactgctgctaatacccgtaatat
cttcggataaagggtgggacttccggccaccgccataagatgagcccaagtgaggattaggtgtggtgggtaaaaggcctacc
aagccgacgactctagctggctgagaggatgaccagccactggaactgagacacggctccagactcctacgggaggcagca
gtgggaatattgcaaatgggggaaccctgatgagccatgcccgtgaatgaagaaggcctcgggtgaaagtcttctcgggtg
acgaggaagggtgtttaaataaggacaagcaatgacgtaatacagaaagcaccggctaactccgtgccagcagcccggt
aatacggagggtgcgagcgttaactggaataactggcgtaaaaggcatgacggcggactttaagtgagatgtaaagccccgg
gcttaacctgggaattgcaattcagactgggagctagagtaactttagggagggtagaattccacgtgtagcgggtaaatgcgtagag
atgtggaggaataccgaaggcgaaggcagccccctgggaagatactgacgctcatatgcgaaagcgtggggagcaaacaggatt
agataccctggtagtccaagcggtaaacgctgctgattggggatggccttaggcctgctcgtagctaacgtgataaatcgacc
gcctggggagtagcggccgcaaggtaaaactcaaatgaattgacggggcccgcaaacgctggagcagtggttaattcgtg
caacgcgaagaaccttactcttgcacatccagagaalctgtagagatacgggagtgctcgggagctctgagacaggctg
catggctgctcagctcgtgttgtaaatgttgggttaagtcccgaacgagcgaacccttatccttgttccagcatgaaagatgg
gaaactcaaaaggagactcgggtgacaaaccgggaggaagggtggggatgacgtcaagtcacatggcccttacgagtagggctaca
cacgtgctacaatggfcatagagggggcgataccgaggttagagcgaatcfcagaaagtgcacgtgtagtccggatfggagt
ctgcaactcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgcaaatcagaatgttgcgggtaatacgtcccgggcttctacacaccg
cccgctcacacatgggagtggtgtaccagaagtagatagctaacctcggggggggcgtttaccacgglatgattcaigactggg
gtgaagtcgtaacaagtaaccgtaggggaacctgcgg

SEQ ID NO: 2 (secuencia nucleotídica del ADNr 23 S de la cepa DD1)

agtaataacgaacgacacaggtataagaalacttgagggtgtaggtaagtgactaagcgtacaagggtgagcctggcaatcaga
 ggcgaagaaggacgtgctaactcgcgaaaagcctgggtgagtgataagaagcgtctaaccaagatatccgaatggggcaacc
 agtagatgaagaatctactatcaataaccgaatccataggtaltgaggcaaacccgggagaaactgaaacatctaagtaaccgagg
 aaaagaaatcaaccgagattacgtcagtagcggcgagcgaagcgtagagccggcaagtagatgcatgaggattagaggaat
 cggctgggaagccggcgacagggtagccccgtaactgaaatcattgtgtgtagctgagcctgcgagaagtagggcgggga
 cacgagaaatcctgttgaagaaggggggacatcctcaaggctaaatacctgattgaccgatagtaaccagtaactgtgaagg
 aaaggcgaaaagaaccgggtgaggggagtgaaatagaacctgaaacctgtacgtaacagcagtgaggagcccgaggggtga
 ctgctgacctttgtataatgggtcagcgaactatattatgtagcaggttaaccgaataggggagccgaagggaaccgagcttaact
 gggcgtcaggtgcatgatatagaccgaaaccgggtgactgacctggcgagggtgaagggtggtaacactaactggaggacc
 gaaccgactaatgtgaaaaattgaggatgacctgtggctgggggtaaaaggccaatcaaacggggagatgctggttccccg
 aatctatttagtagagcctatgtgaatacctcggggtagagcactgttccgtagggggccatcccggctaccaaccgagtc
 aaactgcgaataccgaagagtaatgcataggagacacacggcgggtgtaaccgttcgctgtagaggggaaacaaccagacc
 gccagctaaaggtccaaagttatattaagtggaaacgaagtggaaggcttagacagctaggatgtggctagaagcagccatc
 attaaagaaagcgtaatagctcactagctcagctcggctcgcgggaagatgtaacgggctcaataagcaccgaagctcggc
 atcaggcgaagcctgttggtaggggagcgtcgtgtaagcggaaagaaggtggtcgaagggctcgtgacgtaacagagtgcc
 aatgctgacataagtaacgataaaacgggtgaaaaccggtcgcgggaagaccaaggggtcctgccaacttaacggggcag
 ggtgagtcggccctaaaggcagggctgaagagcgtatgcaglggaaacgggtaataatcccgtactgttataattgcatgtggg
 gacggagtaggttagttatcgacctgtgaaaaggtcgttaagttgtaggggagcgttaggcaaatccggacgctatcaaca
 ccgagagatgatgacgagggcctaagggtccgaagtaaccgataccacactccaggaaaagccactaagcgtcagattataata
 aaccgtaactaaaccgacacaggtggtcaggtagagaatactcagggcctgagagaaactcgggtgaaggactagggcaata

gcaccgtaactcgggagaaggtgcccggcgtagattgtagaggataaccctgaaaggtgaaaccggtcgaagtgacccgctggct
 gcaactgttattaaaacacagcaactctgcaaacacgaaagtggaagcgtataggggtgtagctgcccgggtgctggaaggtaattg
 atggcgtatcgaagagaagcgcctgatcgaagccccagtaaacggcggccgtaactataaccgctcctaaggtagcgaatcctt
 gtcgggtaagttccgacctgcacgaatggcataatgatggccaggctgtctcccccagactcagtgaaattgaaatcccggtgaa
 gatcgggtgacctccggcctagacggaagaccgggtaaccttactatagcttgacactgaacctgaaattttagtgtaggatag
 ggggaggcttgaaagcggtaacgccagttalcgtaggacatccttgaaataaccaccittaacgtttgatgttcaacgaagtgccc
 gaaccgggtactcggacagtgctggggtagttgactggggcgtcctcccaagagtaacggaggagcacgaaaggttgctta
 algacggtcggacatcgtcaggttagtgcaatgggataagcaagcttaactcgaagcggacaagtcgagcaggtgcaagagcag
 gfcatalgtatccgggtggtcgaatggaagggccatcgctcaacggataaaaggtactccggggaatacaggctgataccgcca
 agagttcatatcagcggcgggttggcaccctgatgctggctatcacaacctggggctgaagtaggctccaagggatggtgcttcc
 cattaaagtgtagcagcagctgggtttaaaccgtcgtgagacagtttggcctactcggcgtgggagattgagaggggct
 gctcctagtagcagagaccggagtgagcagcatcactggtgtccgggtgtgctgccagacgattcggggtagctacatcgggaa
 gagataagtgctgaaagcatctaagcagcaaacctgcctcagatgagttcctccagtaataactgtaaggggtgtggaagcagc
 gacgtagataggccgggtgtgtaagcgttgcgagacgttgagcctaaccggtactaattgcccagagggcttagccatacaacgctca
 agtgttttggtagtgaagattaccggaataagtaagtagtcaggggaatcggct

SEQ ID NO: 3 (secuencia nucleotídica del gen *wcaJ* de la cepa DD1)

atgataaaacgcctttcgatattgttcgcaatgtagcattgattgtttcgccttataattgttggctataaggtaaaacaaaatt
 gggatcaccgggtgatttaaaacaaaccgccccggatgcatggttaaacccttgagatgataagtcagaacaatgaaagcggc
 gcagatgaaaaacggtaataatcccggatcgggagcgcctaacaccltccgcaaaatgttgcgcgctaccagctcggacgagtgcc
 ggaacttggaaatgattaaaagggtgatatgagctggtggggccgctcctactgatggaataattgcccgtgataacgaaagaca
 ggctaagcgcctgaagtgaaaccgggaattaccgggtatgcaggttaaaccggtcgaatgccatcagttgggagcagaaattg
 aattgatgctggtatgtgaacatcaatcctgtggctgattgaaaattatcgaaagaccatccaaaaagtgatcgcaaaagac
 gatattaatgcggcagatgaccacatgcctaaattgaagggaataaaaaatcatga

5 **SEQ ID NO: 4** (secuencia de aminoácidos de la enzima codificada por el gen *wcaJ* anterior)

MIKRLFDIVVALIALILFSPLYLVFVAYKVKQNLGSPVLFKQTRPGLHGKPFEMIKFRTMKDGADEN
 GNILPDAERLTPFGKMLRATSLDELPELWNVLKGDMSLVGPRPLLMEYLPLYNERQAKRHEVK
 PGITGYAQNVRNAISWEQKFELDAWYVEHQSLWLDLKI AKTIQKVIKDDINAADDATMPKFE
 GNKKS

SEQ ID NO: 5 (secuencia nucleotídica completa del plásmido pSacB)

tcgagaggcctgacgtcgggccccgtaccacgcgcatatgactagttcggacctagggatatacgtcgacatcgatgctcttctcggtt
 aattaacaattgggatcctclagactccatagggcgtcttcctggtttgcttccagatgtaigtctcctccggagagtagccgtgactttat
 ttcggcacaataacaggggctgatggataaaacggcgatagttcctgacggatgacctgatgtaccggcggagacaagctgca
 aacctgfcagatgggatgatttaaaggcggtatgtctgagagcaccgccccgtgaatccgcagaactgatccgctatgtgttgcgg
 atgattggccggaataaataaagcccggcttaatacagattaagcccgtatagggtattactgaataccaaacagcttaccggagg
 acggaatgttaccattgagacaaccagactgccttctgatttaataatcttccacttaatacagaaggaataacctgaattttaccg
 gattgacctgaatacctggaatgcagggaaactttgccccttatacgtcagcagattaaatgcggatcagcctgaccaccaactcg
 atattaccgcttgcgtaccgcactggcgagacagggtataagtttatccgctgatgtttacctgatctccggggtgtaatacagttcc
 ggagtccggatggcactgaaagacaatgaacttactgggaccagtcagaccggtcttactgtcttccataaagaaccgaaa
 cattctcgcactgtcctgcccgttattttccggatctcagtgagttatggcagggtataatgcggtaaccggcagaatcagcatgatacca
 gatgttccgcagggaaaattaccggagaatcacctgaatataatcatcattaccfggggtgagtttgcaggggatttaacctgaacatca

ccggaatgatgatttttgcggggttttaccgatggcaagttcagcaggaaggtagaccgctatttaccgtttctgtacaggtt
 atcatgcagtctgtgagtttcagcagcacggtttataacacttcagctgaigtgataaacaactgaaataaataaatttctg
 tatttaagccaccgtaaccggcaggatgggtcttttttataatccaacttaactgtaattcgtttcagactgggtcaggatgagctcg
 ctggactcctgtttagatagccagtaacactcagaactcctctggatttttccagaacgctcggttgcggccggggcgtttttatgggtg
 agaatccaagcactagggcgccggccggccccgtgtgaaataccgcacagatgctgtaaggagaaaataccgcacagggc
 ctcttcgctcctcgtcactgactcgtcgtcgtcgtgctgctgctgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggt
 atccaagaatcaggggataaccgaggaagaactatgtgagcaaaaaggcagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaagggcgc
 gttgctggcgltttccataggtccggccccctgacgagcaacacaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaaaccgacagg
 actataaagataccagggcgtttccccctggaaactccctcgtcgcctcctgttccgacctgcccgttaccggataacctgcccgttcc
 tcccttcgggaagcgtagcgcttttctcagctcaacgctgtaggtatctcagttcgggtgaggctgttcgctcgaagtcgggctgtgtgcac
 gaaacccccgtcagccccgagcgctgcccctatccggtaactatcgtcttgagccaacccggtagacacgactatcgcactg
 cagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggatgtagggcgtgtctacagagttctgaagtggtggcctaactcagcctaca
 ctagaaggacagtatttggatctcgtcgtcgtgaagccacttcggaaaaagagttggtagcttctgalccggcaaaacaacc
 accgctggtagcgggtgggtttttgttgcaagcagcagattacgcgagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctaccg
 ggtctgacgctcagtggaacgaaaaactcacgftaagggattttggtcagattatcaaaaaggatctcactacgtatcctttaagg
 ccggccggcgcgcctcggcatcttctttgcgttttattgttaactgcttaattgtcctgttcaaggatgctgtctttgacaacagatgtttct
 tgcctttagatttcagcaggaagctcggcgcaaacggtgattglttgcglagaaalccctcgttctgatataagcttgaatcacgacatt
 gtttcccttgccttaggttacagcgaagtgtagtaagtaaggtttatcatctgtaggatcaagatccatttttaacacaaggccagttttgt
 cagggcgtttagtaggcccagftaaagaattgaaacataccaagcagtaaatatcgttagacgtaatccgctcaatcgtcatctttgat
 ccgccccgagcagtgaaacaggtaccatttgcggttttaaaagcgttcgcgcgttcaattcactgtttactgtttagatgcaatcagc
 ggttcatcacttttcagtgtaaatcatcgtttagctcaatcaccgagagcgcggtttgclaaactcagcccgtgcgtttttatcgctttgca
 gaagttttgacttcttagcggagaatagtgcttttccatagtagctttgtaataaagaatcttcgcttggttagccatctcagttcc
 agttttgctcaaataactaagtttggccttatactctacgtagtgaggatctcagcgtatgggtgctgctgagctgtagttgcctc
 atcgatgaactgctgatactttgatacgttttccgcaaccgcaaaagattgattataalccctacaccgttgatgttaaaagagctgtctg
 atgctgatacgttaactgtgtagttgcagttgtttgcccgtatgtttaccggagaatacagtgtagaataaacggatttttccgctaga
 tgaatgtgctgaacctgacctggtttgtttggcttttaggatagaaatcttgcagatatttgcctgtctttaaagacgcccag
 cgtttttccagctgcaatagaagttcggcactttttgatagaacatgtaaatcagatgtgctatccgcatttttaggatctccggtaatgc
 aaagacgatgtggtagccggtatglttgcgacagtcgctcagcggttttgataagggagcgtctccaaacctccaggcctttgcaga
 agagatattttatgtggagcaaacatcagaaaactgatattttcattttgtctgttcagggtttgcaatcatatgcgctgtaata
 tgggaatgccgatgttcttataatggttttggtctttccgcaaacgcttaggttcgcccctctgccagcagtgccggtagtaagg
 ttaactgttctgttttgaacacttttgatgtcactgctcactctcttttattgactgtgtagcggctgctcttccagccctcctgtttga
 agatggcaagttagttaccgcaataaaaaaagacctaataatgtaaggggtgacgccaaagatatacattggcccttaacacatttt
 aggtcttgcctgttatcagtaacaaaccgcccgtattcctttcgacctcattctattagactctcttggattgcaactggctattttct
 ctttttgtgataaaaaatcataaaaggatttgcagactacgggcccctaaagaactaaaaatctactgttttcttattctctgtattttata
 gtttctgtgcatggcgataaagttgccttttaatcaaatccagaaaatataatctcatttcaataaataagtagaacggcaggt
 atagtgatgggtfaaaaaggatcggcggccgctcgatttaaac

tcgagaggcctgacgtcgggcccggfaccacggtcatalgactagttcggacctagggatgggtcagcctgaaacgaaccgcactt
gtagtaggtagttttgaccgcccgaatctgtataccttgggtgaaaaatcaaacctgaggaattatacaattttggtggcggcg
aaaaaggtaaaagcggatcgtctattgcaacagccgtagcaaagtggagcgcattgacggaagcctgagaaaagaggcatttc
cgcagccgcttcatcgtgggcaaggagccgtcgcagcgggaagcgggtgcaacagcgttcaacgggataatattcaagtggtg
tggcgaccattgctttggatggggatcaacaaatcaatgctgcttttggcgcattttgattatcgcgagcattgagggcattatcag

gaaaccgggcgccgggggggacgacctgccggcgaagcgggtactgtttacgagccggcgattatgcctggtgcataaaat
ttattggaagagccggaaagcccgaacgggatalaaacggcatalaagctggaagccatcggcgaatttgcgaaagccagacc
tggcctgctttagtgcgttaaatatttccgcaaaaaccgcaaacccatgtaalaactgtgatatcgcctgatccgcaaaaaat
atgacggattatagacgcgcagaaaatccttcgaccattatcgcaaccgggcaacgttccggcagcaaatcgaalccggcgtatg
cggggttcagaaatcagaaaataaagaaaaacaatgatgagttgaaagtctacggaattggcaagataaaagcaaaagat
actggcaatcggtaattcgtcagctgaltcatttggccttgtgcaacaaatcagcagattcggcagggaccagattacagctcac
cgaagcgcgcgtcccgctgctcggcgggaagtgcttggaaactggccatgcccagattatcctcattaccatggtacaggtccgc
aacgcaatgccgtaaccaactacgacaaaagatttattgcccgcctgcttccctgcgcaaacagattgcccgaagaaaacattc
cgcttataattgttcagtgacgcgacctgacggaaatgctgttatcagccgaaccagcaaatggaatgctgcaaatcaacgggt
gtcggcgccatcaaatggcagcgttcggacagcctttatggcgattataaagaacatcaggcttgcgtaaaagcggglaagaatc
cgttggaaatgcaatctaaattttaacttttgaaccgcactttaaggtagcaaatccaataaaaagtgccgtgggtttcgggaatttt
aacgcgctgattcctcgtctttcaatttctgctccatttggcgggtgctccggatccttctgactgagatccataagagagtagaa
tagcggccttataatttataagcgtacctaatcgggtacgctttttatcgggaaatccataattttctaccgcacttttttaagattat
acttaagtctgttgaatcaatttattggagggttatagcaacacatcaactggctcccatttaacattcagctgcttaattcaaggattctg
gcggttaaaaaagctggcggaaatcggcgcaggaattgcttaccctgtaagcaaggattagaattaggcgttgatcgtgatcat
gccgctgttacggggccttacttccgagcgggaattcggacggcgtgctggcgtgataaatccttgcgcgacagcttacttgggtg
accaaatgcccggattttgtatcctaaatgaagaattaccgatataaaatcccactactatgacaacagctaccgcaatattatggtcgc
gcgcaacgctcattgaaaaatgcaatgagcactatttagatgattgctgattcaccgwtcttctcctgtgcccgatcccgaacaaatcg
cgcgggctttgatgaacttatacaaacgggaaagtagcttattcggggtatcactatacggcggtaagttccgcatgttgaactctt
atgtaalacagccgttaalcaactaaatcaaatggatctccctctcagcaggttttgatgacggtaaccctggatttttactggaaaa
acgtattcaaccgatggcatggtcgcacttgcggcgtgctttatcaatcaggatgagaacagctcggcgggtgcaaaaaacatta
ctgaaaatcgggtgaaacgaaaggagaacccgcttagatcattggcttatgctggtattggcgcacccggcaaaaattatgcccgtt
tatgggctccgglaaaattgaacgggtaaaagcgcggcggatgctgtaacgaatttctcactgaggaagaatggattaaggttatg
ttgccgcacagggacgggatattcgtatacatcctctaatcctcgtatctgggaaagatgctcagatcgaagaggctataat
attcgtcttttgataaggggtccataccggcaccggttaaaatcactgcttgcgcaacaaaatttctcactagaatagcattcacct
cttttaacagatgttgaatccgtatcggcaaaaatactctatatttgggttaaacggcgcggcagttagcattagagtgctggctc
ccggaalattgacgggtcggctacaccgagccagcttccagggtggaatcccacgtcgcacatcagctctctcgtgtaattaacaa
ttgggatcctctagactccataggccgcttccgcttctcctcagatgtagctcctccggagagtlaccgtgacttatttccgcaca
aatacaggggtcagatggataaaatcggcagatgcttccgacggatgatccgtatgtaaccggcgaagacaagctgcaaacctgtca
gatggagattgattaatggcggatgctgagagcaccgcccgtgaaatccgcagaactgacccgctatgtgttggcggatgattggc
cggaaataaataagcccggcttaatacagattaagccgctatagggtatttactgaataccaaacagcttaccggaggacggaaatg
ttaccattgagacaaccagactgcctctgattatataatcttactatcaatcagaaggaaataacctgaatttaccggattgacct
gaataacctggaatcgcagggaaacatttgccttattcgtcagcagattaaatgcccgatcagcctgaccacaaaactcgatattaccg
cttgcgtaccgcactggcggagacagggtataagtttatccgctgagatttaccctgatcctccggcgtgtaacagtttccggagtcc
ggatggcactgaaagacaatgaacttattactgggaccagtcagacccgcttctactgcttccataaagaaaccgaaacattctctg
cactgctcctggctatttccggatctcagtgagttatggcagggtataatgcccgaacggcagaatacagcatgataccagattgttc
cgcagggaaatttaccggagaatcaccgaataatcaatcactcgggtgagtttggcgggatttaccgaaacatcaccggaaa
tgatgattatttgcgggcttttaccgatggcaaaagttcagcaggaaggtagccgctatttaccctgttctgtacaggttcatcagca
gctgtgatggctttcagcagcaggttataatacactcagctgatgtgtgataacatactgaaataaattatataatctgtattaaagc
caccgtaccggcaggaatgggtggcttttttattttaaaccgtaactgtatattcgttccagactgggtcagggatgagctcgttggactc
ctgtgatagatccagtaatgacctcagaactccatctggatttggcagaacgctcgggtgcccggcggcgtttttattggtgagaatcca
agcactagccggcgcggccggcggcggcgggtgtgaaatccgcacagatgctgtaaggagaaaataccgcatcagggcgtcttccgct
tctcgtcactgactcgtcgtcgtcgttccgctcggcggcggatcagctcactcaaaaggcggtaatacgggtatccacaga

atcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctggcg
 ttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgacaggactataaag
 ataccaggcgttccccctggaagctccctcgtgcgctcctcgttccgaacctgcccgtaccggatacctgtccgcttctccctcgg
 gaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggatctcagttcgggtgtaggtcgtcgtccaagctgggctgtgtgcacgaaccccc
 cgttcagcccgaaccgctgcgcttatccggtaactatcgtctgagtcacaacccggtaagacacgactatcgccactggcagcagcc
 actggtaacaggatagcagagcgaggtatgtaggcgtctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagg
 acagatattgglatctgcgctcgtcgaagccagttacctcggaaaaagagttggtagctctgtaccggcaaaacacaccgctggt
 agcgggtggtttttgttgaacgagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtgacg
 ctcagtggaaacgaaaactcacgtaagggaftttgtcatgagattacaaaaaggatctcacctagatcctttaaggccggccgc
 ggccgccatcggcattttcttgcgttttattgtaactgtaattgtcctgttcaaggatgctgctttgacaacagatgtttctgctttgat
 gttcagcaggaagctcggcgcaaacggtgattgttctcgtcgtagaatcctctgttgcatalagcttgaatcacgacattgttcccttcg
 ctgaggtacagcgaagtgtagtaagtaagggtacatcgttaggatcaagatccattttaacacaaggccagtttctcagcggctt
 gtagggccagtaaaagaattagaacataaccaagcatgtaaatatcgttagacgtaatccgcaatcgtcattttgatccgcgga
 gtcagtgaaacaggtaaccatttgcggttcaittaaagacgctcgcgcttcaatttcatctgttactgttagatgcaatcagcggttcatc
 acttttctcagtgtaatcatcgttttagctcaatcataccgagagcgcgcttcttaactcagccgtgcgcttttctcgtttgcagaagtttt
 gacttctgacggaagaatgagtgcttttgccatagtagcttctgtaaaataagattctcgccttgtagccatctcagttccagtgcttg
 ctcaataactaagattttggtgcttatactctacgtagtgaggatctcagcgtatggttgcgctgagctgtagttccttcatcagtg
 aactgctgtacatttggatcgttttccgtcacgtaaaagattgattataatcctctacaccgttgatgtcaaaagagctgtcgtatgctga
 tacgtaacttgcagttgtcagttgttggcgtaatgtttaccggagaaatcagtgtagaataaacggattttccgtagatgtaaat
 gfggctgaacctgaccattctgtgttggcttttaggatagaatcatttgcacgaatttgcgctgtctttaaagacgcgccagcgttttc
 cagctgtcaatagaagttcgcgacttttgatagaacatgtaaatcagtggtcgtcctcgtttaggatctccggctaagcaaaagac
 gatgtgtagccgtagatgttgcgacagtgccgtcagcgttggtaatggccagctgtcccaacgctccaggcctttgcagaagagat
 attttaattgtggacgaatacaaatcagaaaactgataattttcaitttttgcgttcagggatttgcagcatalcatggcgtgtaataaggaa
 algccgtagtttccctataggtctttgtcgttcttctcgaacgcttgaggtgcgctcctgccagcagtgccgtagtaaaaggtaatact
 gttgctgtttgcaaacctttgatgttcatcgttcatgtctcctttttagtactgtttagcggctcgtcttccagccctcctgttgaagatgg
 caagtagttacgcacaataaaaaagacctaaaatagtaagggtgagcgaagatacacttggcctttacacattttaggctctt
 gccgtcttatcagtaacaaaccgcgcgatttactttcagacctctctatttagactcctgttggatfgcaactggctattttcctttgtt
 gatagaaaatcataaaaggatttgcagactacgggctaaagaactaaaaatctatcgttcttttcttctgtatttttatagttctgt
 tgcagggcataaagttgccttttaatacaattcagaaaatataataatctcatttcaactaaaataatagtaacggcaggtatagtg
 atgggtaaaaaggatcggcgccgctcagtttaaatc

SEQ ID NO: 7 (secuencia nucleotídica completa del plásmido pSacB_delta_pflA)

tcgagtcaatgaggatttactatgatgtggcaaaacaccgatttccgatttactacacgtaaaagttatggaaagcggcgattgcg
 gagttctgggtatataccgcgctacgataatgcccggatttccgtaaataggagcaaaaacctgggatgccaacgctaatgaaa
 atcaggtatggctgaataacctcatcgcaaaaggcaccgacgacatggggcggttacggcgtagaggcagagcctggcgtaa
 gcctaaccggcgaaccgtgacaaatcagcaaaatgtcaacaatttaagtcgcgccattgatgatcggcgcaaatctgacctttt
 aaaccggcgcaatcagatctcgggtgtctgcgcccctgtatgtacaatcacacgtttcttctgctggcgatacgtttttaaaccagttat
 caacgctcctgtgacgtacctttaggcttgaattcaatcaaatcaagattttacattcttagctttaaaggcgagattaccggtaaaaa
 gccggtcaggcatatcaaaaatcgtcaatgcgcatatttaccgaagaccgctggaactaatgcgagcgtgacgttaaaacgcca
 accgttcccgtcggcaaaactggaaatlaaccggacattaaaccttgaagatttgaacacctggglaaccaatggatgatttcaacg
 tctgttggttaccatgccacgaaccgataaaatccgctcctggtataaacggcaaaaagtgcggtcaaaaatttaattttcatctgtt
 atagaaaatattttcaacataaaatcagggatgctgttggcgtccgtaaaatcgcagaaaaatataaattttgaccgcacttttct
 atctcaatlaacagcctgataattcttatggaatcaacaattagctttgacgaaaaaatgatgaatcagagcttttctcctgcccagcaagg

cggaaagcttaggggaaatccccgtaggtgcccattgggtgagtaaacggggcaatatcatlgttggaaggctggaacctctatgtg
 aactcggatcccaccgcccattgcccgaaltatgctgctgagtaacgcccgcagaaaaatccaaatcaccgctgctcaataccactt
 tatacgtgactllagaaccctgcccattgctgccccgccccgctacacagccgaatacaacgcttggatattcggggcgctccgattac
 aaaaccggtgccccggttccagattcattttttgaggattataaaaatgaatcatgggttgagatcaacagcggcttctacaggaac
 aatgcaagtcagaagtaagccgctttccaaaagcgcaggggaacagaaaaacaaaaagctaccgcacttttacaacacc
 cggcttaactcctctgaaaaatagtgacaaaaaacgctacatagtttacgacggttttttttcttaatatgccccaaataac
 aaaatatagcaagaagattatagcaagaatttcgctttttcagagaaatagtaaaatctcgcaaaaaactaccgcactttatccgctt
 aatcaggggaaltaaaacaaaaaaatccgccattgaggcggaaatttattaaagaataaaactctcaattacattgattgtgla
 aacgtaccagtgatgagctgctgctgcttttagtaaatgattgaaacgaaccgctaacctgaaacacgaatggttaattcgggt
 attttcggattttcctcgcttaacaacatttcacggtaagaacgtaaacattcaagtgtagccgcttccactgctgctcatgatg
 gaaataaccgtccattaaaccggcaaggtgctgttttgcgctctgtcatctttacctaatgcgctcgggtacgagagaaggtatagaa
 ataccgctttcgcgtaagcgaacgggaagtttagccacagaagtaagtgagcaaccgcaccttttgctcagcagcggatgagggtt
 gcaaccggtccgaatggcgccgctgctcagacaccgctccggagtaataccggtttctaccgtaataccaggttagaagttagatgag
 galagattgctcggagtgctgctgctgctgctttgaacttttcatgaaacgttcaactaagtcaccgctaatacatcaaac
 gcggaatcattgtaaccgaattcgggataatccctcaatttcgaagtcagaaacattcagggcaacgacattaccgctttatctttga
 tgcgccccgcaatcggttaactttccatattgattgctggaataagtagcgcagccacggaaagaccgcaaccgcaagccatt
 gtagcgaataacgtcgcgatcgtggaaccgcatcaatgcccctcatatgcataattatcgtgcatgaagtgatgattcaatgcgggta
 cataatgagtcgcaaacgactccatgaactgtccatacgttgcgataccggtatcgaaattcaatacttctgctgtaacggtcgagttta
 ggaccgacttgcatacatttttctcatgataccgcccgaatgtcgtataacatagtttagtlaagtttgcgcccagaccgaagaattg
 cattgittacctacgacccatcgggtgatacgcagcagcagattgcatagctatcgtttggaagtcaggacgcaataagtcattttcgt
 tigtacggaggaagatcaatagatactttcgcacagaacggttgaacgctcaggttaattgltcggaccaaagaatgtaagtgggt
 tccggagaaglacccatagtgataaagtagtaatacgggaaagctggttttagttaccaacggagcaccgcttaagcccataccggc
 galagittcgggttcccctctagactccafaggccccttctggcttctccagatgtagtctctcctccggagagaccgctgactttttc
 ggcacaaatacaggggctcgtaggataaacacggcgatagttctcagcggatgacccgatgacccgcccgaagacaagctgcaaa
 cctgtcagatggagatgattatgagggtgctgctgagagcaccgccccgtaaccgcagaactgatcggctatgtggttgggat
 gatggccggaataaataaagccggctaaatacagataagcccgatagggatacttactgaataccaaaacagctacggaggac
 ggaatgtaaccattgagacaaccagactgccttctgattataatattttactataacagaaaggaataaccatgaatttaccgggat
 tgacctgaataccgtgaatgcaggggaacactttgccccttcctgctcagcagattaaagcggattcagccctgaccaccaaacctcga
 taccgctttgcctaccgcaactggcgagacagggttaagtttaccgctgatgatttaccgatctccgggcgtlaacagttccgg
 agtccggatggcactgaaagacaatgaacttattactgggaccagtcaagcccggctttactgttctcataaagaacaccgaaaca
 ttctctgactgtcctccgttattttccggatctcagtgagttatggcagggtataatgcccgtaaacggcagaatacagatgataaccag
 attgttcccgaggaaatttaccggagaatccctgaatatcatcattaccggtggaattttcagggatttaacctgaacacac
 cggaaatgatgatttttccccggttttacgatggcaagtttcagcagggaaggtgacccgctatttactgcttctgacaggttcat
 catgcaagtctgtagggcttcatgacacggtttataatacactcagcctgatgctgataacatactgaaaaatataatctgta
 ttaaagccaccgtaccgacggaaatgggtgctttttataatfataaccgtaactctgtaatttgcgttctcagactggttccaggatgagctgct
 ggactcctgtgtagatcagaaatgacctcagaactccatcgtgattgctcagaaccgctggttccgcccggcgtttttattgggtgag
 aatccaagcaactagccgccccgcggcccgcggcttgaalaccgcacagatgcgtaaggagaaaalaccgcatcaggcgctc
 ttccgctcctcctcactgactcctgctcggctcggctcggctcggctcggctcggctcggctcaaaagggcggtaatacgggttac
 cacagaatcaggggataacgcaggaaagaaacatgtagcgaagaagccagcaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccgctt
 gctggcgtttttccataggctcccctccgctcagcagcatcaaaaaacgcagcctcaagtcagaggtggcgaaccggacaggac
 tataaaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtcgcctctcctgctccgacctgcccgtaccggataacctgcccccttc
 ccttccggagagcgtggcgttctcctcagactcagcgttggattctcagttcgggtgaggtcgttccgtccaagctgggctgctgacag
 aacccccgctcagccccgacctgccttaccggtaactatctgtgtagtccaaccggtaagacacgacttatccgcactggc

agcagccactgglaacaggattgacagagcgaggatgtaggggctacagagttctgaagtggggcctaactcggctacac
 tagaaggacagtatttgatctgctcgtcgaagccagttacctcgaaaaagagttggtagctctgatccggcaaaaca
 ccgctgtagcgggtggtttttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttc
 gctgacgctcagtggaacgaaaactcacglaaaggallttggcalgagalla caaaaaggatctcacctagatcc
 lttaaaggc
 cggccgcgccatcgccatcttcttgcgttttattgttaactgtaattgtccttgtcaaggatgctgctttgaca
 acagatgtttctt
 gctttgatgttcagcaggaagctcggcgcaaacgttgattgttctgctgtagaatcctctgtttgcatatagctt
 gtaacacgacattg
 tttccttcgctgaggtagcgcgaagtgtgagtaagtaaaggltacatcgttaggatcaagatccattttaacaca
 aggccagtttgtc
 agcggctgtatgggcccagftaagaattagaacataaccaagcatgtaaatacgttagacgtaatgccicaatc
 gtcattttgatc
 cgccggagtcagtgaaacaggtaccatttccggtcatttaaacagctcgcgcgttcaatttcatctgttactgt
 gttagatgcaatcagc
 ggtttcatcactttttcagtgtaatacgttttagctcaatacagagagcggcttgcctaactcagccgttgc
 gttttatcgccttga
 gaagttttgacttctgacggaagaatgatgtgctttgccatagatgctttgtaaaataaagatfcttgcctt
 ggtagccaicttcagttc
 agtgtttcctcaataactaagtattgtggccttctctacgtagtgaggatctctcagcgtatggttgcctg
 agctgtagtgccttc
 atcgtgaactgctgtacattttgatacgttttccgctaccgcaaacgattgattataatcctctacaccg
 ttgattgtaaacagagctgctg
 atgctgatacgttaactgtgcagttgtcagttgttggccgtaagttaaccggagaaatcagtgtagaataaac
 ggaattttccgctaga
 tgaatgtggctgaacctgaccatttctgtttggcttttaggtagaatacattgcatcgaattgtcgcgtctt
 aaagacggccag
 cgttttccagctgcaatagaagttccgacattttgatagaaatgtaaaatcgalgtgcatccgcattttag
 gatcctccggcctaagc
 aaagacgatgtggtagccgtgatagtttgcgacagtgccgtcagcgtttgtaatgccagctgccccaaac
 gcccaggccctttgcaga
 agagatattttaattgtggacgaatcaaatcagaaactgatalttttcatttttgtctgttcagggatttgc
 agcatalcattggcgtgtaata
 tgggaaatgccgatgttccctataggtctttggcttcttccgaaacgctgagttgagcctcctccagcag
 tgcggtagtaaagg
 ttaatactgttctgttttgcacaactttgatgttcaatcgttcatgtctctttttatgtaactgtitagc
 ggtctgtcttccagccctcgttga
 agatggcaagttagttacgcacaataaaaaagacctaaaaatgtaaggggtgacgcaaaagtatacactt
 gccctttacacattt
 aggtctgcctgctttatcagtaacaaacccgcgcttactttcgaacctcattcttagactctcgtttggatt
 gcaactggtctattttcct
 ctttgtttgalagaaaaataaaaggatttgcagactacgggccaataagaactaaaaatctatctgtttc
 tttcattctctgtattttata
 gttctgtgcatgggcataaagttgccttttaatacaaatcagaaaaatataataatctcatttcaactaa
 ataagtgaaacggcaggt
 atatgtgatgggttaaaaaggatcggcgccgctcgatttaaatc

SEQ ID NO: 8 (secuencia nucleotídica completa del plásmido pSacB_wcaJ)

tcgagtaagccgattcagctgatccgccatggggaaaaagcctaactcgcggaatatgaaaccgataccagtcagta
 aagttg
 acaaaatcgacatcattgtctcaaccaagtatgaaaagcgtttaccgcgagatgatacaatcgaccagccgg
 ttaataacgtttcac
 tccgttccggtgccaacgagacgcaaatgcttataggcgaatacagaaaatcgattccgcataaagcgtatc
 gctcaaatctaa
 aaccaacgctttattttcatalatgatgagccagtaactccgctcacaaccgcaacattaataatccgctcc
 cagctctgaaacgcagg
 aatcggctgatatacaaatatcctgaaatcaaccaacggggataatggctcccgccagataactcaacg
 gataaccgcccga
 acctagggftaattcaataccaagaattcagcgggtgatttctataaaaaatctggattgtaagcaaccg
 cgcgccccggtaaac
 gggacaattttccgataatgctgcacgatggcatttttctgtgacaccttggtaattcccccgctctgaca
 aaaaattcttctcggta
 ccgcactttcagttcggaaattttatcaaaaatacaatccacgggtatctcgtgattccgcccggcga
 aatattgcataaacattaatc
 gggattttccaattgctccggtgaaatctcgggttctccgccacaaaaatccttacttaaaactaccg
 ttgtaaggctcaca
 aaaaac
 aggatattcaaatgaccttttcaactgctcggtaaccgcaataatgattcaataaacagttgattggtta
 atcgtttgtcgcgacatttct
 gacaaactctgtatcactaacggaaataaaaaatcctttttcttaaacggttgcagatgttgcctaa
 aataagcaatccgctatcaatag
 tcggaataatcaattcaggtattttctcagagatttaagtaaggctcggaaatatactccgcatcag
 tgaaccggggtagcggaaaatg
 ccgctcggccacataacaagccggcgaactcgggattaaatctacgggttaacactttccgctactact
 aactgcgataatcctttt
 aaacgctgaacgagagaaacagctgtcggccgatgtaacaagaatctcatgattttttatccctc
 aattaggcattggtggcat
 calctgccatataatcgtctttgcgacacttttggatggtcttgcgalaatttcaaaatccagcc
 caaggattgalgtcaacatac
 caggcatccaattcaaatctgctcccaactgatggcattgcgaccggttacctgtgcataaccggt
 aatccgggttcaactcatggcg

cttagcctgtcttctgtatatacagcggcaaatattccatcacacaacaaataaagggcgaaaacaaatcaatgctatcaatgcgac
aacaatatcgaaaaggcgtttatcatgaaaatcctctacgaccaccaatftgggctgacaaaagtgcggtttccaccagaaccgt
ataaactaaaaccaggaaaagcggtatccagactaacggcagcttaataatggaagacggcaccacaaacgatccaacaaaatt
aataaaaaataaataaataatatacgttcttccacgccaacaattgggtaftcatcacatagataaiftgaatftaataaaaaatata
aatgccaaaaatgcaaaaatgcaaaaatgcaaaaatgctataaagaagctatgaggattagtgtaacccaagggaactta
cttatttgatcgaaatactgaatgtagctccgctccataaccaaccataaaatfttaaaatftctaaaaatgctgataaaattccgt
ccggtaacctacggacttatcatcgccatagaaaatattaccaatgaaaaacgttcaatcggaacgctccagccaatcaatttggcg
agcagataaacaacttctgttaaccaagaagattaaataaataatgcatcacgagggcaaaaacagatataccgcttaaa
ataggtagatgctgttaaaaaaagatcagcatcaacataaataaagctcagtaataccgaaaggagggcactgacacaatag
ctaaccccaataaaaaataagagcatagcggatlaacttaatttccagttgttctctgatgataaaaaatcccaccgccaccgc
aagagaaaatcataatfacggactggtcattggtattaaagaaaaaacctttaaaccgcttcatcagttacggttaattcttaccgaa
accaactggaaccccaataaagcctcaataaaaaagcccgcagcacaatftatgataftcccaacaaaagggtcctaatccctgc
ttctcatcaccgggttaaacgtcaaaaaagaataatgaaataaaaaacatcacaattccgaagaaaaacaaatcaactaattttct
gtagaaaacgcatftaataaccgataaaaagccgaagaaaaacacacgtacaccggaactgtaatttaaaaaatcagttccat
atcccttaaaaaagggttattaccgctaagaaaaagaacaaaaaacacacgactatcaacctggcactcctatttgtgctgat
agtgcgggagaaagtatcaccagctccaacgcaagagtaatagcaacttaaaaatgctgataacattaatattatatacaataat
atfttgattaatttctcaattcttataagaacgctcgcgagaaacttctcttggcagcagataaattcacttgcgacatttgtctaaaacc
gttctgtctcggcaatttattcaacgtctcagccaactcccagataatcccggctatattgaattccaccgcttccgagtagtttct
cacttcaggatgttctgacagcttacaatcggtaatgccaacagataataatcggtactgactccatagggccttctcgttctgctt
ccagatgatgctctcctccggagagtaaccgtacttatttccggcacaataacaggggctgatggataaatacggcgatagttctg
acggatgataccgtatgaccggcggaagacaagctgcaaacctgctcagatggagattgattatggcggtatgctgagagcaccg
cccgtgaatccgcagaactgatccgctatggttgcggatgattggccggaataaataaagccgggcttaatacagattaagcccgt
atagggtattactgaataccaaacagcttaccggaggagcggaaatgtaaccattgagacaacccagactgctctgattataatattt
tcaacttaatacagaaggaataaccatgaatttaccggatgacctgaatacctggaaatcgacgggaacacttgccttatacgtcag
cagatlaaatgcggtaccgctgaccacaaactcgatattaccgcttgcgactccgactggcgagacaggtataagtttatccg
ctgatgattaccgtatctccgggctgtaacagtttccggagttccggatggcactgaagacaatgaactattactgggaccagct
agaccgggtcttactgcttcaataaagaacccgaacattctctgactgctcctgcttatttccggatctcagtgagttatggcaggt
tataatgcggtaacggcagaatacagcatgataaccagatgttccggcagggaaattaccggagaatcactgaatataatcattat
ccgtgggtgagtttgcagggatlaaacctgaacatcaccggaaatgagatlaatttccccgggttttacgatggcaaaagttcagcagg
aaggtagccgctatttaccgttctgtacaggtcatcatgacgtctgtagtgcttcatgacgacgggttataatcactcagct
gatgtgataacatactgaaataaataatlaattctgtatttaagccaccgtatccggcaggaatgggtgcttttttataatttaaccgta
atctgtaatttctcagactggtcaggatgagctcgttggactcctgttgatagatccagtaatgacctcagaactccatctgattgt
tcagaacgctcgggtgcccggggctttttattggtagaatacaagcactagcggcgcgcccggccggcgggtgaaataccgc
acagatgctgaaggagaaaataccgcatcagggcctctccgctcctcgtcactgactcgtcgtcgtcggctcgttccgctgcccgcg
agcggatcagctcactcaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaagg
ccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggtgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatc
gacgtcaagtcagagggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgctctcctg
ttccgacctcggcctaccggaacactgctcggcttctccctcgggaagcgtggcgttttctatagctcacgctgtaggtatctcagtt
cgggttaggtcgtctccaagctgggtggtgacgaacccccctcagcccgaaccgctgcccctatccggtaactatcgtcttg
agtccaacccggtaagacacgacttatcgccaatggcagcagccaactggttaacaggattagcagagcgggtatgaggcgggtgct
acagagttctgaagtggtggcctaactacgctacacitagaaggacagattttggtatctcgtcgtcgtgaagccagttaccctcggga
aaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaaccacgctggtagcgggtggtttttggttgcaagcagcagattaccgagcagaaa
aaaaggatctcaagaagatccttgatcttctacggggtcgtacgctcagttggaacgaaaactcagttagggtatttggctatgag

atfatcaaaaaggatctcacctagatccttttaaggccggccgcccgcgcatcggcattttcttgcggtttattgttaactgttaattgt
 cctgttcaaggatgctgtctttgacaacagatgtttctgcctttgatgttcagcaggaagctcggcgcaaacgttgattgttctgcgta
 gaatcctctgtttgcatatagcttgaatcacgacattgttcttccgcttgaggacagcgaagtgtagtaagtaaaggftacatcgta
 ggaatcaagatccatttttaacacaaggccagtttgttcagcggctgtatggccagftaaagaaltagaacataaccaagcatgta
 atatcgttagacgtaatgccgcaatcgtcattttgatccgcccggagtcagtgaaacaggtaccatttccggttcatttaagaacgttcgc
 gcgttcaattcactgttactgtttagatgcaatcagcggttcactcttttcagtgtaatcatcgttagtcaatcataccgagagc
 gccgttgciaactcagccgtgctttttatcgccttgcagaagttttgactttctgacggaagaatgatgtgctttgccatagtagcttgt
 taaataaagattcttcgcttggtagccatctcagttccagtgcttcaaaactaagtaattgtggcctttatctcactagtaggagat
 ctctcagcgtatggtgtgcctgagctgtatgtccttcatcgatgaactgctgtacatttgatacgttttccgtaaccgtcaaagattgat
 tataatcctctacaccgtttagtgtcaaagagctgtctgtagctgatacgttaacttgcagttgctcagttgtttgcccgttaattaccgg
 agaaatcagtgtagaataaacggattttccgcagatgtaaatgtggctgaacctgaccattctgtgtttggcttttaggatagaatcatt
 tgcacgaaattgtcgtgtctttaaagacgcccagcgttttccagctgcaatagaagtttccgacattttgatagaacatgtaaat
 cgtatgtcatccgcaattttaggatctccggtaatgcaaagcagatgtgtagccgtgatagtttgcgacagtcgctcagcgtttgta
 atggccagctgtccaaacgtccaggcctttgcagaagagataatttaaltgtggacgaatcaaatcagaacactgatattttcattttt
 tgcgttcagggtttgcagcatatcatggcgtgtaaatgggaaatgccgtatgttcccttataaggctttgttcttcttcgcaaacgctt
 gagttgcgctctgccagcagtcggtagtaagggttaatactgttgccttgcctttgcaaaccttttgatgttcatcgttctccttttatg
 tactgtttagcggctgtcttctccagccctcctgttgaagatggcaagttagttacgcacaataaaaaaacctaaatataatgtaagg
 ggtgacgcaaaagatatacactttgccctttacacatttaggtcttgcctgtttatcagtaacaaacccgcgcatcttttcgacctcatt
 ctattagactctcgtttgattgcaactggctattttcctctttgtttagatagaaatcataaaaggattgcagactcgggccaagaa
 ctaaaaaatctatctgtttctttcattctctgtatttttatagttctgttgcagtgccataaaagttgccttttaatacacaattcagaaaaatcat
 aataatctattcactaaataatagtaacggcaggtatagtgtatgggttaaaaaggatcggcggccgctcagtttaaatc

SEQ ID NO: 9 (secuencia nucleotídica completa del plásmido pSacB_ *pfID*)

tcgagaggcctgacgtcgggcccggtaaccacgcgcatagactagttcggacctagggatgggatcagactcttcttccgaca
 agggcgaagccttaggggaaattcccgtagggtccgtatgggtgatgaacggggcaatatcattgggtgaaggctggaacctctctatt
 gtagaactcggatcccaaccgccaatgcccgaatattgctgtgcgtaacgcccgcagaaaatccaaaattaccgctgtcacaatcc
 acttatacgtgactttagaacctgcacatgtgcgcccggcggattttacacagccgaatcaaacgcttgattcggggcgtccgat
 taaaaaacgggtcgggtgggtccagattcattttttgaggattataaaatgaatcatgggggtgagatcacaagcgggtcttaagga
 tcaatgacgcagaagtaagccgcttttccaaaagcgcagggaaacagaaaaaacaacaaaagctaccgcaatttacaacacc
 cccggttaactcctctgaaaaatagtgacaaaaaacccgcataatgtttacgacgggtttttattcttctaataatgacattaagcccg
 tagcctgcaagcaacccttaacatgctccattaattctttgtcggcgggtttacatctcaagctcgtattatcgcgagacttcccattta
 tggggcctagacgggtgataaggtaataatccacttttgcattcttcatatcttfaatgaaatccccagcatgtgcaaatctcgtcact
 atctgtataaccggcaclacaacatggcggatccaggatcgcgtgattcgcgtaaatatttgcgaattcagcactctttattcg
 gcacgccaatcaggcttctgtaaccggtcattcatttcttcaggtaagcaacacaagatccggtcactcaatcaattcaataat
 atgatcatgatgacggacgaaaccgttggatccaagcaagtaataatcttctttatggcaggctctgaaccagtcaccgtaaaatcc
 gccgtaaaatagcttaccgcccgaagcggtaactccgcccggaggcgttcaaaaatggcgaatggcaccactcttctcattaa
 ttcttcaacggaaattcttaccgcccgtgcaaatcccagggtctctgttatggcaataattacaacgcaaitaagcagcctgtaaaaata
 aataaagcggatcccggcccgtcaactgtcccgcaggttcaaatgaatgaatcgtccfaaaaccgacataataatgcccttaataa
 tcaacaaaatagcaagaagattatagcaagaatttctttttcagagaatagtcgaatcttcgcaaaaaactaccgcaatttctc
 cgtttaaactcaggggaattaaaacaaaaaaatccgctattgaggcggaaatttaagcaataagacaaactcctaatttaatacttc
 ctctttctagttatgataagattgaaacctgcaaggatgacggcggatttccgctcactctcaccacaactaagtggcagcactggtaa
 accattgcattagaccaatgcaaacaccaccaccgacgatgtacctaagtaacaggaattaaatttttaactaataatggtacatat
 ctaaatgtcaaacctcctcggcatttaaacccgttgcctgccagaatccggcgtgcaaatgtcaattaccaatgcccatagggatca

taacataattgctacgcagtggtcaagcctgaagcgacaaayaaccgcalcggcaggatcataataaaagcttaccggttagagt
yftcggccatagggccatccaaacggcaataacataccataatggtgcaagaatacctaaacagaaggctcaayccaggatggtct
atftatggtgocgtaftaaatggftaatccccactgaccgttgccgcatgatctgaccggaaaaccaaataatgcaacaataa
ataaccgcccgaacaaataccgaartaaccacaatccagttacgtaacatctgaattgtgtaattttactcacaagcgggaata
gtcgataaagtgtatgaagtaaatggtcacagccgcaaacggccaccataattccccgagagagaaaccaaaccgcccacc
agtttagttaaaccacaggcctcccgacagggctgttgagttgtgataaaaaacgaatgcaagagcaataaacataaccggcag
agatcggcagataaaaaatgaataggctgttttcgtagcttataaacggcgcgtaaccgggttgagccatcgggttggcgaagc
catccaagccaattfaaaatcttccgatttcattgagcttcccttagtaataaaactactcggaaatgagtagaactgccttaagcataa
atgatagataaaaaatccaaaattgtgaataattttaacggggggattataaaagattcataaattagataatagctaatgttagtgat
ccatatcacctttacagatftttgacctaaatcaaaatfaccaaaatagagtaataataccattataaagggtgtggattattcctttggttt
acgagataaattgctatttaagctgatttctgataaaaaagtgccgttagattttcccaaaaataaggaaacacaaaatggcagaagaa
acaatttcagtaaaaatctgtaagaaaatccccgacattatatacaagcagatctgtaccgcatctcggatattgcccgcga
ggcaaaaactcataatttaatttccgaataaattgattccgacagtaaacgacgtaaccgcccacgctgacatcgatctcttctgcg
ttaataacaattgggatcctctagacttctccagatgtagctctcctccggagagtagccgtgactttttcggcacaatacaggg
gtcgatggataaatacggcgatagtttctgacggatgatccgtatgtaccggggaagacaagctgcaaacctgcatgaggatg
gatttaatggcggatgctgtagagaccgccccgtaatccgcagaaactgatccgctatgtgttgcggatgattgcccgaataaaat
aaagccgggcttaatacagattaagcccgtatagggtattactgaataccaacagcttaccggaggacggaaatgtaccattga
gacaaccagactgcctctgattataatattttcaclattaatcagaaggaataaccatgaattttaccggattgacctgaatccctgg
aatcgacgggaacaacttggccttlatcgtcagcagattaatgcccgttcagcctgaccaccaaacctgatattaccgcttctgtaacc
gcactggcggagacaggtataagtttaccgctgagatttaccctgatcctccgggctgttaalcagttccggaggtccggatggcact
gaaagacaatgaactatftactgggaccagtcagaccggcttactgtcttataaagaacggaaacattctctgcaactgtcctgc
cgttatttccggaactcagtgagttatggcaggtaataatcggttaaccggcagaatacagcatgataccagatgtttccgacgggaa
atttaccggagaatcacctgaataatcatcattaccgtgggtgagtttgcgggatttaccctgaacatcacccgaaatgatgattttt
gccccggttttaccagtggaaggttcagcaggaagggtgaccgctatttaccctgttctgtacaggltcaatcagctgctgtagg
cttcatgcagcagcgtttatataacactcagctgatgtgtgataacatactgaataaataatctgtatttaagccaccgtatcc
ggcaggaatggggcttttttataatttaaccgtaactctgtaattctgttcagactggttcaggatgagctcgttgaactcctgtgatag
atccagtaatgacctcagaactccatctggattgttcagaacgctcgggtgcccgggggctttttatgggtgagaatccaagcactag
cggcgcggcggcggcggcgggtgaaataaccgcacagatgctgaaggagaaaaaccgcacagggcgtcttccgctcctcctgcctc
actgactcgtcgtcggctcgttccgctcggcgaagcggatcagctcactcaaggcggtaatacggttatccaagaaatcaggg
gataacgcaggaaagaactgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccggtgctggtggttttccat
aggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaacccgacaggaactataaagataccag
ggctttccccctggaagctcccctgctcctcctgttccgacccctgcccgttaccggataccctgctcggccttccctcgggaagcgt
ggcgttctcatalgctcagcctgtaggtatctcagttcgggttaggtcgttcccaagctggcgtgtgacgaacccccctcag
cccgaccgctcgccttaccgtaactatcgtcttgatccaaccggtaagacacgacttatcggcactggcagcagccactggta
acaggatagcagagcaggatgtagggcgtgctacagagttctgaaagtgggctlaactacggctacactagaaggacagat
ttggtactcgtcctcgtgaagccagttacctcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaaaaaccaccgctggtagcgggt
ggttttttgttgaagcagcagatlacgcccagaaaaaaaggatcacaagaaatcciftgatctttctacggggtctgacgctcagtg
gaacgaaaactcagttagggtttgtcatgagatatacaaaaaggatcttccactagatccttttaaggccggcggcggcggc
atcggcaatttttgcgttttattgttaactgtfaattgtcctgttcaaggatgctgtctttgacaacagatgtttctgctttagttcagca
ggaagctcggcgaacagttgattgttctcgttagaatccctgttgcataatagcttgaatcagcaatgtttccttctcgttaggt
acagcgaagtgtgagtaagtaaggtlacatcgttaggatcaagatccatttttaacacaaggccagttttgtcagcggctgtatggg
ccagttaaagaattagaacalaaccaagcatgtaaatcgttagacgtaatgccgtcaatcgtcattttgatccgcccggagtcagtg
aacaggtaccatttgcgttcatftaaagacgttcggcgttcaattcatctgttactgttagatgcaatcagcgggttcatcacttttca

gtgltgaatcactgcttagctcaatcataccgagagcggcgttgtaactcagccgtgctgttttatcgcttgcagaagttttgacttcttg
 acggaagaatgatgtgcttttgcatagtatgctttgtaaataaagattcttcgcttgtagccatcttcagttccagtggttgcctcaata
 ctaagtatttggcccttactctacgtagtgaggatctcagcgatggttgcgctgagctgtagttgccttcacgatgaactgctgt
 acattttgatcgttttccgcaaccgtcaaaagattgattataatcctctacaccggtgatgttcaagagctgctgatgctgacgttaac
 ttgtcagttgctaggtttgttgcgtaagttaaccggagaaatcagtgtagaataaacggattttccgctcagatgaaatgtgctgaa
 cctgaccattcttgggttttaggatagaatcatttgcacgaaatttgcgctgtcttaaacagcggccagcgttttccagctgca
 atagaagttcggcacttttgatagaacatgtaaacgatgtgcatccgcaattttaggactcgggtaaatgcaaacgatgtggtta
 gccgtgatagttgcgacagtgccgtcagcgtttgtaatgcccagctgtcccaaacgccaaggcctttgcagaagagatattttaa
 tggacgaatacaattcagaaacttgatattttcatttttgcgttcagggttgcaagcagatcatggtgtaataatgggaaatgccgtat
 gtttcttataatggcctttggttgccttcttcgcaaacgctgagttgcgctcctgccagcagtgccggtgaaaggttaatactgtgctgtt
 ttgcaaacattttgatgttcatcgttctctctttttatgtactggttagcggctgctcttccagccctcctgtttgaagatggcaagttag
 tacgcacaataaaaaaacctaaaatgttaaggggtgacgcaaacgataacactttgcccttacacattttaggtctgctgcttca
 tcagtaacaaacccgcgcaatttactttgcacctctctttagactctcgtttggaatgcaactgctatttctcttctgtttgatagaaa
 atcataaaaggattgcgactacggcctaagaactaaaaatctatctgtttcttctctctgtatttttatgttctgtgcatggcg
 ataaagttgccttttaacacaattcagaaaatacataatactcatttactaaataatgtaacggcagggtatagtgtgggttaa
 aaggatcggcggcggcctcgatttaaact

SEQ ID NO: 10 (secuencia nucleotídica del gen *ldhA* de la cepa DD1)

ttgacaaaatcagatgtttaaataaggagctaactatgaaagttgccgttacagtaclaaaaatgatcgcaaacatctggattgg
 cgaataaaaaatataattttagcttacttcttgaatttttacttgatgaacaaacccgcaaaaatggcggagggcgccgatgccgtctgta
 tttctgcaatgatgatgagcggcccccgggtgtaacaaagttggcgaatcggagtgaaaatatacgtttacgttgcggtttta
 aatgtggatttggaggcggcaaaagagctgggataaaagtcgtaacgggtgcctgctgattcgggaagcgggttgcggagatgcg
 atcggtaaatgctgactttaaaccgctatccataaggcttatcagcgtaccggcagatgcaaattttctctggaaggattggtcggttt
 aatgttgcgcaaaacccgagtgatgtgacgggaaaatcggcttggcggctatcgaattttaaaggctcggatggaagcgtt
 ctggcgttgatccttttaaaaatccggcggcgaagcgttggcggcaaaaatgtcgggttagacgagcttatgcaaaatccatgta
 tcacttgcattgccggctacggcggataaattatcattttaaataagcggctttaaataaaatgcgcaagcgggtatgattataa
 ccagccgcccgttttaattgacagcccggcgaatcgaagcgtttaaaccgcaaaaatcggcgtcctcggatggtgattatg
 aaaaatgaacgggattgttttgcaggataaaatcaacgatgattatcggatgatgattcctgctccttctctgcaaaatgcttttac
 cgtcatcaggcgttttaacggaagaagcgtgaataatcgcggatgactttatcgaatattcaggcgggttcaaaaaatgcaac
 gtgcgaaaatagcgttgaaggctaa

SEQ ID NO: 11 (secuencia de aminoácidos de la LdhA de la cepa DD1)

MTKSVCLNKLTKMKVAVYSTKNYDRKHLDLANKKFNLFHFFDFLLDEQTAKMAEGADAVCFV
 NDDASRPVLTKLAQIGVKIILRCAGFNNDLEAAKELGLKVVVRVPAYSPEAVAEHAIGLMLTLN
 RRIHKAYQRTRDANFSLEGLVGFNMFGKTAGVIGTGKIGLAAIRILKGFMDVLAFDPFKNPAAE
 ALGAKYVGLDELAKSHVITLHCPATADNYHLLNEAAFNKM RDGVMIIINTSRGLIDSRAAIEAL
 KRQKIGALGMDVYENERDLFFEDKSNDVITDDVFRRLLSSCHNVLFTGHQAFLTEEALNNIADVT
 LSNIAQVSKNATCENSVEG

5

SEQ ID NO: 12 (secuencia nucleotídica del gen *pflA* de la cepa DD1)

atgtcggtttaggacgaatcattcatttgaacctgcgggacagttgacgggcccgggaatccgctttattttttacaaggctgcttaa
 tgcgttgaataactgccataaagagacacctgggattgcacggcggtaaaagaaattcggttgaagaattaaatgaagaagtggtg
 acctatcgcctttatgaacgcctcggggcgggagttaccgcttccggcggtaagctattttacaggcgggaattgtacgggactgg

 ttcagagcctgccataaagaaggaattaacttgccttgatccaacgggttgcctcctcatgatcatattatgatgaattgattgat
 gacacggatcttgttgcctgacctgaaagaaatgaatgaacgggttcacgaaagcctgattggcgtgccaataaaagagtgctcg
 aattcgaataatattgacggatcgaatcagcglacclggatccgcatgtttagtgccgggtatacagatagtgacgaagatttgc
 acatgctggggaattcattaaagatagaagaatcgaaaaagtgaattattaccttaccctctagggcggccataaatgggaa
 gfactcggcgataaatacagactgaagatgaaaccggcgaacaaagaatgaaggagcatgtaaggggtgcttgcaggctac
 gggcftaatgtgacatattag

SEQ ID NO: 13 (secuencia de aminoácidos de PflA de la cepa DD1)

MSVLGRIHSFETCGTVDGGPGRFILFLQGCLMRCKYCHNRDWTDLHGGKEISVEELMKEVVTY
RHFMNASGGGVTASGGAILQAEFVRDWFRAHKEGINTCLDTNGFVRHHDHIIDELIDDTDLV
LLDLKEMNERVHESLIGVPNKRVLEFAKYLRNQRWIRHVVVPGYTDSEDLHMLGNFIKD
MKNIEKVPELLPYHRLGAHKWEVLGDKEYELEDVKPPTKELMEHVKGLLAGYGLNVTY

SEQ ID NO: 14 (secuencia nucleotídica del gen *pflD* de la cepa DD1)

atggctgaattaaacagaaagctcaaaaaaagcatgggaaggattcgtcccggtgaatggcaaaacggcgtaaattacgtgacttt
atcaaaaaaactatactccgatgaagggtgacgaatcattcttagctgatcgactcctgcaaccagcgagttgtggaacagcgtga
tggaaaggcatcaaaatcgaaaaaaaactcacgcaccttagatttcgacgaacatactccgtcaactatcactctcaacaagcctgg
ttatatcaataaagatttagaaaaatcgttgcttcaaacagacgcctccgttaaaacgtgcaattatcgctgacggcggtatcaaat
gatcaaaaggttcttgcgaagttacggtcgtaaatagatccgcaagtagaattttaccgaaatcgtaaaaccataccaagg
cgtattcgacggttatacggcgtatattacgctgctgaaatcaggcgtgtaaccggttaccggatgcttacgctcgtggtcgtattac
ggtgactaccgctgttagcgggtatcgggtattgattacctgatgaagataaaaaagcccaattcgattcattacaaccgcttggaa
cggggcgaagacattcaggcaactatccaattacgtgaagaaattgccgaacaacaccgctttaggcaaaatcaagaaatgg
cggcatctacggttacgacattccggccctcgacaaaacgcacaggaagcaatccaatggacatatttgcctatctggcagcgggt
aaatcaaaaacgggtgcgcaatgctcctcgtcgtacgtctacattcttagatattatcgaaacgtgacttaaaacggcgttaataca
ctgaacaacagggcaggaatgaatggaccacttagtaataaattacgtatggtcgtttcttacgtacggcgaalacgatcaattatt
ctcaggcgaaccgatgtgggcaaccgaaactatcggcgtatggccttagacggctgctcggtaactaaaaacagcttccgcgt
attacatacttatacactatgggtactctcgggaaccaaacttaactattcttggcgaacaattacctgaagcgttcaaacggttctgt
cggaaagtatctaitgatacttccctcgtacaatacgaaaaatgatgacttaatgctcctgactcaacaacgatgactatgcaatcgat
gctcggatcaccgatggctgtaggtaaaacaaatgcaattctcgggtgcgcgcgcaaaccttagctaaaactatgttatacgaattaaac
ggcggatcgatgagaaaaatggatgcaagtcggctcaaaactcgcgcgattacagacgaagattgaatttcgataccgtaaatcg
aacgtatggacagttcatggactggttggcgaactaatatgaaccgcaatgaacatcatccactcatgcacgataaatatgcatatg
aagcggcatgatggcgttccacgatcgcgacgtatccgtaacaatggcctgcggtatcgcggtcttccgtggctcggactcattac
cgcaatcaaatatcgcaaaatgaaaccgattcggcggacatcaaaagataaagacggtaatgctggtcctcgaatgtgctatcga
cttcgaaatgaaggcgaatataccgcaatcggtaacaatgatccgctggtgatgattagcggtagacttagtgaaacgttcatgaaa
aaagttcaaaaacacaaaacttaccgcaacgcacactccgacacaatcctcctgactatcacttcaacgtggtatcggtaagaaa
accggtataactccggacggctcgtcagcagggcgcgccattcggaccgggtgcaaaccaatgacggctcgtgacaaaaagggt
gcggttctcactactctcgtgctaaactcgttcgcttacgcaaaagacggatttcatataccttctctatctgaccgaacgcattag
gtaaagatgacgaagcgaacaaacgcaaccttccggttaatggacgggtatttccatcatgaagcgcagctggaaggcgggtcaa
cactgaaatgtaacgttcttaaccgtgaaatgtgttagacgcatggaataaccggcaaaataccggcaatcaaccattcgttccag
gttacggttcttcaactcattaaagagcaacaacaagacgctacactcgtacgtttacacaatcaatgtaa

5 **SEQ ID NO: 15** (aminoácidos de PflD de la cepa DD1)

MAELTEAQKKAWEFVPGEWQNGVNLRFDIQKNYTPYEGDESFLADATPATSELWNSVMEGI

KIENKTHAPLDFDEHTPSTITSHKPGYINKDLEKIVGLQTDAPLKRAIMPYGGIKMIKGSCEVYGR
KLDPQVEFIFTEYRKTHNQGVFDVYTPDILRCRKSGLTGLPDAYGRGRIIGDYRRLAVYIDYL
MKDKKAQFDSLQPRLEAGEDIQATIQLREEIAEQHRALGKIKEMAASYGYDISGPATNAQEAIQ
WTYFAYLAAVKSQNGAAMSFGRTSTFLDIYIERDLKRGLITEQQAQELMDHLVMKLRMVRFLRT
PEYDQLFSGDPMWATETIAGMGLDGRPLVTKNSFRVLHTLYTMGTSPEPNLTILWSEQLPEAF
KRFCAKVSIDTSSVQYENDDLMRPFDNDDYAIACCVSPMVVGKMQMFFGARANLAKTMLYAI
NGGIDEKNGMQVGPKTAPITDEVLNFDTVIERMDSFMDWLATQYVTALNIIHFMDKYAYEAAL
MAFHDRDVFRTMACGIAGLSVAADSLSAIKYAKVKPIRGDIKDKGNVVASNVAIDFEIEGEYPO
FGNNDPRVDDLAVDLVERFMKKVQKHKTYRNATPTQSILTITSNVYGGKKTGNTPDGRRAGAP
FGPGANPMHGRDQKGAVASLTSVAKLPFAYAKDGISYTFIVPNALGKDDEAQKRNLAGLMDG
YFHHEATVEGGQHLNVNVLNREMLLDAMENPEKYPQLTIRVSGYAVRFNSLTKEQQQDVITRT
FTQSM

ES 2 702 930 T3

SEQ ID NO: 16 (secuencia nucleotídica del gen *wcaJ* de la cepa DD1 con inserción de citosina entre los nucleótidos 81 y 82)

```
Atgataaaacgcctttcgaattgtgtcgcattgatagcattgatttgtttcgccttataattgttggcctatcagggtaaacaatt  
tgggatcaccggtgtatttaacaacccgcccggattgatggttaaacccttgagatgattaagttcagaacaatgaaagacgg  
cgagatgaaaacggtaataatttgcggatcggagcgttaacaccttcggcaaatgttgcgcgctaccagctggacgagttgc  
cggaaacttggatgtattaaaaggatgatagctgtggggccgctcctctgatggaatattgccgctgtataacgaaagac  
aggctaagcgcctgaagtgaaacccggaattaccggtatgcacaggtaaaccggtcgcaatgccatcagttgggagcagaaatt  
gaattggatgctggtatgtgaacaatcaatcctgtggctgattgaaaatcgcgaaagaccatccaaaaagtgatcgcaaaaga  
cgtattaaatgcggcagatgatccaccatgcctaaattgaaggaataaaaaatcatga
```

LISTADO DE SECUENCIAS

5

<110> BASF SE

<120> Microorganismo modificado con un comportamiento de separación de biomasa mejorado

10

<130> 0000074822WO01

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.3

15

<210> 1

<211> 1517

<212> ADN

<213> *Basfia succiniciproducens*

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> ADNr 16 S de la cepa DD1

25

<400> 1

ES 2 702 930 T3

ttgatcctg gctcagattg aacgctggcg gcaggcttaa cacatgcaag togaacggta 60
 gcgggaggaa agcttgcttt ctttgccgac gagtggcgga cgggtgagta atgcttgggg 120
 atctggctta tggaggggga taacgacggg aaactgtcgc taataccgcg taatatcttc 180
 ggattaaagg gtgggacttt cgggccaccc gccataagat gagoccaagt gggattaggt 240
 agttggtggg gtaaaggcct accaagccga cgatctctag ctggtctgag aggatgacca 300
 gccacactgg aactgagaca cggtcacgac tcctacggga ggcagcagtg gggaaatattg 360
 cacaatgggg ggaaccctga tgcagccatg ccgcgtgaat gaagaaggcc ttcgggttgt 420
 aaagttcttt cggtgacgag gaaggtgttt gttttaatag gacaagcaat tgacgttaat 480
 cacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc agcagccgcg gtaatacggga ggggtgcgagc 540
 gttaatcggga ataactgggc gtaaagggca tgcaggcgga cttttaagtg agatgtgaaa 600
 gccccgggct taacctggga attgcatttc agactgggag tctagagtac tttagggagg 660
 ggtagaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaatac cgaaggcgaa 720
 ggcagcccct tgggaagata ctgacgctca tatgcgaaag cgtgggggagc aaacaggatt 780
 agataccctg gtagtccacg cggtaaacgc tgtcgatttg gggattgggc tttaggcctg 840
 gtgctogtag ctaacgtgat aaatcgaccg cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact 900
 caaatgaatt gacgggggccc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg 960
 cgaagaacct tacctactct tgacatccag agaatcctgt agagatacgg gagtgccttc 1020
 gggagctctg agacagggtgc tgcattggctg tcgtcagctc gtggttgtaa atggtgggtt 1080
 aagtcccgca acgagcgcaa cccttatcct ttggtgccag catgtaaaga tgggaactca 1140
 aaggagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc atcatggccc 1200

 ttacgagtag ggctacacac gtgctacaat ggtgcataca gagggcggcg ataccgcgag 1260
 gtagagcgaa tctcagaaag tgcattogtag tcoggattgg agtctgcaac tcgactccat 1320
 gaagtccgaa tcgctagtaa tcgcaaatca gaatgttgcg gtgaatacgt tcccgggcct 1380
 tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt gggttgtacc agaagtagat agcttaacct 1440
 tcgggggggg cgtttaccac ggtatgattc atgactgggg tgaagtcgta acaaggtaac 1500
 cgtaggggaa cctgcgg 1517

<210> 2
 <211> 3008
 <212> ADN
 <213> *Basfia succiniciproducens*

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> ADNr 23 S de la cepa DD1

10

<400> 2

ES 2 702 930 T3

agtaataacg aacgacacag gtataagaat acttgaggtt gtatggtaa gtgactaagc 60
 gtacaagggt gatgccttgg caatcagagg cgaagaagga cgtgctaadc tgcgaaaagc 120
 ttgggtgagt tgataagaag cgtctaacc aagatatccg aatggggcaa cccagtagat 180
 gaagaatcta ctatcaataa cogaatccat aggttattga ggcaaaccgg gagaactgaa 240
 acatctaagt accccgagga aaagaaatca accgagatta cgtcagtagc ggcgagcgaa 300
 agcgtaaagag ccggcaagtg atagcatgag gattagagga atcggctggg aagccggggg 360
 gcacaggggtg atagccccgt acttgaaaat cattgtgtgg tactgagctt gcgagaagta 420
 gggcgggaca cgagaaatcc tgtttgaaga aggggggacc atcctccaag gctaaatact 480
 cctgattgac cgatagtgaa ccagtactgt gaaggaaagg cgaaaagaac cccggtgagg 540
 ggagtgaaat agaacctgaa accttgtacg tacaagcagt gggagcccgc gagggtgact 600
 gcgtaccttt tgtataatgg gtcagcgact tatattatgt agcgaggtta accgaatagg 660
 ggagccgaag ggaaaccgag tottaactgg gcgtcgagtt gcatgatata gaccogaaac 720
 ccggtgatct agccatgggc aggttgaagg ttgggtaaca ctaactggag gaccgaaccg 780
 actaatgttg aaaaattagc ggatgacctg tggtggggg tgaaaggcca atcaaaccgg 840
 gagatagctg gttctccccg aaatctattt aggtagagcc ttatgtgaat accttcgggg 900
 gtagagcact gtttcggcta gggggccatc ccggcttacc aaccgatgc aaactgcaa 960
 taccgaagag taatgcatag gagacacacg gcgggtgcta acgttcgtcg tggagagga 1020
 aacaaccag accgccagct aaggtoccaa agtttatatt aagtgggaaa cgaagtggga 1080
 aggcttagac agctaggatg ttggcttaga agcagccatc atttaaagaa agcgtaatag 1140
 ctactagtc gagtcggcct gcgcggaaga tgtaacgggg ctcaaataa gcaccgaagc 1200

ES 2 702 930 T3

tgcggcatca ggcgtaagcc tgttgggtag gggagcgtcg tgtaagcggga agaaggtggt 1260
 tcgagagggc tgctggacgt atcacgagtg cgaatgctga cataagtaac gataaaacgg 1320
 gtgaaaaacc cgttcgccgg aagaccaagg gttcctgtcc aacgttaatc ggggcagggt 1380
 gagtcggccc ctaagggcag gctgaagagc gtagtcgatg ggaaacgggt taatattccc 1440
 gtacttgta taattgcgat gtggggacgg agtaggttag gttatcgacc tgttgaaaa 1500
 ggtcgtttaa gttggtaggt ggagcgtta ggcaaatccg gacgcttatc aacaccgaga 1560
 gatgatgacg agggcctaag gtgccgaagt aaccgatacc aacttccag gaaaagccac 1620
 taagcgtcag attataataa accgtactat aaaccgacac aggtggtcag gtagagaata 1680
 ctcaggcgtc tgagagaact cgggtgaagg aactaggcaa aatagcaccg taacttcggg 1740
 agaaggtgcg ccggcgtaga ttgtagaggt ataccctga aggttgaacc ggtcgaagtg 1800
 acccgctggc tgcaactggt tattaaaaac acagcactct gcaaacacga aagtggacgt 1860
 ataggggtg atgocctgcc ggtgctggaa ggttaattga tggcgttatc gcaagagaag 1920
 cgctgatcg aagccccagt aaacggcggc cgtaactata acggtcctaa ggtagcga 1980
 ttcttctgog ggtaagttcc gacctgcacg aatggcataa tgatggccag gctgtctcca 2040
 cccgagactc agtgaaattg aaatcgccgt gaagatgctg tgtaccgctg gctagacgga 2100
 aagaccocgt gaacctttac tatagcttga cactgaacct tgaattttga tgtgtaggat 2160
 aggtgggag ctttgaagcg gtaacgccag ttatcgtgga gccatccttg aaataccacc 2220
 ctttaacgtt tgatgttcta acgaagtgcc cggaacgggt actcggacag tgtctggtgg 2280
 gtagtttgac tggggcggtc tcctcccaaa gagtaacgga ggagcacgaa ggtttgctaa 2340
 tgacggctcg acatcgtcag gttagtcaa tggataagc aagcttaact gcgagacgga 2400
 caagtcgagc aggtgcgaaa gcaggtcata gtgatccggt ggttctgaat ggaagggcca 2460
 tcgctcaacg gataaaaggt actccgggga taacaggctg ataccgcca agagttcata 2520
 tcgacggcgg tgtttggcac ctcgatgctg gctcatcaca tcctggggct gaagtaggtc 2580
 ccaaggtat ggctgttcgc catttaaagt ggtacgcgag ctgggtttaa aacgtcgtga 2640
 gacagtttg tccctatctg ccgtggcgtg tggagaattg agaggggctg ctctagtagt 2700
 gagaggaccg gagtgacgc atcactggtg ttccggtgtg gtcgccagac gcattgccgg 2760
 gtagctacat gcggaagaga taagtctga aagcatctaa gcacgaaact tgcctcgaga 2820
 tgagttctcc cagtatttaa tactgtaagg gttgttgag acgacgacgt agataggccg 2880
 ggtgtgtaag cgttgcgaga cgttgagcta accggtacta attgcccag aggcttagcc 2940
 atacaacgct caagtgtttt tggtagtga agttattacg gaataagtaa gtagtcaggg 3000
 aatcgct 3008

<210> 3
 <211> 600
 <212> ADN

ES 2 702 930 T3

<213> *Basfia succiniciproducens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <223> secuencia nucleotídica del gen wcaJ de la cepa DD1

<400> 3

```

atgataaaac gccttttcga tattggtgtc gcattgatag cattgatttt gttttcgccc      60
ttatatttgt ttgtggctta taaggtaaaa caaaatttgg gatcaccggg gttattttaa      120
caaacccgcc ccggattgca tggtaaacc cttgagatga ttaagttcag aacaatgaaa      180
gacggcgcag atgaaaacgg taatattttg ccggatgogg agcgcttaac acctttcggc      240
aaaatggtgc gcgctaccag tctggacgag ttgccggaac tttggaatgt attaaaaggt      300
gatatgagtc tgggtggggcc gcgtcctcta ctgatggaat atttgcgct gtataacgaa      360
agacaggcta agcgccatga agtgaaacc ggaattaccg gttatgcaca ggtaaacggg      420
cgcaatgcca tcagttggga gcagaaattt gaattggatg cctgggatgt tgaacatcaa      480
tccttggtgc tggatttgaa aattatcgca aagaccatcc aaaaagtgat cgcaaaagac      540
gatattaatg cggcagatga tgccaccatg cctaaatttg aagggaataa aaaatcatga      600
    
```

10

<210> 4

<211> 199

<212> PRT

<213> *Basfia succiniciproducens*

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> secuencia de aminoácidos de la enzima codificada por el gen wcaJ

20

<400> 4

```

Met Ile Lys Arg Leu Phe Asp Ile Val Val Ala Leu Ile Ala Leu Ile
 1           5           10          15

Leu Phe Ser Pro Leu Tyr Leu Phe Val Ala Tyr Lys Val Lys Gln Asn
          20           25           30

Leu Gly Ser Pro Val Leu Phe Lys Gln Thr Arg Pro Gly Leu His Gly
          35           40           45

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

Glu Asn Gly Asn Ile Leu Pro Asp Ala Glu Arg Leu Thr Pro Phe Gly
65           70           75           80
    
```

ES 2 702 930 T3

Lys Met Leu Arg Ala Thr Ser Leu Asp Glu Leu Pro Glu Leu Trp Asn
85 90 95

Val Leu Lys Gly Asp Met Ser Leu Val Gly Pro Arg Pro Leu Leu Met
100 105 110

Glu Tyr Leu Pro Leu Tyr Asn Glu Arg Gln Ala Lys Arg His Glu Val
115 120 125

Lys Pro Gly Ile Thr Gly Tyr Ala Gln Val Asn Gly Arg Asn Ala Ile
130 135 140

Ser Trp Glu Gln Lys Phe Glu Leu Asp Ala Trp Tyr Val Glu His Gln
145 150 155 160

Ser Leu Trp Leu Asp Leu Lys Ile Ile Ala Lys Thr Ile Gln Lys Val
165 170 175

Ile Ala Lys Asp Asp Ile Asn Ala Ala Asp Asp Ala Thr Met Pro Lys
180 185 190

Phe Glu Gly Asn Lys Lys Ser
195

5 <210> 5
<211> 4285
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia nucleotídica completa del plásmido pSacB
<400> 5

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagtctg gacctagga 60
tatcgtcgac atogatgctc ttctgcgta attaacaatt gggatcctct agactccata 120
ggccgctttc ctggctttgc ttccagatgt atgctctcct cggagagta ccgtgacttt 180
atthtcggca caaatacagg ggtc gatgga taaatacggc gatagtttcc tgacggatga 240
tccgtatgta cggcggaag acaagctgca aacctgtcag atggagattg atttaatggc 300
ggatgtgctg agagcaccgc cccgtgaatc cgcagaactg atccgctatg tgtttgcgga 360
tgattggccg gaataaataa agccgggott aatacagatt aagcccgat aggggtattat 420
tactgaatac caaacagctt acggaggacg gaatgttacc cattgagaca accagactgc 480
cttctgatta ttaatatttt tcactattaa tcagaaggaa taacctgaa ttttaccggg 540
attgacctga atacctgaa tcgcaggaa cactttgccc tttatcgtca gcagattaaa 600

ES 2 702 930 T3

tgcggattca gctgaccac caaactcgat attaccgctt tgcgtaccgc actggcggag 660
 acaggttata agttttatcc gctgatgatt tacctgatct cccgggctgt taatcagttt 720
 cccgagttcc ggatggcact gaaagacaat gaacttattt actgggacca gtcagacccg 780
 gtctttactg tctttcataa agaaaccgaa acattctctg cactgtcctg ccgttatttt 840
 ccgatctca gtgagtttat ggcaggttat aatgcggtaa cggcagaata tcagcatgat 900
 accagattgt ttccgcaggg aaatttaccg gagaatcacc tgaatatatc atcattaccg 960
 tgggtgagtt ttgacgggat ttaacctgaa catcacccga aatgatgatt attttgcccc 1020
 ggtttttacg atggcaaagt ttcagcagga aggtgaccgc gtattattac ctgtttctgt 1080
 acaggttcat catgcagtct gtgatggctt tcatgcagca cggtttatta atacacttca 1140
 gctgatgtgt gataacatac tgaataaat taattaatc tgtatttaag ccaccgtatc 1200
 cggcaggaat ggtggctttt tttttatatt ttaaccgtaa tctgtaattt cgtttcagac 1260
 tggttcagga tgagctcgct tggactcctg ttgatagatc cagtaatgac ctcagaactc 1320
 catctggatt tgttcagaac gctcggttgc cgcggggcgt tttttattgg tgagaatcca 1380
 agcactagcg gcgcgccggc cggccccgtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa 1440
 ataccgcac caggcctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgctcg 1500
 gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg 1560
 ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 1620
 ggccgcgctg ctggcgtttt tccataggct cggccccctt gacgagcacc acaaaaatcg 1680
 acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 1740
 tggaagctcc ctcgtcgct ctctgttcc gaccctgcc cttaccggat acctgtccgc 1800
 ctttctccct tcgggaagcg tggcgtttc tcatagctca cgtcttaggt atctcagttc 1860
 ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcaagaa cccccgctc agcccagccg 1920
 ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc 1980
 actggcagca gccactggtg acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 2040
 gttcttgaag tgggtgccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 2100
 totgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaacaac 2160
 caccgctggt agcggtggtt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 2220
 atctcaagaa gatcctttga tctttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 2280
 acgtaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcaoctaga tccttttaaa 2340
 ggccggccgc ggccgccatc ggcattttct tttgcgtttt tatttgtaa ctgtaattg 2400
 tccttgttca aggatgctgt ctttgacaac agatgttttc ttgoccttga tgttcagcag 2460
 gaagctcggc gcaaacgtg attgttgtc tgcgtagaat cctctgttg tcatatagct 2520

ES 2 702 930 T3

tgtaatcacg acattgtttc ctttcgcttg aggtacagcg aagtgtgagt aagtaaaggt 2580
 tacatcgta ggatcaagat ccatttttaa cacaaggcca gttttgttca gcggcttgta 2640
 tgggccagtt aaagaattag aaacataacc aagcatgtaa atatcgttag acgtaatgcc 2700
 gtcaatcgtc atttttgatc cgcgggagtc agtgaacagg taccatttgc cgttcatttt 2760
 aaagacgttc gcgcgttcaa tttcatctgt tactgtgtta gatgcaatca gcggtttcat 2820
 cacttttttc agtgtgtaat catcgtttag ctcaatcata ccgagagcgc cgtttgctaa 2880
 ctcagccgtg cgttttttat cgctttgcag aagtttttga ctttcttgac ggaagaatga 2940
 tgtgcttttg ccatagtatg ctttgttaaa taaagattct tcgccttggg agccatcttc 3000
 agttccagtg tttgcttcaa atactaagta tttgtggcct ttatcttcta cgtagtgagg 3060
 atctctcagc gtatggttgt cgcctgagct gtagttgcct tcatcgatga actgctgtac 3120
 attttgatac gtttttccgt caccgtcaaa gattgattta taatcctcta caccgttgat 3180
 gttcaaagag ctgtctgatg ctgatacgtt aacttgtgca gttgtcagtg tttgtttgcc 3240
 gtaatgttta ccggagaaat cagtgtagaa taaacggatt tttccgtcag atgtaaagt 3300
 ggctgaacct gaccattctt gtgtttggtc ttttaggata gaatcatttg catogaattt 3360
 gtcgctgtct ttaaagacgc ggccagcgtt tttccagctg tcaatagaag tttcgccgac 3420
 tttttgatag aacatgtaaa tcgatgtgtc atocgcattt ttaggatctc cggctaattg 3480
 aaagacgatg tggtagccgt gatagtttgc gacagtgccg tcagcgtttt gtaatggcca 3540
 gctgtcccaa acgtccagtc cttttgcaga agagatattt ttaattgtgg acgaaatcaaa 3600
 ttcagaaact tgatattttt catttttttg ctgttcaggg atttgcagca tatcatggcg 3660
 tgtaatatgg gaaatgccgt atgtttcctt atatggcttt tggttcgttt ctttcgcaaa 3720
 cgcttgagtt gcgcctctg ccagcagtc ggtagtaaag gtttaactg ttgcttgttt 3780
 tgcaaaactt ttgatgttca tcgttcatgt ctoccttttt atgtactgtg ttagcggctc 3840
 gcttcttoca gccctcctgt ttgaagatgg caagttagtt acgcacaata aaaaaagacc 3900
 taaaatatgt aaggggtgac gccaaagat acactttgcc ctttacacat tttaggtctt 3960
 gcctgcttta tcagtaacaa acccgcgca tttacttttc gacctcattc tattagactc 4020
 tcgtttgat tgcaactggt ctattttcct cttttgttg atagaaaatc ataaaaggat 4080
 ttgcagacta cgggcctaaa gaactaaaa atctatctgt ttcttttcat tctctgtatt 4140
 ttttatagtt tctgttgcac gggcataaag ttgccttttt aatcacaatt cagaaaatat 4200
 cataatatct catttcacta aataatagtg aacggcaggt atatgtgatg ggtaaaaag 4260
 gatcggcggc cgctcgattt aaatc 4285

<210> 6
 <211> 7074
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia nucleotídica completa del plásmido pSacB_delta_ldhA

ES 2 702 930 T3

<400> 6

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagtctg gacctagggg 60
 tgggtcagcc tgaacgaacc gcacttgtat gtaggtagtt ttgaccgccc gaatattcgt 120
 tataccttgg tggaaaaatt caaacccgatg gagcaattat acaattttgt ggcggcgcaa 180
 aaaggtaaaa gcggtatcgt ctattgcaac agccgtagca aagtggagcg cattgcggaa 240
 gccctgaaga aaagaggcat ttccgcagcc gcttatcatg cgggcatgga gccgtcgcag 300
 cgggaagcgg tgcaacaggc gtttcaacgg gataatattc aagtgggtggg ggcgaccatt 360
 gcttttggtg tggggatcaa caaatctaata gtgcgttttg tggcgcattt tgatttatct 420
 cgcagcattg aggcgtatta tcaggaaacc ggcgcgcggg ggcgggacga cctgccggcg 480
 gaagcggtag tgttttacga gccggcgcat tatgcctggg tgcataaaat tttattggaa 540
 gagccggaaa gcccgcaacg ggatattaaa cggcataagc tggaaagccat cggcgaattt 600
 gccgaaagcc agacctgccg tcgttttagtg ctgttaaatt atttcggcga aaaccgcaa 660
 acgccatgta ataactgtga tatctgcctc gatccgcga aaaaatatga cggattatta 720
 gacgcgcaga aaatccttc gaccatttat cgcaccgggc aacgtttcgg cacgcaatac 780
 gtaatcggcg taatgcgcgg tttgcagaat cagaaaataa aagaaatca acatgatgag 840
 ttgaaagtct acggaattgg caaagataaa agcaaagaat actggcaatc ggtaattcgt 900
 cagctgattc atttgggctt tgtgcaacaa atcatcagcg atttcggcat ggggaccaga 960
 ttacagctca ccgaaagcgc gcgtcccgtg ctgcgcggcg aagtgtcttt ggaactggcc 1020
 atgccgagat tatcttccat taccatggta caggctccgc aacgcaatgc ggtaaccaac 1080
 tacgacaaag atttatttgc ccgcctgcgt ttccctgcga aacagattgc cgacaaagaa 1140
 aacattccgc cttatattgt gttcagtgac gcgaccttg caggaaatg c gttgtatcag 1200
 ccgaccagca aagtggaaat gctgcaaac aacgggtgctg gcgccatcaa atggcagcgc 1260
 ttcggacagc cttttatggc gattattaaa gaacatcagg ctttgcgtaa agcgggtaag 1320
 aatccgttgg aattgcaatc ttaaaatctt taactttttg accgcacttt taaggtagc 1380
 aaattccaat aaaaagtgcg gtgggttttc gggaattttt aacgcgctga tttcctcgtc 1440
 ttttcaattt yttcgyctcc atttgttcgg yggttgcgg atcctttctt gactgagatc 1500
 cataagagag tagaatagcg ccgcttatat ttttaatagc gtacctaatc gggtagcctt 1560
 ttttatgcg gaaaatccat atttttctac cgcacttttt ctttaagat ttatacttaa 1620
 gtctgtttga ttcaatttat ttggaggttt tatgcaacac attcaactgg ctcccgattt 1680

ES 2 702 930 T3

aacattcagt cgcttaattc aaggattctg gcggttaaaa agctggcggg aatcgccgca 1740
ggaattgctt acattcgtta agcaaggatt agaattaggc gttgatacgc tggatcatgc 1800
cgcttggtac ggggctttta cttccgagge ggaattcggg cgggcgctgg cgctggataa 1860
atccttgccg gcacagctta ctttggtgac caaatgcggg attttgtatc ctaatgaaga 1920
attaccgat ataaaatccc atcaactatga caacagctac cgccatatta tgtggtcggc 1980
gcaacgttcc attgaaaaac tgcaatgcga ctatttagat gtattgctga ttcaccgwct 2040
ttctccctgt ggggatcccg aacaaatogc gcgggctttt gatgaacttt atcaaaccgg 2100
raaagtacgt tatttcgggg tatctaacta tacgcccggc aagttcgcca tgttgcaatc 2160
ttatgtgaat cagccgtaa tcactaatca aattgagatt tcgcctcttc atcgtcagge 2220
ttttgatgac ggtaccctgg attttttact ggaaaaacgt attcaaccga tggcatggtc 2280
gccactgccc ggcggtcggt tattcaatca ggatgagaac agtcggggcg tgcaaaaaac 2340
attactcгаа atcggtgaaa cgaaaggaga aacccttta gatacattgg cttatgcctg 2400
gttattggcg catccggcaa aaattatgcc ggttatgggg tccggtaaaa ttgaaccggg 2460
aaaaagcgcg gcggatgcgt tacgaatttc cttcactgag gaagaatgga ttaaggttta 2520
tgttgccgca cagggacggg atattccgta acatcatccg totaatcctg cgtatctggg 2580
gaaagatgcg tcatcgtaag aggtctataa tattcgtcgt tttgataagg gtgccatatc 2640
cggcaccctg taaaatcaca ttgcgcttcg acaaaaatta ttccttaoga atagcattca 2700
cctcttttaa cagatggtga atatccgtat cggcaaaaat atcctctata tttgcgggta 2760
aacggcggcg ccagtttagca tattgagtgc tggttccggg aatattgacg ggttcgggta 2820
taccgagcca gtcttcaggt tggaaatccc atcgtcgaca tcgatgctct tctgcggtta 2880
ttaacaattg ggatcctcta gactccatag gccgctttcc tggctttgct tccagatgta 2940
tgctctctc cggagagtac cgtgacttta ttttcggcac aaatacaggg gtcgatggat 3000
aaatacggcg atagtttccct gacggatgat ccgtatgtac cggcggaga caagctgcaa 3060
acctgtcaga tggagattga tttaatggcg gatgtgctga gagcaccgcc ccgtgaatcc 3120
gcgaaactga tccgctatgt gtttgoggat gattggccgg aataaataaa gccgggctta 3180
atacagatta agcccgtata ggttattatt actgaatacc aaacagctta cggaggacgg 3240
aatgttacc attgagaaa ccagactgcc ttctgattat taatattttt cactattaat 3300
cagaaggaat aaccatgaat tttaccogga ttgaactgaa tacctggaat cgcagggaac 3360
actttgccct ttatcgtcag cagattaaat gcggattcag cctgaccacc aaactogata 3420
ttaccgcttt gcgtaccgca ctggcggaga caggtataaa gttttatccg ctgatgattt 3480
acctgatctc ccgggctggt aatcagtttc cggagttccg gatggcactg aaagacaatg 3540

ES 2 702 930 T3

aacttattta ctgggaccag tcagaccogg tctttactgt ctttcataaa gaaaccgaaa 3600
cattctctgc actgtcctgc cgttatthtc cggatctcag tgagtttatg gcaggttata 3660
atgcggtaac ggcagaatat cagcatgata ccagattggt tccgcaggga aatttaccgg 3720
agaatcacct gaatatatca tcattaccgt gggtgagttt tgacgggatt taacctgaac 3780
atcaccggaa atgatgatta ttttgccccg gtttttacga tggcaaagtt tcagcaggaa 3840
ggtgaccogc tattattacc tgtttctgta caggttcac c atgcagtctg tgatggcttt 3900
catgcagcac ggtttattaa tacacttcag ctgatgtgtg ataacatact gaaataaatt 3960
aattaattct gtatttaagc caccgtatcc ggcaggaatg gtggcttttt ttttatattt 4020
taaccgtaat ctgtaatttc gtttcagact ggttcaggat gagctcgctt ggactcctgt 4080
tgatagatcc agtaatgacc tcagaactcc atctggattt gttcagaacg ctcggttgcc 4140
gccggcggtt ttttattggt gagaatccaa gcaactagcgg cgcgccggcc ggccccggtg 4200
gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg 4260
ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaag 4320
gcggtaatc ggttatccac agaactcagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 4380
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gcgcggttc tggcgttttt ccataggctc 4440
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgtcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca 4500
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg 4560
acctgcgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 4620
catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt 4680
gtgcacgaac cccccgttca gcccgaocgc tgcgccttat ccggtacta tcgtottgag 4740
tccaaccogg taagacacga cttatgccca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc 4800
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 4860
actagaagga cagtatttg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga 4920
gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc 4980
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 5040
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaaactca cgttaagga ttttggctat gagattatca 5100
aaaaggatct tcacctagat ctttttaag gccggccgcg gccgccatcg gcattttctt 5160
ttgcgttttt atttgttaac tgtaattgt ccttgttcaa ggatgctgtc tttgacaaca 5220
gatgttttct tgcctttgat gttcagcagg aagctcggcg caaacgttga ttgtttgtct 5280
gcgtagaatc ctctgtttgt catatagctt gtaatcagc cattgtttcc tttcgcttga 5340
ggtacagcga agtgtgagta agtaaaggtt acatcgttag gatcaagatc catttttaac 5400
acaaggccag ttttgttcag cggcttgtat gggccagtta aagaattaga aacataacca 5460

ES 2 702 930 T3

```

agcatgtaaa tatcgttaga cgtaatgccc tcaatcgcca tttttgatcc gcgggagtca 5520
gtgaacaggt accatttgcc gttcatttta aagaogttcg cgcgttcaat ttcattctgtt 5580
actgtgttag atgcaatcag cggtttcacc acttttttca gtgtgtaata atcgtttagc 5640
tcaatcatac cgagagcgcc gtttgctaac tcagcogtgc gttttttatc gctttgcaga 5700
agtttttgac tttcttgacg gaagaatgat gtgcttttgc catagtatgc tttgttaaat 5760
aaagattcct cgccttggtg gccatcttca gttccagtgt ttgcttcaaa tactaagtat 5820
ttgtggcctt tatcttctac gtagtgagga tctctcagcg tatggttgtc gcctgagctg 5880
tagttgcctt catcgatgaa ctgotgtaca ttttgatacg tttttccgtc accgtcaaag 5940
attgatttat aatcctctac accgttgatg ttcaaagagc tgtctgatgc tgatacgtta 6000
acttgtgcag ttgtcagtgt ttgtttgccg taatgtttac cggagaaatc agttagaata 6060
aaacggattt ttccgtcaga tgtaaagtgt gctgaacctg accattcttg tgtttggtct 6120
tttaggatag aatcatttgc atogaatttg tcgctgtctt taaagacgcg gccagcgttt 6180
ttccagctgt caatagaagt ttccgcgact ttttgataga acatgtaaat cgatgtgtca 6240
tccgcatttt taggatctcc ggctaatgca aagaogatgt ggtagccgtg atagtttgcg 6300
acagtgcctg cagcgttttg taatggccag ctgtcccaaa cgtccaggcc ttttgcagaa 6360
gagatatttt taattgtgga cgaatcaaat tcagaaactt gatatttttc atttttttgc 6420
tgttcagga tttgcagcat atcatggcgt gtaatatggg aatgccgta tgtttcctta 6480
tatggctttt ggttcgtttc tttcgcaaac gcttgagttg cgctcctgc cagcagtgcg 6540
gtagtaaaag ttaatactgt tgcttgtttt gcaaaacttt tgatgttcat cgttcatgtc 6600
tcctttttta tgtactgtgt tagoggtctg cttcttcag ccctcctgtt tgaagatggc 6660
aagttagtta cgcacaataa aaaaagacct aaaatatgta aggggtgacg ccaaagtata 6720
cactttgccc tttacacatt ttaggtcttg cctgctttat cagtaacaaa cccgcgcgat 6780
ttacttttcg acctcattct attagactct cgtttggatt gcaactggtc tattttcctc 6840
ttttgtttga tagaaatca taaaaggatt tgcagactac gggcctaaag aactaaaaaa 6900
tctatctgtt tcttttcatt ctctgtattt tttatagttt ctggttgcag ggcataaagt 6960
tgccttttta atcacaattc agaaaatata ataatatctc atttactaa ataatagtga 7020
acggcaggtg tatgtgatgg gttaaaaagg atcggcggcc gctcagattta aatc 7074

```

<210> 7
 <211> 7183
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia nucleotídica completa del plásmido pSacB_delta_pflA

10

<400> 7

ES 2 702 930 T3

tcgagtcaat gcggatttga cttatgatgt ggcaaacaac cgatttccga ttattactac 60
 acgtaaaaagt tatttgaaaag cggcgattgc ggagtttctg ggttatatcc gcggctacga 120
 taatgoggcg gatttccgta aattaggagc aaaaacctgg gatgccaacg ctaatgaaaa 180
 tcaggtatgg ctgaataacc ctcatcgcaa aggcaccgac gacatggggc gcgtttacgg 240
 cgtacagggc agagcctggc gtaagcctaa cggcgaaacc gttgatcaat tacgcaaaat 300
 tgtcaacaat ttaagtgcg gcattgatga tcgcgcgaa attctgacct ttttaaaccc 360
 gggcgaattc gatctcggtt gtctgcgcc ttgtatgtac aatcacacgt tttctttgct 420
 gggcgatacg ctttatataa ccagttatca acgctcctgt gacgtacct taggcttgaa 480
 tttcaatcaa attcaagtat ttacattctt agctttaatg gcgcagatta ccggtaaaaa 540
 agccggtcag gcatatcaca aaatcgtcaa tgcgcatatt tacgaagacc agctggaact 600
 aatgcgcgac gtgcagttaa aacgcgaacc gttcccgtag ccaaaaactg gaattaatcc 660
 ggacattaaa acccttgaag atttagaaac ctgggtaacc atggatgatt tcaacgctgt 720
 tggttaccaa tgccacgaac cgataaaata tcggttctcg gtataaacgg acaaaagtgc 780
 ggtcaaaaat ttaatatttt catctgttat agaaaatatt tttcaacata aaatctaggg 840
 atgcctgttt ggcgtcogta aatcgcgaga aaaatattaa atttttgacc gcactttttt 900
 catctcaatt aacagcctga taattcttat ggatcaacaa attagctttg acgaaaaaat 960
 gatgaatcga gctcttttcc ttgccgacaa ggcggaagct ttaggggaaa ttcccgtagg 1020
 tgccgtattg gtggatgaac ggggcaatat cattgggtga ggctggaacc tctctattgt 1080
 gaactcggat cccaccgccc atgcccgaat tattgcgttg cgtaacgccc cgcagaaaaat 1140
 ccaaaattac cgcctgctca ataccacttt atacgtgact ttagaaccct gcaccatgtg 1200
 cgccggcgcg attttacaca gccgaatcaa acgcttggtt ttccggggcgt ccgattacaa 1260
 aaccggtgcg gtgggttcca gatttcattt ttttgaggat tataaaatga atcatggggg 1320
 tgagatcaca agcgggtgtct tacaggatca atgcagtcag aagttaagcc gctttttcca 1380
 aaagcgcagg gaacagaaaa aacaacaaaa agctaccgca cttttacaac acccccggct 1440
 taactcctct gaaaaatagt gacaaaaaaa ccgtcataat gtttacgacg gtttttttat 1500
 ttcttaatat gcccttaaat aatcaacaaa atatagcaag aagattatag caaagaattt 1560
 cgtttttttc agagaatagt caaatcttgg caaaaaacta ccgcactttt atccgcttta 1620
 atcaggggaa ttaaaacaaa aaaattccgc ctattgaggc ggaatttatt aagcaataag 1680
 acaaaactct aattacattg attgtgtaaa cgtacgagtg atgacgtctt gttgttgctc 1740
 tttagttaat gagttgaaac gaaccgcgta acctgaaaca cgaatgggta attgcccggta 1800
 ttttccgga ttttccatcg cgtctaacaa catttcacgg ttaagaacgt taacattcaa 1860

ES 2 702 930 T3

gtgttgaccg ccttccactg tcgcttcatg atggaaataa ccgtccatta aaccggcaag 1920
 gttgcgtttt tgcgcttcgt catctttacc taatgcgttc ggtacgatag agaaggtata 1980
 tgaaataccg tctttcgcgt aagcgaacgg aagtttagcc acagaagtaa gtgaagcaac 2040
 cgcacctttt tggtcacgac cgtgcattgg gtttgcaccc ggcccgatg gcgcgcctgc 2100
 tcgacgaccg tccggagtat taccggtttt cttaccgtat accacgtag aagtgatagt 2160
 caggatagat tgtgtcggag ttgcgttgog gtaagttttg tgtttttgaa cttttttcat 2220
 gaaacgttca actaagtcta ccgctaaatc atcaacacgc ggatcattgt taccgaattg 2280
 cggatattcg ccttcaattt cgaagtcgat agcaacattc gaggccacga cattaccgtc 2340
 tttatctttg atgtcgccgc gaatcggttt aactttcgca tatttgattg cggataatga 2400
 gtccgcagcc acggaaagac ccgcgatacc gcaagccatt gtacggaata cgtcgcgatc 2460
 gtggaacgcc atcaatgccg cttcatatgc atatttatcg tgcataagt ggatgatggt 2520
 caatgoggtt acatattgag tcgccaacca gtccatgaaa ctgtccatac gttcagattac 2580
 ggtatcgaaa ttcaatactt cgtctgtaat cggcgcagtt ttaggaccga cttgcatacc 2640
 atttttctca togataccgc cgttaattgc gtataacata gtttttagcta agtttgocgc 2700
 cgcaccogaag aattgcattt gttacctac gaccatcggg gatacgcagc atgcgattgc 2760
 atagtcacgc ttgttgaagt caggacgcac taagtcacca ttttcgtatt gtacggagga 2820
 agtatcaata gatactttcg cacagaaacg tttgaacgct tcaggtaatt gttcggacca 2880
 aagaatagtt aagtttggtt ccggagaagt acccatagtg tataaagtat gtaatacgcg 2940
 gaagctgttt ttagttacca acggacgacc gtctaagccc ataccggcga tagtttcggt 3000
 tgccctctag actccatagg ccgctttcct ggctttgctt ccagatgtat gctctcctcc 3060
 ggagagtacc gtgactttat tttcggcaca aatacagggg tcgatggata aatacggcga 3120
 tagtttcctg acggatgatc cgtatgtacc ggcggaagac aagctgcaaa cctgtcagat 3180
 ggagattgat ttaatggcgg atgtgctgag agcaccgcc cgtgaatccg cagaactgat 3240
 ccgctatgtg tttgcggatg attggccgga ataaataaag ccgggcttaa tacagattaa 3300
 gcccgatatg ggtattatta ctgaatacca aacagcttac ggaggacgga atgttaccba 3360
 ttgagacaac cagactgcct tctgattatt aatatttttc actattaatc agaaggaata 3420
 accatgaatt ttaccgggat tgacctgaat acctggaatc gcaggaaca ctttgcctt 3480
 tatcgtcagc agattaatg cggattcagc ctgaccacca aactcgatat taccgctttg 3540
 cgtaccgcac tggcggagac aggttataag ttttatccgc tgatgattta cctgatctcc 3600
 cgggctgtta atcagtttcc ggagttcogg atggcactga aagacaatga acttatttac 3660
 tgggaccagt cagaccgggt ctttactgtc tttcataaag aaaccgaaac attctctgca 3720

ES 2 702 930 T3

ctgtcctgcc gttattttcc ggatctcagt gagtttatgg caggttataa tgcggtaacg 3780
 gcagaatata agcatgatac cagattgttt ccgcagggaa atttaccgga gaatcacctg 3840
 aatataatcat cattaccgtg ggtgagtttt gacgggattt aacctgaaca tcaccggaaa 3900
 tgatgattat tttgccccgg tttttacgat ggcaaagttt cagcaggaag gtgaccgcgt 3960
 attattacct gtttctgtac aggttcatca tgcagtctgt gatggctttc atgcagcacg 4020
 gtttattaat acaactcagc tgatgtgtga taacatactg aaataaatta attaattctg 4080
 tatttaagcc accgtatccg gcaggaatgg tggctttttt tttatatttt aaccgtaatc 4140
 tgaatttcg tttcagactg gttcaggatg agctcgcttg gactcctggt gatagatcca 4200
 gtaatgacct cagaactcca tctggatttg ttcagaacgc tcggttgccg ccgggcgctt 4260
 tttattgggt agaatccaag cactagcggc gcgcgggccg gcccggtgtg aaataccgca 4320
 cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc 4380
 gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct caactcaaagg cggtaatacg 4440
 gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa 4500
 ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga 4560
 cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag 4620
 ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctggtccga ccctgccgct 4680
 taccggatac ctgtccgctt ttctccctc gggaaagcgtg gcgctttctc atagctcacg 4740
 ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc 4800
 cccggttcag cccgaccgct gcgccttato cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt 4860
 aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta 4920
 tgtagccggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac 4980
 agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc 5040
 ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat 5100
 tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc 5160
 tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt 5220
 cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgccatcgg cattttcttt tgcgttttta 5280
 tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct ttgacaacag atgttttctt 5340
 gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat tgtttgtctg cgtagaatcc 5400
 tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct ttcgcttgag gtacagcgaa 5460
 gtgtgagtaa gtaaaggtta catcgtagg atcaagatcc atttttaaca caaggccagt 5520
 tttgttcagc ggcttgatg gccagttaa agaattagaa acataacca gcatgtaaat 5580
 atcgtagac gtaatgccgt caatcgctat ttttgatccg cgggagtcag tgaacaggt 5640

ES 2 702 930 T3

ccatttgccg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt tcatctgta ctgtgtaga 5700
 tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtaatca tcgttttagct caatcatacc 5760
 gagagcgcg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg ctttgcagaa gtttttgact 5820
 ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct ttgttaaata aagattcttc 5880
 gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaat actaagtatt tgtggccttt 5940
 atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgtcg cctgagctgt agttgccttc 6000
 atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt ttttccgtca ccgtcaaaga ttgatttata 6060
 atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct gatacgttaa cttgtgcagt 6120
 tgtcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca gtgtagaata aacggatttt 6180
 tcogtcagat gtaaatgtgg ctgaacctga ccattcttgt gtttggcttt ttaggataga 6240
 atcatttga tcgaatttgt cgtctcttt aaagacggcg ccagcgtttt ccagctgtc 6300
 aatagaagtt tcgccgactt tttgatagaa catgtaaata gatgtgtcat ccgcattttt 6360
 aggatctccg gctaatagcaa agacgatgtg gtagccgtga tagtttgcca cagtgccgtc 6420
 agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct tttgcagaag agatattttt 6480
 aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca tttttttgct gttcagggat 6540
 ttgcagcata tcattggcgtg taatatggga aatgcogtat gtttccttat atggcttttg 6600
 gttcgtttct ttgcgaaacg cttgagttgc gcctcctgcc agcagtgcgg tagtaaaggt 6660
 taatactgtt gottgttttg caaacctttt gatgttcata gttcatgtct ccttttttat 6720
 gtactgtgtt agcggctctgc ttcttccagc cctcctgttt gaagatggca agttagttac 6780
 gcacaataaa aaaagaccta aatatgtaa ggggtgacgc caaagtatac actttgcctt 6840
 ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac ccgcgcgatt tacttttcca 6900
 cctcattcta ttagactctc gtttggattg caactggctct attttcctct tttgtttgat 6960
 agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga actaaaaaat ctatctgttt 7020
 cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcattg gcataaagtt gcctttttaa 7080
 tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa taatagtga cggcaggtat 7140
 atgtgatggg ttaaaaagga tcggcggccg ctcgatttaa atc 7183

<210> 8
 <211> 7300
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia nucleotídica completa del plásmido pSacB_wcaJ

10

<400> 8

ES 2 702 930 T3

tcgagtaagc cgattcagct gatccgccac atggggaaaa agcctaactc goggaatatg 60
 aaaccgatac cagtccagta aagttgacaa atcgacatca tattgctcaa ccaagtattg 120
 aaaagcgttt tcaccgcat gatacaatc gaccagccgg ttaaataacg tttcactccg 180
 ttccggtgcc aaacgagacg caatatgctt ataggcggaa tacagaaaat cgatttccgc 240
 ataaagcgta tcgtccaaat ctaaaaccaa cgctttatct ttcataatga tgagccagta 300
 cttccgctgc ataccgcaac attaataaat ccgcttccca gtcttcgaac gcaggaatcg 360
 gctgattaaa caaatattcc tgaatcaacc aacggggata attggctccc gccagataac 420
 tcaacggata accgcccgcg aacctagggg taatttcaat accaagaatt tcagcgggtg 480
 attccttata aaatacttgg attgttaagc aaccgcgcgc ccccggtaaa cgggacaatt 540
 tttccgataa ttgctcacg atggcatttt ttctggctac acctttgtta atttcccccg 600
 ctctgacaaa aattctcttt ctcggtaccg cacttttcag ttoggaattt ttatcaaaat 660
 aacaatccac ggtatattcg tcgtattccg ccggcgaaat atattgcata aacattaatt 720
 cgggattttc caattgctcc ggtgaaatat ctccgggttt ctccgccaca aaaattcctt 780
 tacttaaaat accgttgtaa ggcttcacaa aaacaggata ttcaaattga ctttttcaa 840
 actgctcggg taccgcaata ttatgttcaa taaacagttg attggttaat cgtttgcgc 900
 gacattttct gacaaactct gtatcaacta cggaaataaa aatacctttt tctttaaac 960
 gttgcagatg ttcgcttaa ataaagcaatt ccgtatcaat agtcggaata atcaatttca 1020
 cgttattttc ttcacagatt ttaagtaagg tcggaatata ctccgcatca gtgaccggg 1080
 gtacaggaaa atgtccgtcg gccacataac aagccggcgc caactcggga tttaaatcta 1140
 cggttaacac ttttccgtca cttactaact gcgataattc ctttttaaac gcctgaacga 1200
 gagaaacacg ttgtccggcc gatgtaacaa gaatattcat gattttttat tcccttcaaa 1260
 tttaggcatg gtggcatcat ctgccgatt aatatcgtct tttgcatca ctttttggat 1320
 ggtctttgcg ataattttca aatccagcca caaggattga tgttcaacat accaggcatc 1380
 caattcaaat ttctgctccc aactgatggc attgcgaccg tttacctgtg cataaccggt 1440
 aattccgggt ttcacttcat ggcgcttagc ctgtctttcg ttatacagcg gcaaatattc 1500
 catcacacaa acaaatataa gggcgaaaac aaaatcaatg ctatcaatgc gacaacaata 1560
 tcgaaaaggc gttttatcat gaaaatctcc tacgaccgac caatttgggg ctgacaaaag 1620
 tgccgttttt caccagaacc gtataaacta aaaccaggaa aagcggatac cagactaacg 1680
 gcagttttaa tatggaagac ggcacccaaa cgatccaaca aaaattaata aaaataaata 1740
 aaataaatat acgttctttc cacgccaaca attgggtatt catcacatag ataattgaat 1800
 ttaataaaaa atatataaat gccaaaaatg caaaaatgcc aatgccaaa taaagttcta 1860
 taaagaagct atgoggatta gtgtaacca aagggaaact taactttatt tgatcgaat 1920

ES 2 702 930 T3

actgaatgta gtcccgcggt ccataaccba accataaaat tttaaaatta tctaaaaatg 1980
 togtataaat ttccgtccgg taacctacgg acttatcatc gcccatagaa aatattacca 2040
 atgaaaaacg ttcaatcggg cgctccagcc aatcaatfff ggcgagcaga ataaacactt 2100
 cctgtaacca agaaagatta aatataaata atgcgatcac gcaggcgaaa aacagatata 2160
 cgccttaaa ataggttagat gcgtttaaaa acaagatcag catcaacata atcaaatagc 2220
 tcagtaatac cgaacgggag gcaactgatca caatagctaa ccccataata aaaataagag 2280
 catagccgat taacttaatt ttocagttgt tttctctgat gatgtaaaaa aatcccaccg 2340
 ccaccgcaag agaaatcata attacggact ggtcattggg attaaagaaa aaacotttaa 2400
 acgccttate agttacgggt aattcttcat taccggaaac caactggaac cccaataaag 2460
 cctcaataaa aaagcccggc agcacaatta atgatattcc caacaaaagg tgcoctaate 2520
 ctgcttctcc atcaccggcg ttaaactgca aaaaagaata atgaaataaa aacatcacia 2580
 ttccgaagaa aaacaaatca actaattfff ctgtagaaaa cgcatttaat accgataaaa 2640
 agccgaagaa aaacaacacg tacaccggaa actgtaattt aaaaaaatca gtttccatat 2700
 cccttaaaaa aggggttatt accgctaaga aaaagaacia aaacacacac gcaactatcta 2760
 aacctggcac tcctatttgt gtogatagtg cgggagaaaag tatcaccagt cccaaogcaa 2820
 agagtaatag caacttaaaa atgctgataa cattaatatt catatcaaat aatatttttg 2880
 attaatttct caatttcttt ataagaacgc togcgagaa acttctcttt tgccagcgat 2940
 aaattcactt gcgacatttt gtotaaaacc gttctgtctt cggccaattt attcaacgtc 3000
 tcagccaact cccgataatc tcccgccgta tattgaattc caccgccttt cgcagtagt 3060
 ttttccactt caggatgttt ctgacagctt acaatcggta atgcgcaaca gatataatcg 3120
 gatctagact ccataggccg ctttcctggc tttgcttcca gatgtatgct ctocctcggg 3180
 gagtaccgtg actttatttt cggcaciaat acaggggtcg atggataaat acggcgatag 3240
 tttcctgacg gatgatccgt atgtaccggc ggaagacaag ctgcaaacct gtcagatgga 3300
 gattgattta atggcggatg tgctgagagc accgccccgt gaatccgcag aactgatccg 3360
 ctatgtgttt gcggatgatt ggccgggata aataaagccg ggcttaatac agattaagcc 3420
 cgtatagggt attattactg aataccaaac agcttacgga ggacggaatg ttaccattg 3480
 agacaaccag actgccttct gattattaat atttttcact attaatacaga aggaataacc 3540
 atgaatttta cccggattga cctgaatacc tggaaatgca gggaaacact tgccotttat 3600
 cgtcagcaga ttaaatgcgg attcagcctg accaccaaac tcgatattac cgttttgcgt 3660
 accgcactgg cggagacagg ttataagttt taccgctga tgatttacct gatctccgg 3720
 gctgttaate agtttccgga gttccggatg gcaactgaaag acaatgaact tatttactgg 3780

ES 2 702 930 T3

gaccagtcag acccggctctt tactgtcttt cataaagaaa cggaaacatt ctctgcactg 3840
tcctgcccgtt attttccgga tctcagtgag tttatggcag gttataatgc ggtaacggca 3900
gaatatcagc atgataccag attgtttccg cagggaaatt taccggagaa tcacctgaat 3960
atatcatcat taccgtgggt gagttttgac gggatttaac ctgaacatca cgggaaatga 4020
tgattatfff gccccggttt ttacgatggc aaagtttcag caggaaggtg accgcgtatt 4080
attacctggt tctgtacagg ttcacatgac agtctgtgat ggctttcatg cagcacgggt 4140
tattaataca cttcagctga tgtgtgataa catactgaaa taaattaatt aattctgtat 4200
ttaagccacc gtatccggca ggaatgggtg cttttttttt atattttaac cgtaatctgt 4260
aatttcgttt cagactgggt caggatgagc tcgcttggac tcctgttgat agatccagta 4320
atgacctcag aactccatct ggatttggtc agaacgctcg gttgccgccg ggcgtttttt 4380
attggtgaga atccaagcac tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaaa taccgcacag 4440
atgctgtaag agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgtca ctgactcgtc 4500
gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt 4560
atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc 4620
caggaaccgt aaaaaggccc cggtgctggc gtttttccat aggcctccgcc cccctgacga 4680
gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata 4740
ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgcgcttac 4800
cggataactg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg 4860
taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc 4920
cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccgtaag 4980
acacgactta tcgccactgg cagcagccac tgtaaacagg attagcagag cgaggtatgt 5040
aggcgggtgt acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt 5100
atitggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg 5160
atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgaagc agcagattac 5220
gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca 5280
gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac 5340
ctagatcctt ttaaaggccc gcgcgggccg ccacggcat tttcttttgc gtttttattt 5400
gttaactggt aattgtcctt gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgc 5460
tttgatgttc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct 5520
gtttgtcata tagcttgtaa tcacgacatt gtttcccttc gcttgaggta cagcgaagtg 5580
tgagtaagta aaggttacat cgtaggatc aagatccatt ttaacacaa ggccagtttt 5640
gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatatc 5700

ES 2 702 930 T3

gttagacgta atgccgtcaa togtcatttt tgatccgctg gagtcagtga acaggtacca 5760
 tttgccgttc attttaaaga cgttcgctgc ttcaatttca tctgttactg tgttagatgc 5820
 aatcagcggg ttcactcactt ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag 5880
 agcgcctgtt gctaactcag ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc 5940
 ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc 6000
 ttggtagcca tcttcagttc cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc 6060
 ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtatg gttgtgcctt gagctgtagt tgccttcctc 6120
 gatgaactgc tgtacatttt gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc 6180
 ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt 6240
 cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc 6300
 gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttcttgtgtt tggcttttta ggatagaatc 6360
 atttgcacog aatttgtcgc tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat 6420
 agaagtttgc ccgacttttt gatagaacat gtaaatogat gtgtcatccg catttttagg 6480
 atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc 6540
 gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat 6600
 tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata tttttcattt ttttctgtt cagggatttg 6660
 cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt 6720
 cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc tctgccagc agtgcggtag taaaggtaa 6780
 tactgttgct tgttttgcaa actttttgat gttcatogtt catgtctcct tttttatgta 6840
 ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagcctt cctgtttgaa gatggcaagt tagttaogca 6900
 caataaaaaa agacctaaaa tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacaact ttgcccttta 6960
 cacattttag gtcttgctg ctttatcagt aacaaaccg cgcgatttac ttttcgacct 7020
 cattctatta gactctcgtt tggattgcaa ctggtotatt ttctctttt gtttgataga 7080
 aatcataaaa aggatttga gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt 7140
 ttcattctct gtatttttta tagtttctgt tgcacgggca taaagttgcc tttttaatca 7200
 caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg 7260
 tgatgggtta aaaaggatcg gggccgctc gatttaaatc 7300

<210> 9
 <211> 7161
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia nucleotídica completa del plásmido pSacB_pflD

10

<400> 9

ES 2 702 930 T3

tcgagaggcc tgacgtcggg ccoggtacca cgcgtcatat gactagtctg gacctagggg 60
 tgggatcgag ctcttttctt tgccgacaag gcggaagctt taggggaaat tcccgtaggt 120
 gccgtattgg tggatgaacg gggcaatata attggtgaag gctggaacct ctctattgtg 180
 aactcggatc ccaccgccc tgcgaaatt attgcgttgc gtaacgccc gcagaaaatc 240
 caaaattacc gcctgctcaa taccacttta tacgtgactt tagaacctg caccatgtgc 300
 gccggcgcga ttttacacag ccgaatcaaa cgtttggtat tcggggcgtc cgattacaaa 360
 accggtgccc tgggttccag atttcatttt ttgaggatt ataaaatgaa tcatggggtt 420
 gagatcacia gcggtgtctt ataggatcaa tgcagtcaga agttaagccg ctttttccaa 480
 aagcgcaggg aacagaaaa acaacaaaa gctaccgcac tttacaaca cccccgctt 540
 aactcctctg aaaaatagtg acaaaaaaac cgtcataatg tttacgacgg tttttttatt 600
 tcttctaata tgtcacatta agcccgtagc ctgcaagcaa ccccttaaca tgctcatta 660
 attcttttgt cggcggtttt acatcttcaa gctcgtattt atcgccgagt acttcccatt 720
 tatgggcgcc tagacggtga taaggaata attccacttt ttcgatattc ttcatatctt 780
 taatgaaatt cccagcatg tgcaaatctt cgtcactatc tgtataacc cgcactaaa 840
 catggcggat ccaggtacgc tgatttcgat ccgctaaata ttttgcgaat tcgagcactc 900
 ttttattcgg cagccaatc aggctttcgt gaaccgctt attcatttct ttcaggtaaa 960
 gcaacacaag atccgtgtca tcaatcaatt catcaataat atgatcatga tgacggacga 1020
 aaccgttgtt atccaagcaa gtattaatc cttctttatg gcaggtctg aaccagtccc 1080
 gtacaaatc cgcctgtaa atagcttcac cgcgggaagc ggtaactccg ccgcccagg 1140
 cgttcataaa atggcgatag gtcaccactt ctttcattaa ttcttcaacg gaaatttctt 1200
 tacgcccgtg caaatcccag gtgtctctgt tatggcaata tttacaacgc attaagcagc 1260
 cttgtaaaaa taaaataaag cggattcccg gcccgtaac tgtcccgcag gtttcaaatg 1320
 aatgaattcg tctaaaacc gacataatat gcccttaaat aatcaacaaa atatagcaag 1380
 aagattatag caaagaatct cgttttttct agagaatagt caaatcttgc caaaaaacta 1440
 ccgactttt atccgctta atcaggggaa ttaaaacaaa aaaattccc cttattgagc 1500
 ggaatttatt aagcaataag acaactctc aattttaata cttccttctt ttctagtatt 1560
 gataagattg aaacctgca aggatgacgg cggatttgcc gtcactctca cccaactaat 1620
 gtggacgact ggtaaaccat tgcattagac caatgcaaac accaccaccg acgatgttac 1680
 ctaaagtaac aggaattaaa ttttaatta ctaaaggtta catatctaaa tttgcaact 1740
 gctcggcatt taaccogtt gcctgccaga attccggcga tgcgaaatct gcaattacca 1800
 tgccataggt gatcataaac atatttgcta cgcagtgctc aaagcctgaa gcgacaaaya 1860

ES 2 702 930 T3

acccgatogg caggatcata ataaaagctt tatcogttag agtyttgccg gcataggcca 1920
 tccaaacggc aatacatacc ataatgttgc aaagaatacc taaacagaag gcttcaaycc 1980
 aggtatgttc tattttatgt tgtgccgtat ttaaaatggt taatccccac tgaccgtttg 2040
 ccgccatgat ctgaccggaa aaccaaatta atgcaacaat aaataaacgg ccgacaaaat 2100
 tacogaarta aaccacaatc cagttacgta acatctgaat tgttgtaatt ttactotcaa 2160
 agcgggcaat agtcgataaa gttgatgaag taaatagttc acagccgcaa accgccacca 2220
 taattacccc gagagagaac accaaaccgc cgaccagttt agttaatccc caaggcgctc 2280
 ccgcagaggc tgtttgagtt gttgtataaa aaacgaatgc aagagcaata aacataccgg 2340
 cagagatcgc cgataaaaat gaataggctt gttttttcgt agctttataa acgccgacgt 2400
 ctaaccocgg ttagccatc tcggttggcg aagccatcca agccaattta aaatcttccg 2460
 atttcattga gctttcctta gtaataaaac tactcggaaa tgagtagaac tgccttaaag 2520
 cataaatgat agattaaaaa atccaaaatt gttgaatatt atttaacggg gggattataa 2580
 aagattcata aattagataa tagctaattt gagtgatcca tatcaccttt tacagatttt 2640
 ttgacctaaa tcaaaattac ccaaatagag taataatacc attataaagg gtgtggattt 2700
 attcctttgg tttacgagat aaattgctat ttaagctgat ttctgataaa aagtgggta 2760
 gatttttccc aaaaataagg aaacacaaaa tggcagaaga aacaattttc agtaaaatta 2820
 ttcgtaaaga aattcccgcc gacattatat atcaagacga tcttgtcacc gcatttcgcg 2880
 atattgoccc gcaggcaaaa actcatattt taattattcc gaataaattg attccgacag 2940
 taaacgaogt aaccgcccac cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 3000
 atcctctaga ctttgcttcc agatgtatgc tctcctccgg agagtaccgt gactttattt 3060
 toggcacaaa tacaggggtc gatggataaa tacggcgata gtttcctgac ggatgatccg 3120
 tatgtaccgg cggaagacaa gctgcaaacc tgtcagatgg agattgattt aatggcggat 3180
 gtgctgagag caccgccccg tgaatccgca gaactgatcc gctatgtgtt tgcggatgat 3240
 tggccggaat aaataaagcc gggcttaata cagattaagc ccgtataggg tattattact 3300
 gaataccaaa cagcttacgg aggacggaat gttaccatt gagacaacca gactgccttc 3360
 tgattattaa tatttttcaac tattaatcag aaggaataac catgaatttt acccggattg 3420
 acctgaatac ctggaatcgc agggaacact ttgcccttta tcgtcagcag attaaatgcg 3480
 gattcagcct gaccaccaaa ctcgatatta ccgctttgcg taccgcaactg gcggagacag 3540
 gttataagtt ttatccgctg atgatttacc tgatctcccg ggctgtaat cagtttccgg 3600
 agttccggat ggcaactgaaa gacaatgaac ttatttactg ggaccagtca gaccgggtct 3660
 ttactgtctt tcataaagaa accgaacat tctctgcact gtccctgcgt tattttccgg 3720

ES 2 702 930 T3

atctcagtga gtttatggca ggttataatg cggtaacggc agaatatcag catgatacca 3780
 gattgtttcc gcagggaaat ttaccggaga atcacctgaa tatatcatca ttaccgtggg 3840
 tgagttttga cgggatttaa cctgaacatc accggaaatg atgattatft tgccccggtt 3900
 ttacgatgg caaagtttca gcaggaaggt gaccgcgtat tattacctgt ttctgtacag 3960
 gtcatcatg cagtctgtga tggctttcat gcagcacggg ttattaatac acttcagctg 4020
 atgtgtgata acatactgaa ataaattaat taattctgta ttttaagccac cgtatccggc 4080
 aggaatggtg gctttttttt tatattttta ccgtaatctg taatttcggt tcagactggt 4140
 tcaggatgag ctgcttggga ctctgttga tagatccagt aatgacctca gaactccatc 4200
 tggatttggt cagaacgctc ggttgccgcc gggcgttttt tattggtgag aatccaagca 4260
 ctacgggcgc gccggccggc ccggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 4320
 cgcacaggc gctcttccgc ttctctgctc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg 4380
 cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat 4440
 aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 4500
 gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia aatcgacgc 4560
 tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga 4620
 agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgcccgtta ccggatacct gtcgcccctt 4680
 ctcccttogg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 4740
 taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg caogaacccc ccgttcagcc cgaccctgc 4800
 gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccoggtaa gacacgactt atcgccactg 4860
 gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtc tacagagttc 4920
 ttgaagtggg gccctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 4980
 ctgaagccag ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 5040
 gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 5100
 caagaagatc cttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 5160
 taagggatft tggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaaggcc 5220
 ggccgoggcc gccatcggca ttttcttttg cgtttttatt tgttaactgt taattgtcct 5280
 tgttcaagga tgctgtcttt gacaacagat gttttcttgc ctttgatggt cagcaggaag 5340
 ctccggcga aacgttgattg tttgtctgcg tagaatcctc tgtttgtcat atagcttgta 5400
 atcacgacat tgtttccttt cgcttgaggt acagcgaagt gtgagtaagt aaaggttaca 5460
 tcgttaggat caagatccat ttttaacaca aggcagttt tgttcagcgg cttgtatggg 5520
 ccagttaaag aattagaaac ataaccaagc atgtaaatat cgttagacgt aatgccgtca 5580
 atcgtcattt ttgatccgcg ggagtcagtg aacaggtacc atttgocgtt cattttaaag 5640

ES 2 702 930 T3

```

acgttcgogc gttcaatttc atctgttact gtgtagatg caatcagogg tttcatcact 5700
tttttcagtg tgtaatcatc gtttagctca atcataccga gagcgccggt tgctaactca 5760
gocgtgocgt ttttatogct ttgcagaagt ttttgacttt cttgacggaa gaatgatgtg 5820
cttttgccat agtatgcttt gttaaataaa gattcttgc cttggtagcc atcttcagtt 5880
ccagtgtttg cttcaaatac taagtatttg tggcctttat cttctacgta gtgaggatct 5940
ctcagcgtat ggttgtcgcc tgagctgtag ttgccttcat cgatgaactg ctgtacattt 6000
tgatacgttt ttccgtcacc gtcaaagatt gatttataat cctctacacc gttgatgttc 6060
aaagagctgt ctgatgctga tacgttaact tgtgcagttg tcagtgtttg tttgocgtaa 6120
tgtttacogg agaaatcagt gtagaataaa cggatttttc cgtcagatgt aaatgtggct 6180
gaacctgacc attcttgtgt ttggtctttt aggatagaat catttgcac gaatttgtcg 6240
ctgtctttaa agacgcggcc agcgtttttc cagctgtcaa tagaagtttc gccgactttt 6300
tgatagaaca tgtaaatcga tgtgtcatcc gcatttttag gatctcoggc taatgcaaag 6360
acgatgtggg agccgtgata gtttgcgaca gtgccgctcag cgttttgtaa tggccagctg 6420
tccaaaocgt ccaggccttt tgcagaagag atatttttaa ttgtggacga atcaaattca 6480
gaaacttgat attttccatt tttttgctgt tcagggattt gcagcatatc atggcgtgta 6540
atatgggaaa tgccgtatgt ttccctatat ggtttttggg tcgtttcttt cgcaaocgct 6600
tgagttgocg ctccctgccag cagtgcggta gtaaaggtta atactgttgc ttgttttgca 6660
aactttttga tgttcatcgt tcatgtctcc ttttttatgt actgtgttag cggctctgctt 6720
cttccagccc tccgttttga agatggcaag ttagttacgc acaataaaaa aagacctaaa 6780
atatgtaagg ggtgacgcca aagtatacac tttgcccttt acacatttta ggtcttgcct 6840
gctttatcag taacaaaccg gogcgattta cttttcgacc tcattctatt agactctcgt 6900
ttggattgca actggtctat tttcctcttt tgtttgatag aaaatcataa aaggatttgc 6960
agactacogg cctaaagaac taaaaaatct atctgtttct tttcattctc tgtatttttt 7020
atagtttctg ttgcatgggc ataaagttgc ctttttaate acaattcaga aaatatcata 7080
atatctcatt tcactaaata atagtgaacg gcaggtatat gtgatgggtt aaaaaggatc 7140
ggcggccgct cgatttaaat c 7161

```

- <210> 10
- <211> 1029
- <212> ADN
- <213> *Basfia succiniciproducens*

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <223> secuencia nucleotídica del gen ldhA de la cepa DD1

- <400> 10

ES 2 702 930 T3

```

ttgacaaaat cagtatgttt aaataaggag ctaactatga aagttgcoct ttacagtact      60
aaaaattatg atcgcaaaca tctggatttg gogaataaaa aatttaattt tgagcttcat      120
ttctttgatt ttttacttga tgaacaaacc gcgaaaatgg cggagggcgc cgatgccgtc      180
tgtattttcg tcaatgatga tgcgagccgc ccggtgttaa caaagttggc gcaaatcgga      240
gtgaaaatta tcgctttacg ttgtgccogt ttttaataat tggatttggg ggcggcaaaa      300
gagctgggat taaaagtcgt acgggtgcct gcgtattcgc cggaaagcgt tgccgagcat      360
gcgatcggat taatgctgac tttaaaccgc cgtatccata aggcttatca gcgtaccgc      420
gatgcgaatt tttctctgga aggattggtc ggttttaata tgttcggcaa aaccgcgga      480
gtgattggta cgggaaaaat cggcttggcg gctattcgca ttttaaaagg cttcggtatg      540
gaogttctgg cgtttgatcc ttttaaaaat ccggcggcgg aagcgttggg cgcaaaatat      600
gtcggtttag acgagcttta tgcaaaatcc catgttatca ctttgcattg cccggtacg      660
goggataaatt atcatttatt aaatgaagcg gcttttaata aaatgocgga cgggtgaaatg      720
attattaata ccagccgcgg cgttttaatt gacagccggg cggcaatcga agcgttaaaa      780
cggcagaaaa tcggcgctot cggtatggat gtttatgaaa atgaacggga tttgtttttc      840
gaggataaat ctaacgatgt tattacggat gatgtattcc gtcgcctttc ttctgtcat      900
aatgtgcttt ttaccggcca tcaggcgttt ttaacggaag aagcgtgaa taatatcgcc      960
gatgtgactt tatcgaatat tcaggcgttt tccaaaaatg caacgtgca aatagcgtt     1020
gaaggctaa                                     1029

```

<210> 11
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> *Basfia succiniciproducens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> secuencia de aminoácidos de la LdhA de la cepa DD1

<400> 11

```

Met Thr Lys Ser Val Cys Leu Asn Lys Glu Leu Thr Met Lys Val Ala
 1                               5                               10                               15

Val Tyr Ser Thr Lys Asn Tyr Asp Arg Lys His Leu Asp Leu Ala Asn
 20                               25                               30

Lys Lys Phe Asn Phe Glu Leu His Phe Phe Asp Phe Leu Leu Asp Glu
 35                               40                               45

```

ES 2 702 930 T3

Gln Thr Ala Lys Met Ala Glu Gly Ala Asp Ala Val Cys Ile Phe Val
50 55 60

Asn Asp Asp Ala Ser Arg Pro Val Leu Thr Lys Leu Ala Gln Ile Gly
65 70 75 80

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

Glu Ala Ala Lys Glu Leu Gly Leu Lys Val Val Arg Val Pro Ala Tyr
100 105 110

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

Asn Arg Arg Ile His Lys Ala Tyr Gln Arg Thr Arg Asp Ala Asn Phe
130 135 140

Ser Leu Glu Gly Leu Val Gly Phe Asn Met Phe Gly Lys Thr Ala Gly
145 150 155 160

Val Ile Gly Thr Gly Lys Ile Gly Leu Ala Ala Ile Arg Ile Leu Lys
165 170 175

Gly Phe Gly Met Asp Val Leu Ala Phe Asp Pro Phe Lys Asn Pro Ala
180 185 190

Ala Glu Ala Leu Gly Ala Lys Tyr Val Gly Leu Asp Glu Leu Tyr Ala
195 200 205

Lys Ser His Val Ile Thr Leu His Cys Pro Ala Thr Ala Asp Asn Tyr
210 215 220

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

Ile Ile Asn Thr Ser Arg Gly Val Leu Ile Asp Ser Arg Ala Ala Ile
245 250 255

Glu Ala Leu Lys Arg Gln Lys Ile Gly Ala Leu Gly Met Asp Val Tyr
260 265 270

Glu Asn Glu Arg Asp Leu Phe Phe Glu Asp Lys Ser Asn Asp Val Ile
275 280 285

Thr Asp Asp Val Phe Arg Arg Leu Ser Ser Cys His Asn Val Leu Phe
290 295 300

ES 2 702 930 T3

Thr Gly His Gln Ala Phe Leu Thr Glu Glu Ala Leu Asn Asn Ile Ala
305 310 315 320

Asp Val Thr Leu Ser Asn Ile Gln Ala Val Ser Lys Asn Ala Thr Cys
325 330 335

Glu Asn Ser Val Glu Gly
340

5 <210> 12
<211> 741
<212> ADN
<213> *Basfia succiniciproducens*

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> secuencia nucleotídica del gen pflA de la cepa DD1

<400> 12

```

atgtcgggtt taggacgaat tcattcattt gaaacctgcg ggacagttga cgggccggga      60
atccgcttta ttttattttt acaaggctgc ttaatgcggt gtaaatactg ccataataga      120
gacacctggg atttgcacgg cggtaaagaa atttcogttg aagaattaat gaaagaagtg      180
gtgacctatc gccattttat gaacgcctcg ggcggcggag ttaccgcttc cggcggtgaa      240
gctattttac aggcggaatt tgtacgggac tggttcagag cctgccataa agaaggaatt      300
aatacttgct tggataccaa cggtttcgtc cgtcatcatg atcatattat tgatgaattg      360
attgatgaca cggatcttgt gttgcttgac ctgaaagaaa tgaatgaacg ggttcacgaa      420
agcctgattg gcggtccgaa taaaagagtg ctcgaaatcg caaaatattt agcggatcga      480
aatcagcgtg cctggatccg ccatgttgta gtgccgggtt atacagatag tgacgaagat      540
ttgcacatgc tggggaattt cattaagat atgaagaata tcgaaaaagt ggaattatta      600
ccttatcacc gtctagggcg ccataaatgg gaagtactcg gcgataaata cgagcttgaa      660
gatgtaaac cgccgacaaa agaattaatg gagcatgta aggggttgct tgcaggctac      720
gggcttaatg tgacatatta g                                             741

```

15 <210> 13
<211> 246
<212> PRT
<213> *Basfia succiniciproducens*

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> secuencia de aminoácidos de la PflA de la cepa DD1

25 <400> 13

ES 2 702 930 T3

Met Ser Val Leu Gly Arg Ile His Ser Phe Glu Thr Cys Gly Thr Val
 1 5 10 15

Asp Gly Pro Gly Ile Arg Phe Ile Leu Phe Leu Gln Gly Cys Leu Met
 20 25 30

Arg Cys Lys Tyr Cys His Asn Arg Asp Thr Trp Asp Leu His Gly Gly
 35 40 45

Lys Glu Ile Ser Val Glu Glu Leu Met Lys Glu Val Val Thr Tyr Arg
 50 55 60

His Phe Met Asn Ala Ser Gly Gly Gly Val Thr Ala Ser Gly Gly Glu
 65 70 75 80

Ala Ile Leu Gln Ala Glu Phe Val Arg Asp Trp Phe Arg Ala Cys His
 85 90 95

Lys Glu Gly Ile Asn Thr Cys Leu Asp Thr Asn Gly Phe Val Arg His
 100 105 110

His Asp His Ile Ile Asp Glu Leu Ile Asp Asp Thr Asp Leu Val Leu
 115 120 125

Leu Asp Leu Lys Glu Met Asn Glu Arg Val His Glu Ser Leu Ile Gly
 130 135 140

Val Pro Asn Lys Arg Val Leu Glu Phe Ala Lys Tyr Leu Ala Asp Arg
 145 150 155 160

Asn Gln Arg Thr Trp Ile Arg His Val Val Val Pro Gly Tyr Thr Asp
 165 170 175

Ser Asp Glu Asp Leu His Met Leu Gly Asn Phe Ile Lys Asp Met Lys
 180 185 190

Asn Ile Glu Lys Val Glu Leu Leu Pro Tyr His Arg Leu Gly Ala His
 195 200 205

Lys Trp Glu Val Leu Gly Asp Lys Tyr Glu Leu Glu Asp Val Lys Pro
 210 215 220

Pro Thr Lys Glu Leu Met Glu His Val Lys Gly Leu Leu Ala Gly Tyr
 225 230 235 240

Gly Leu Asn Val Thr Tyr
 245

<210> 14
 <211> 2313
 <212> ADN

ES 2 702 930 T3

<213> *Basfia succiniciproducens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <223> secuencia nucleotídica del gen pflD de la cepa DD1

<400> 14

```

atggctgaat taacagaagc tcaaaaaaaaa gcatgggaag gattcgttcc cggatgaatgg      60
caaaacggcg taaatttacg tgactttatc caaaaaaact atactccgta tgaagggtgac     120
gaatcattct tagctgatgc gactcctgca accagcaggt tgtggaacag cgtgatggaa     180
ggcatcaaaa tcgaaaacaa aactcacgca cctttagatt tcgacgaaca tactccgtca     240
actatcactt ctcaacaagcc tggttatata aataaagatt tagaaaaaat cgttggtctt     300
caaacagacg ctocgttaaa acgtgcaatt atgccgtaag gcggtatcaa aatgatcaaa     360
ggttcttgcg aagtttacgg tcgtaaatta gatccgcaag tagaatttat tttaccgaa     420
tatcgtaaaa cccataacca aggcgtattc gacgtttata cgccggatat tttacgctgc     480
cgtaaatcag gcgtgttaac cggtttaccg gatgcttacg gtcgtggtcg tattatcggg     540
gactaccgtc gtttagcggg atacggtatt gattacctga tgaagataa aaaagcccaa     600
ttcgattcat tacaaccgcg tttggaagcg ggogaagaca ttcaggcaac tatccaatta     660
cgtgaagaaa ttgccgaaca acaccgcgct ttaggcaaaa tcaaagaat ggcggcatct     720
tacggttacg acatttcggg ccctgcgaca aacgcacagg aagcaatcca atggacatat     780
tttgcttatc tggcagcggg taaatcacia aacggtgagg caatgtcatt cggtcgtacg     840
tctacattct tagatatcta tatcgaacgt gacttaaaac gcggtttaat cactgaacaa     900
cagggcaggg aattaatgga ccacttagta atgaaattac gtatggttcg tttcttacgt     960
acgccggaat acgatcaatt attctcaggg gaccgatgtg gggcaaccga aactatogcc    1020
ggtatgggct tagacgggtg tccggtggta actaaaaaca gcttccgctg attacatact    1080
ttatacacta tgggtacttc tccggaacca aacttaacta ttctttggtc cgaacaatta    1140
cctgaagcgt tcaaacgttt ctgtgcgaaa gtatctattg atacttcctc cgtacaatac    1200
gaaaatgatg acttaatgcg tcctgacttc aacaacgatg actatgcaat cgcgtgctgc    1260
gtatcacoga tggtcgtagg taaacaaatg caattcttcg gtgcgcgcgc aaacttagct    1320
aaaactatgt tatacgcaat taacggcggg atcgatgaga aaaatggtat gcaagtcggg    1380
cctaaaactg cgccgattac agacgaagta ttgaatttcg ataccgtaat cgaacgtatg    1440
gacagtttca tggactgggt ggcgactcaa tatgtaaccg cattgaacat catccacttc    1500
atgcacgata aatatgcata tgaagcggca ttgatggcgt tccacgatcg cgacgtattc    1560

```

ES 2 702 930 T3

```

cgtacaatgg cttgcggtat cgcgggtctt tccgtggctg cggactcatt atccgcaatc 1620
aaatatgcga aagttaaacc gattcgcggc gacatcaaag ataaagacgg taatgtcgtg 1680
gcctcgaatg ttgctatcga cttcgaatg gaaggcgaat atccgcaatt cggtacaat 1740
gatccgcgtg ttgatgattt agcggtagac ttagttgaac gtttcatgaa aaaagttcaa 1800
aaacacaaaa cttaccgcaa cgcaactccg acacaatcta tcttgactat cacttctaac 1860
gtggtatacg gtaagaaaac cggtaatact ccggacggtc gtcgagcagg cgcgccattc 1920
ggaccgggtg caaacccaat gcacggtcgt gaccaaaaag gtgcgggttc ttcacttact 1980
tctgtggcta aacttccgtt cgcttacgag aaagacggta tttcatatac cttctctatc 2040
gtaccgaaag cattaggtaa agatgacgaa gcgcaaaaac gcaaccttgc cggtttaatg 2100
gacggttatt tccatcatga agcgcagtg gaaggcggtc aacacttgaa tgtaacggtt 2160
cttaaccgtg aatgttggtt agacgcgatg gaaaatccgg aaaaataccg gcaattaacc 2220
attcgtgttt caggttacgc ggttcgtttc aactcattaa ctaaagagca acaacaagac 2280
gtcatcactc gtacgtttac acaatcaatg taa 2313

```

5 <210> 15
 <211> 770
 <212> PRT
 <213> *Basfia succiniciproducens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> secuencia de aminoácidos de la PfID de la cepa DD1

<400> 15

```

Met Ala Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Lys Ala Trp Glu Gly Phe Val
1           5           10           15

Pro Gly Glu Trp Gln Asn Gly Val Asn Leu Arg Asp Phe Ile Gln Lys
20           25           30

Asn Tyr Thr Pro Tyr Glu Gly Asp Glu Ser Phe Leu Ala Asp Ala Thr
35           40           45

Pro Ala Thr Ser Glu Leu Trp Asn Ser Val Met Glu Gly Ile Lys Ile
50           55           60

Glu Asn Lys Thr His Ala Pro Leu Asp Phe Asp Glu His Thr Pro Ser
65           70           75           80

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

```

ES 2 702 930 T3

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

Tyr Gly Gly Ile Lys Met Ile Lys Gly Ser Cys Glu Val Tyr Gly Arg
 115 120 125

Lys Leu Asp Pro Gln Val Glu Phe Ile Phe Thr Glu Tyr Arg Lys Thr
 130 135 140

His Asn Gln Gly Val Phe Asp Val Tyr Thr Pro Asp Ile Leu Arg Cys
 145 150 155 160

Arg Lys Ser Gly Val Leu Thr Gly Leu Pro Asp Ala Tyr Gly Arg Gly
 165 170 175

Arg Ile Ile Gly Asp Tyr Arg Arg Leu Ala Val Tyr Gly Ile Asp Tyr
 180 185 190

Leu Met Lys Asp Lys Lys Ala Gln Phe Asp Ser Leu Gln Pro Arg Leu
 195 200 205

Glu Ala Gly Glu Asp Ile Gln Ala Thr Ile Gln Leu Arg Glu Glu Ile
 210 215 220

Ala Glu Gln His Arg Ala Leu Gly Lys Ile Lys Glu Met Ala Ala Ser
 225 230 235 240

Tyr Gly Tyr Asp Ile Ser Gly Pro Ala Thr Asn Ala Gln Glu Ala Ile
 245 250 255

Gln Trp Thr Tyr Phe Ala Tyr Leu Ala Ala Val Lys Ser Gln Asn Gly
 260 265 270

Ala Ala Met Ser Phe Gly Arg Thr Ser Thr Phe Leu Asp Ile Tyr Ile
 275 280 285

Glu Arg Asp Leu Lys Arg Gly Leu Ile Thr Glu Gln Gln Ala Gln Glu
 290 295 300

Leu Met Asp His Leu Val Met Lys Leu Arg Met Val Arg Phe Leu Arg
 305 310 315 320

Thr Pro Glu Tyr Asp Gln Leu Phe Ser Gly Asp Pro Met Trp Ala Thr
 325 330 335

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

ES 2 702 930 T3

Asn Ser Phe Arg Val Leu His Thr Leu Tyr Thr Met Gly Thr Ser Pro
 355 360 365
 Glu Pro Asn Leu Thr Ile Leu Trp Ser Glu Gln Leu Pro Glu Ala Phe
 370 375 380
 Lys Arg Phe Cys Ala Lys Val Ser Ile Asp Thr Ser Ser Val Gln Tyr
 385 390 395 400
 Glu Asn Asp Asp Leu Met Arg Pro Asp Phe Asn Asn Asp Asp Tyr Ala
 405 410 415
 Ile Ala Cys Cys Val Ser Pro Met Val Val Gly Lys Gln Met Gln Phe
 420 425 430
 Phe Gly Ala Arg Ala Asn Leu Ala Lys Thr Met Leu Tyr Ala Ile Asn
 435 440 445
 Gly Gly Ile Asp Glu Lys Asn Gly Met Gln Val Gly Pro Lys Thr Ala
 450 455 460
 Pro Ile Thr Asp Glu Val Leu Asn Phe Asp Thr Val Ile Glu Arg Met
 465 470 475 480
 Asp Ser Phe Met Asp Trp Leu Ala Thr Gln Tyr Val Thr Ala Leu Asn
 485 490 495
 Ile Ile His Phe Met His Asp Lys Tyr Ala Tyr Glu Ala Ala Leu Met
 500 505 510
 Ala Phe His Asp Arg Asp Val Phe Arg Thr Met Ala Cys Gly Ile Ala
 515 520 525
 Gly Leu Ser Val Ala Ala Asp Ser Leu Ser Ala Ile Lys Tyr Ala Lys
 530 535 540
 Val Lys Pro Ile Arg Gly Asp Ile Lys Asp Lys Asp Gly Asn Val Val
 545 550 555 560
 Ala Ser Asn Val Ala Ile Asp Phe Glu Ile Glu Gly Glu Tyr Pro Gln
 565 570 575
 Phe Gly Asn Asn Asp Pro Arg Val Asp Asp Leu Ala Val Asp Leu Val
 580 585 590
 Glu Arg Phe Met Lys Lys Val Gln Lys His Lys Thr Tyr Arg Asn Ala

ES 2 702 930 T3

	595		600		605															
	Thr	Pro	Thr	Gln	Ser	Ile	Leu	Thr	Ile	Thr	Ser	Asn	Val	Val	Tyr	Gly				
	610						615					620								
	Lys	Lys	Thr	Gly	Asn	Thr	Pro	Asp	Gly	Arg	Arg	Ala	Gly	Ala	Pro	Phe				
	625					630					635					640				
	Gly	Pro	Gly	Ala	Asn	Pro	Met	His	Gly	Arg	Asp	Gln	Lys	Gly	Ala	Val				
					645					650					655					
	Ala	Ser	Leu	Thr	Ser	Val	Ala	Lys	Leu	Pro	Phe	Ala	Tyr	Ala	Lys	Asp				
				660					665					670						
	Gly	Ile	Ser	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ile	Val	Pro	Asn	Ala	Leu	Gly	Lys	Asp				
			675					680					685							
	Asp	Glu	Ala	Gln	Lys	Arg	Asn	Leu	Ala	Gly	Leu	Met	Asp	Gly	Tyr	Phe				
	690						695					700								
	His	His	Glu	Ala	Thr	Val	Glu	Gly	Gly	Gln	His	Leu	Asn	Val	Asn	Val				
	705					710					715					720				
	Leu	Asn	Arg	Glu	Met	Leu	Leu	Asp	Ala	Met	Glu	Asn	Pro	Glu	Lys	Tyr				
					725					730					735					
	Pro	Gln	Leu	Thr	Ile	Arg	Val	Ser	Gly	Tyr	Ala	Val	Arg	Phe	Asn	Ser				
				740					745					750						
	Leu	Thr	Lys	Glu	Gln	Gln	Gln	Asp	Val	Ile	Thr	Arg	Thr	Phe	Thr	Gln				
			755					760					765							
	Ser	Met																		
		770																		

- <210> 16
- <211> 601
- 5 <212> ADN
- <213> *Basfia succiniciproducens*
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 10 <223> secuencia nucleotídica del gen wcaJ de la cepa DD1 con inserción de citosina entre los nucleótidos 81 y 82
- <400> 16

ES 2 702 930 T3

atgataaaac gccttttcga tattggtgtc gcattgatag cattgatttt gttttcgccc	60
ttatatttgt ttgtggccta tcaaggtaaa acaaaatttg ggatcacccg tggtatttaa	120
acaaaccgc ccggattgc atggtaaacc ctttgagatg attaagttca gaacaatgaa	180
agacggcgca gatgaaaacg gtaatatttt gccggatgcg gagcgcttaa cacctttcgg	240
caaatggtg cgcgctacca gtctggacga gttgccgaa ctttggaatg tattaaaagg	300
tgatatgagt ctggtggggc cgcgtcctct actgatggaa tatttgccgc tgtataacga	360
aagacaggct aagcgccatg aagtgaaacc cggaattacc ggttatgcac aggtaaacgg	420
tcgcaatgcc atcagttggg agcagaaatt tgaattggat gcctggtatg ttgaacatca	480
atccttgtgg ctggatttga aaattatcgc aaagaccatc caaaaagtga tcgcaaaaga	540
cgatattaat gcggcagatg atgccacat gcctaaattt gaagggaata aaaaatcatg	600
a	601

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo modificado de la familia *Pasteurellaceae* en el cual el gen *wcaJ* se ha deletado o en el cual se ha introducido al menos una mutación en el gen *wcaJ* que conduce a la expresión de una enzima truncada codificada por el gen *wcaJ* en la cual al menos 100 aminoácidos de la enzima de tipo silvestre codificada por el gen *wcaJ* se deletan del extremo C terminal, en el que el gen *wcaJ* comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en:
- ácidos nucleicos que tienen la secuencia nucleotídica de **SEQ ID NO: 3**;
 - ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
 - ácidos nucleicos que son al menos 70 % idénticos al ácido nucleico de a) o b), siendo la identidad la identidad en la longitud total de los ácidos nucleicos de a) o b);
 - ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de a) o b), siendo la identidad la identidad en la longitud total de la secuencia de aminoácidos codificada por los ácidos nucleicos de a) o b),
 - ácidos nucleicos capaces de hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia complementaria de cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con a) o b); y
 - ácidos nucleicos que codifican la misma proteína que cualquiera de los ácidos nucleicos de a) o b), pero que difieren de los ácidos nucleicos de a) o b) anteriores debido a la degeneración del código genético.
2. Microorganismo modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tipo silvestre del que se deriva el microorganismo modificado tiene un ADNr 16S de **SEQ ID NO: 1** o una secuencia, que muestra una homología de secuencia de al menos 96 con la **SEQ ID NO: 1**.
3. Microorganismo modificado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el tipo silvestre del que se deriva el microorganismo modificado pertenece al género *Basfia*.
4. Microorganismo modificado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el tipo silvestre del que se deriva el microorganismo modificado pertenece a la especie *Basfia succiniciproducens*.
5. Microorganismo modificado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el tipo silvestre del que se deriva el microorganismo modificado es la cepa DD1 de *Basfia succiniciproducens* depositada como DSM 18541 en la DSMZ, Alemania.
6. Microorganismo modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo tiene además, en comparación con su tipo silvestre,
- una actividad piruvato formiato liasa reducida,
 - una actividad lactato deshidrogenasa reducida, o
 - una actividad piruvato formiato liasa reducida y una actividad lactato deshidrogenasa reducida.
7. Microorganismo modificado de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el microorganismo comprende:
- una delección del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo, una delección de un elemento regulador del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *ldhA*;
 - una delección del gen *pfID* o al menos una parte del mismo, una delección de un elemento regulador del gen *pfID* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *pfID*;
 - una delección del gen *pfIA* o al menos una parte del mismo, una delección de un elemento regulador del gen *pfIA* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *pfIA*;
 - una delección del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo, una delección de un elemento regulador del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *ldhA* y una delección del gen *pfID* o al menos una parte del mismo, una delección de un elemento regulador del gen *pfID* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *pfID*;
 - o
 - una delección del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo, una delección de un elemento regulador del gen *ldhA* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *ldhA* y una delección del gen *pfIA* o al menos una parte del mismo, una delección de un elemento regulador del gen *pfIA* o al menos una parte del mismo o una introducción de al menos una mutación en el gen *pfIA*.
8. Un procedimiento para producir un compuesto orgánico o un producto orgánico secundario que sea diferente del compuesto orgánico que comprende:
- cultivar el microorganismo modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono asimilable para permitir que el microorganismo modificado produzca el compuesto orgánico, obteniendo así un caldo de fermentación que comprende el compuesto orgánico;

- II) recuperar el compuesto orgánico del caldo de fermentación obtenido en la etapa I) del procedimiento; y opcionalmente
- III) convertir el compuesto orgánico contenido en el caldo de fermentación obtenido en la etapa I) del procedimiento o convertir el compuesto orgánico recuperado obtenido en la etapa II) del procedimiento en un producto orgánico secundario que es diferente del compuesto orgánico en al menos una reacción química
- 5
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el compuesto orgánico es ácido succínico.
10. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en el que la fuente de carbono asimilable se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, maltosa, D-glucosa, glicerol, mezclas de glicerol y D-glucosa, mezclas de glicerol y sacarosa, mezclas de glicerol y D-xilosa, mezclas de glicerol y mezclas de maltosa y D-glucosa y fructosa.
- 10
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que el compuesto orgánico es ácido succínico y en el que el producto orgánico secundario se selecciona del grupo que consiste en ésteres del ácido succínico o polímeros del mismo, tetrahidrofurano (THF), 1,4-butanodiol (BDO), gamma-butirolactona (GBL) y pirrolidonas.
12. Uso de un microorganismo modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la producción fermentativa de un compuesto orgánico.
- 15
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el compuesto orgánico es ácido succínico.

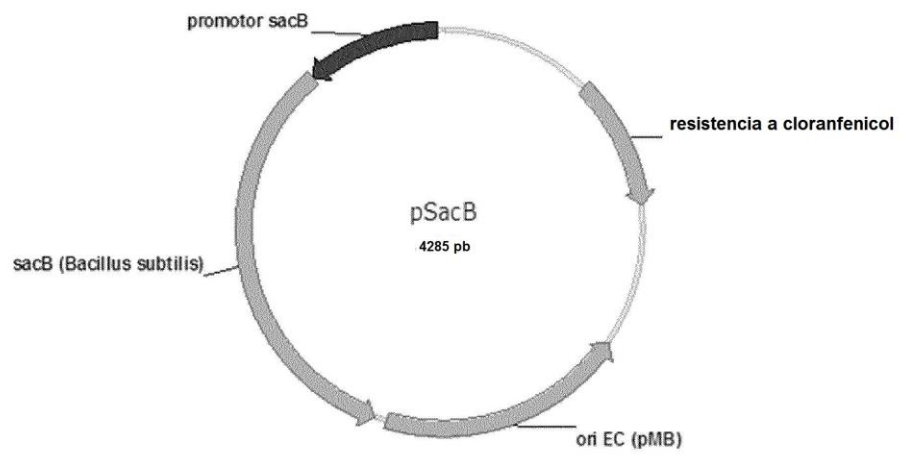


Fig. 1

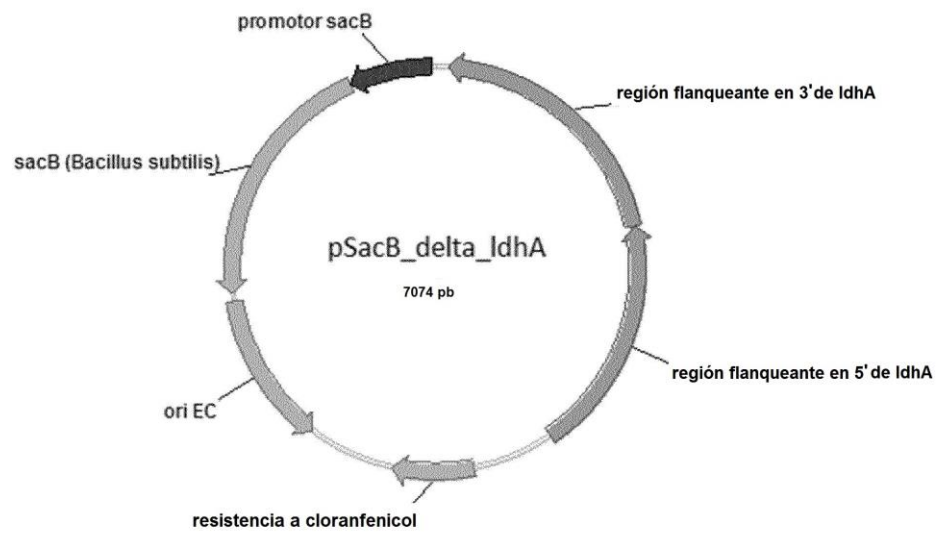


Fig. 2

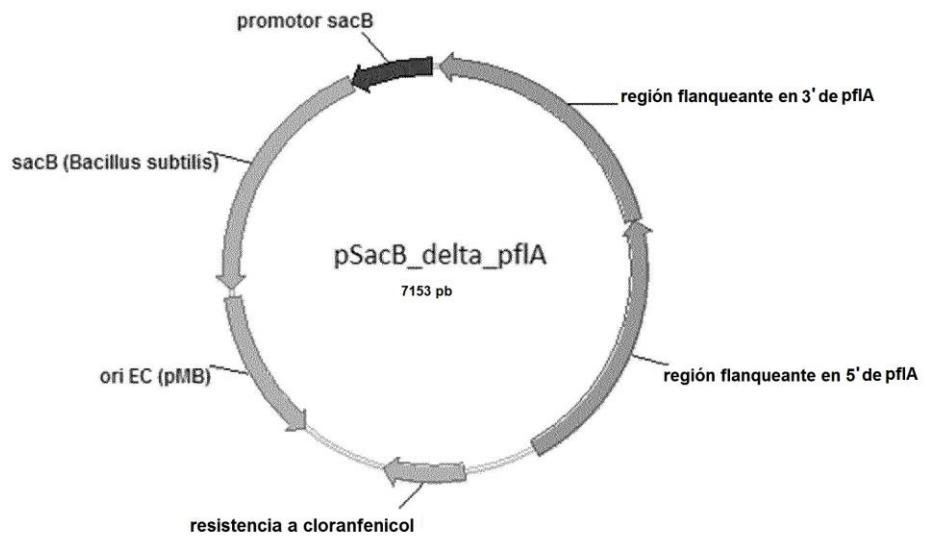


Fig. 3

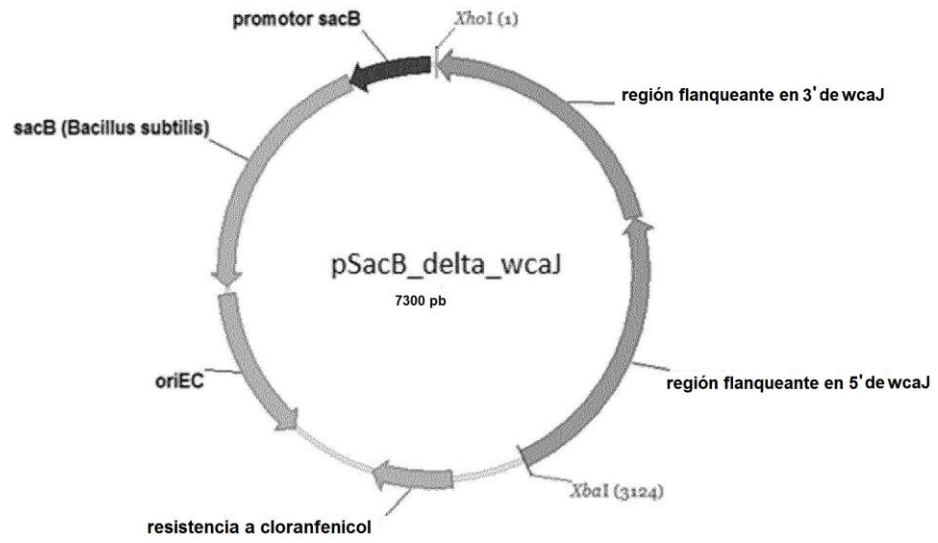


Fig. 4

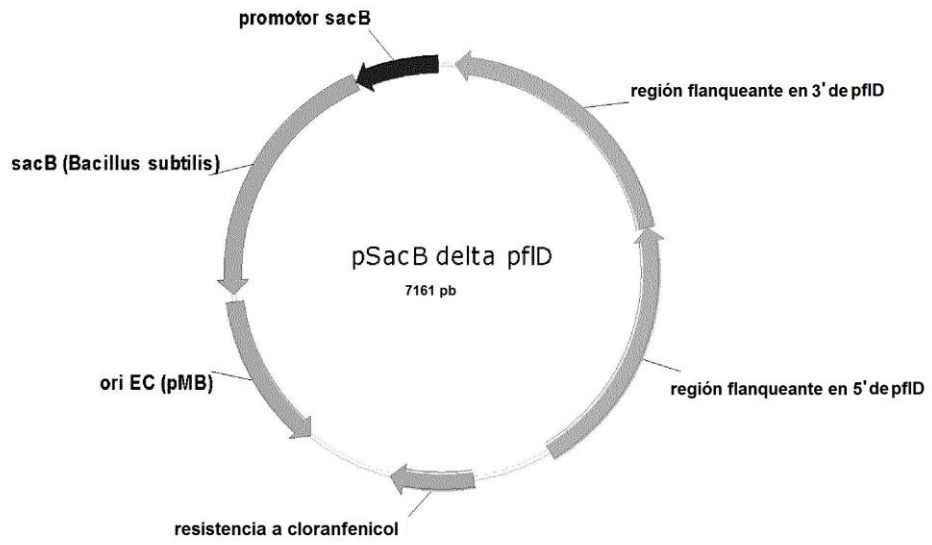


Fig. 5

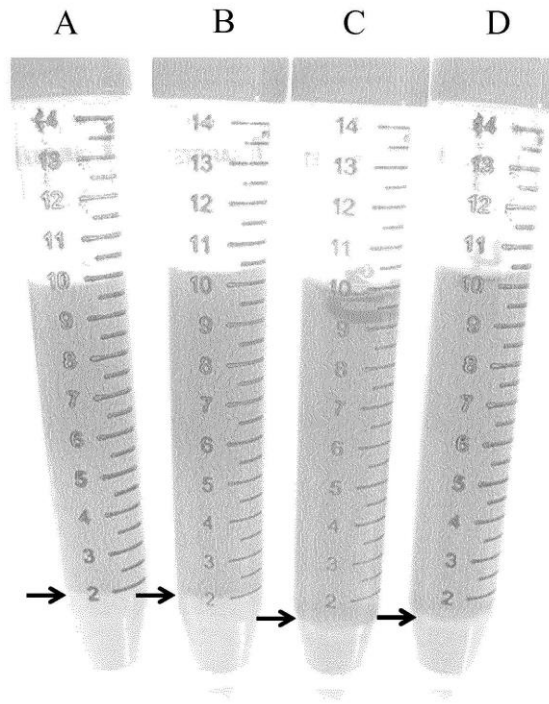


Fig. 6