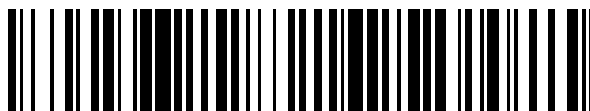


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 024**

51 Int. Cl.:

C12P 7/16 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014** **PCT/US2014/025714**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14160050**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014** **E 14719570 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019** **EP 2970863**

54 Título: **Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa para la producción de butanol**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361782651 P
31.01.2014 US 201461934096 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2019

73 Titular/es:

E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(100.0%)
Chestnut Run Plaza, 974 Center Road, P.O. Box
2915
Wilmington, DE 19805, US

72 Inventor/es:

BHALLA, RITU;
CHOTANI, GOPAL, K.;
DAUNER, MICHAEL;
NELSON, MARK, J.;
O'KEEFE, DANIEL, P.;
PERES, CAROLINE, M.;
PRASAD, JAHNAVI, CHANDRA y
TOMB, JEAN-FRANCOIS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 735 024 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

Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa para la producción de butanol

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere al campo de la microbiología industrial y la producción fermentativa de butanol e isómeros del mismo. Más específicamente, la invención se refiere a enzimas glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) con una K_M para NADH alta, sustancialmente la misma afinidad por NADH y NADPH y/o enzimas GPD que son inhibidas por retroalimentación, microorganismos recombinantes que comprenden tales enzimas, y métodos para usar tales enzimas para producir butanol.

Referencia al listado de secuencias remitido electrónicamente

- 10 El contenido del listado de secuencias remitido electrónicamente en el archivo de texto ASCII (Nombre: 20140314_CL5707USNP_Sequence Listing; Tamaño: 401.408 bytes, y Fecha de Creación: 12 de marzo de 2014).

Antecedentes

- 15 El butanol es un importante producto químico industrial, útil como aditivo para combustibles, como producto químico materia prima en la industria de los plásticos, y como extractante de calidad alimentaria en la industria de los alimentos y los condimentos. Cada año se producen 4,5 a 5,4 mil millones de kilogramos (10 a 12 mil millones de libras) de butanol por medios petroquímicos, y la necesidad de este producto químico básico aumentará probablemente en el futuro.

- 20 Se conocen métodos para la síntesis química de isobutanol, tales como oxosíntesis, hidrogenación catalítica de monóxido de carbono (Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6ª edición, 2003, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co., Weinheim, Alemania, Vol. 5, págs. 716-719) y condensación de Guerbet de metanol con n-propanol (Carlini et al., J. Molec. Catal. A. Chem. 220:215-220, 2004). Estos procedimientos usan materiales de partida derivados de productos petroquímicos, son generalmente caros, y no son respetuosos con el medio ambiente. La producción de isobutanol a partir de materias primas derivadas de plantas minimizaría las emisiones de gases de invernadero y representarían un avance en la técnica.

- 25 El isobutanol se produce biológicamente como un subproducto de la fermentación por levaduras o por microorganismos diseñados de manera recombinante, modificados para expresar una ruta biosintética de butanol para producir butanol. Véase p.ej. la patente de EE.UU. N° 7.851.188. Como componente del "aceite de fusel", que se forma como resultado del metabolismo incompleto de aminoácidos por hongos, el isobutanol es producido específicamente a partir del catabolismo de la L-valina. Después de que el grupo amina de la L-valina es recogido como fuente de nitrógeno, el α -cetoácido resultante es descarboxilado y reducido a isobutanol por enzimas de la llamada ruta de Ehrlich (Dickinson et al., J. Biol. Chem. 273:25752-25756, 1998).

- 30 Vishist K. Jain et al. (Appl Microbiol Biotechnol (2012) 93:131-141) investigaron la producción de metabolitos primarios y secundarios en cepas de *S. cerevisiae* donde la ruta de producción de glicerol fue inactivada mediante la delección de los dos genes de glicerol-3-fosfato deshidrogenasas (GPD1/GPD2) y reemplazada con rutas generadoras de NAD^+ alternativas.

- 35 La publicación de solicitud de patente N° WO 2012/129555 describe células huésped de levadura recombinantes y métodos para su uso para la producción de isobutanol. Las células huésped de levaduras descritas comprenden una ruta biosintética de isobutanol y al menos una de actividad aldehído deshidrogenasa reducida o eliminada, actividad acetolactato reductasa reducida o eliminada; o un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido que tiene actividad cetol-ácido reductoisomerasa.

- 40 Uno de los mecanismos clave de la pérdida de rendimiento en la producción de butanol por levaduras es la pérdida de carbono y equivalentes reductores que son desviados de la glicólisis por la conversión de fosfato de dihidroxiacetona en glicerol. La primera etapa en esta conversión es catalizada por una enzima llamada glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD). Eliminar la GPD, y por lo tanto la producción de glicerol, en levadura productora de butanol, se ha propuesto anteriormente. Sin embargo, se requiere glicerol para el crecimiento, y es un osmoprotector.

Por consiguiente, los métodos para aumentar el rendimiento de butanol y disminuir la producción de glicerol representan un avance en la técnica.

Breve compendio de la invención

Las realizaciones de la invención se exponen en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

- 50 En un aspecto, la presente invención proporciona una enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) diseñada que tiene al menos 90% de identidad a SEQ ID NO: 195, en donde la enzima comprende al menos una sustitución en un residuo que corresponde a la posición 73 o 129 de SEQ ID NO: 195.

En algunas realizaciones, la enzima GPD diseñada comprende una sustitución que corresponde a la posición 73 de SEQ ID NO: 195 y una sustitución que corresponde a la posición 129 de SEQ ID NO: 195.

En algunas realizaciones, la enzima GPD diseñada tiene al menos 95% de identidad a SEQ ID NO: 195.

5 En algunas realizaciones, la enzima GPD diseñada tiene una K_M para NADH de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 1 mM.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo recombinante que comprende una enzima GPD diseñada de la invención, en donde el microorganismo comprende una ruta biosintética de alcohol que comprende al menos un gen que es heterólogo al microorganismo recombinante; en donde el microorganismo comprende una delección o disrupción de un gen endógeno que codifica GPD; en donde el microorganismo tiene una producción mejorada de alcohol en comparación con un microorganismo que carece de la enzima GPD diseñada, y en donde el microorganismo es *Saccharomyces cerevisiae*.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción de alcohol usando la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) diseñada de la invención, o el microorganismo recombinante de la invención.

15 Por tanto, en la presente memoria se proporcionan enzimas GPD, microorganismos recombinantes, y métodos para la producción de butanol.

También se proporcionan en la presente memoria microorganismos recombinantes de la invención que comprenden (a) una ruta biosintética de butanol diseñada que comprende al menos un polipéptido que es heterólogo al microorganismo recombinante; (b) una enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) heteróloga diseñada de la invención, en donde la GPD heteróloga tiene una K_M para NADH más alta en comparación con la K_M de la GPD endógena del microorganismo; y (c) una delección o disrupción en un gen endógeno que codifica GPD. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante de la invención tiene una producción mejorada o aumentada de butanol en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD heteróloga. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante tiene una producción reducida o disminuida de glicerol en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD heteróloga. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante tiene una relación molar de butanol a glicerol aumentada en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD heteróloga. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante tiene un rendimiento efectivo aumentado en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD heteróloga.

30 También se describen en la presente memoria microorganismos recombinantes que comprenden (a) una ruta biosintética de butanol diseñada que comprende al menos un polipéptido que es heterólogo al microorganismo recombinante; (b) una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) heteróloga, en donde la GPD heteróloga tiene sustancialmente la misma afinidad por NADH y NADPH y/o está inhibida en retroalimentación; y (c) una delección o disrupción en un gen endógeno que codifica GPD. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante tiene una producción de butanol mejorada o aumentada en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD heteróloga. Opcionalmente, la GPD heteróloga es inhibida en retroalimentación por glicerol-3-fosfato. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante tiene una producción de glicerol reducida o disminuida en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD heteróloga. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante tiene una relación molar de butanol a glicerol aumentada en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD heteróloga. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante tiene un rendimiento efectivo aumentado en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD heteróloga.

45 En ciertos ejemplos, la GPD heteróloga es una GPD existente en la naturaleza. En ciertos ejemplos, la GPD existente en la naturaleza se selecciona del número EC 1.1.1.8, 1.1.5.3, o 1.1.1.94. La GPD existente en la naturaleza puede ser una GPD de un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Leishmania mexicana*, *Dunaliella viridis*, *Jaculus orientalis*, *Archeoglobus fulgidus*, *Rickettsia prowazekii*, *Beggiatoa alba*, *Kangiella koreenis*, *Aspergillus oryzae*, *Candida versatilis*, *Escherichia coli* y *Oryctolagus cuniculu*.

50 En la invención, la GPD heteróloga es una GPD diseñada. La GPD diseñada comprende al menos una sustitución correspondiente a la posición 73 o 129 de SEQ ID NO:195. En ciertas realizaciones la GPD diseñada comprende al menos una sustitución en un residuo correspondiente a la posición 73 de SEQ ID NO:195. En ciertas realizaciones la GPD diseñada comprende al menos una sustitución en un residuo correspondiente a la posición 129 de SEQ ID NO:195. En ciertas realizaciones la GPD diseñada comprende al menos una sustitución en un residuo correspondiente a la posición 73 de SEQ ID NO:195 y una sustitución en un residuo correspondiente a la posición 129 de SEQ ID NO:195.

55 También se proporcionan enzimas glicerol-3-fosfato deshidrogenasas (GPD) diseñadas. En la invención, la enzima GPD diseñada tiene al menos 90% de identidad a SEQ ID NO:195. La enzima GPD diseñada comprende al menos una sustitución en un residuo correspondiente a la posición 73 o 129 de SEQ ID NO:195. En ciertas realizaciones la enzima GPD diseñada comprende al menos una sustitución en un residuo correspondiente a la posición 73 de SEQ ID NO:195. En ciertas realizaciones la enzima GPD diseñada comprende al menos una sustitución en un residuo correspondiente a la posición 129 de SEQ ID NO:195.

correspondiente a la posición 129 de SEQ ID NO:195. En ciertas realizaciones la enzima GPD diseñada comprende al menos una sustitución en un residuo correspondiente a la posición 73 de SEQ ID NO:195 y una sustitución en un residuo correspondiente a la posición 129 de SEQ ID NO:129. En ciertas realizaciones, la enzima GPD diseñada tiene una K_M para NADH de aproximadamente 0,01 mM a 1 mM.

- 5 También se proporcionan microorganismos recombinantes que comprenden cualquiera de las enzimas GPD diseñadas de la invención. Opcionalmente, el microorganismo recombinante puede comprender una ruta biosintética de butanol diseñada que comprende al menos un gen que es heterólogo al microorganismo recombinante. El microorganismo recombinante comprende una delección o disrupción de un gen endógeno que codifica GPD. En ciertas realizaciones, el microorganismo recombinante tiene una producción de butanol mejorada o aumentada en
10 comparación con un microorganismo que carece de la enzima GPD diseñada. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante tiene una producción de glicerol reducida o disminuida en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD diseñada. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante tiene una relación molar de butanol a glicerol aumentada en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD diseñada. En algunas realizaciones, el
15 microorganismo recombinante tiene un rendimiento efectivo aumentado en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD diseñada.

También se proporcionan métodos para la producción de butanol. Los métodos comprenden proporcionar un microorganismo recombinante de la invención que comprende (i) una ruta biosintética de butanol diseñada, (ii) una delección o disrupción en un gen endógeno que codifica GPD, y; (iii) una enzima GPD diseñada de la invención;

- 20 y poner en contacto el microorganismo recombinante con al menos un sustrato de carbono fermentable en condiciones en donde se produce butanol. Opcionalmente, la GPD heteróloga es inhibida en retroalimentación por glicerol-3-fosfato. En ciertas realizaciones, el microorganismo recombinante se cultiva en condiciones anaeróbicas.

El microorganismo recombinante puede comprender una ruta biosintética de butanol diseñada seleccionada del grupo que consiste en (a) una ruta biosintética de 1-butanol; (b) una ruta biosintética de 2-butanol; y (c) una ruta biosintética de isobutanol.

- 25 Opcionalmente, la ruta biosintética de 1-butanol comprende al menos un polipéptido que realiza una de las siguientes conversiones de sustrato a producto: (a) acetil-CoA a acetoacetil-CoA, catalizada por acetil-CoA acetiltransferasa; (b) acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacil-CoA, catalizada por 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; (c) 3-hidroxiacil-CoA a crotonil-CoA, catalizada por crotonasa; (d) crotonil-CoA a butiril-CoA, catalizada por butiril-CoA deshidrogenasa; (e)
30 butiril-CoA a butiraldehído, catalizada por butiraldehído deshidrogenasa; y (f) butiraldehído a 1-butanol, catalizada por 1-butanol deshidrogenasa.

- Opcionalmente, la ruta biosintética de 2-butanol comprende al menos un polipéptido que realiza una de las siguientes conversiones de sustrato a producto: (a) piruvato a alfa-acetolactato, catalizada por acetolactato sintasa; (b) alfa-acetolactato a acetoina, catalizada por acetolactato descarboxilasa; (c) acetoina a 2,3-butanodiol, catalizada por
35 butanodiol deshidrogenasa; (d) 2,3-butanodiol a 2-butanona, catalizada por butanodiol deshidratasa; y (e) 2-butanona a 2-butanol, catalizada por 2-butanol deshidrogenasa.

- Opcionalmente, la ruta biosintética de isobutanol comprende al menos un polipéptido que realiza una de las siguientes conversiones de sustrato a producto: (a) piruvato a acetolactato, catalizada por acetolactato sintasa; (b) acetolactato a 2,3-dihidroxiisovalerato, catalizada por cetol-ácido reductoisomerasa; (c) 2,3-dihidroxiisovalerato a α -cetoisovalerato, catalizada por dihidroxiácido deshidratasa; (d) α -cetoisovalerato a isobutiraldehído, catalizada por una cetoácido de
40 cadena ramificada descarboxilasa; y (e) isobutiraldehído a isobutanol, catalizada por alcohol de cadena ramificada deshidrogenasa.

En la invención, el microorganismo recombinante es *Saccharomyces cerevisiae*.

- 45 También se proporcionan microorganismos recombinantes de la invención que comprenden (a) una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) heteróloga, en donde la GPD heteróloga tiene una K_M para NADH más alta en comparación con la K_M de la GPD endógena del microorganismo; y (b) una delección o disrupción en un gen endógeno que codifica GPD. En algunas realizaciones el microorganismo tiene una producción de glicerol disminuida en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD heteróloga.

- También se proporcionan microorganismos recombinantes de la invención que comprenden (a) una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) heteróloga, en donde la GPD heteróloga tiene sustancialmente la misma afinidad por NADH y NADPH y/o está inhibida en retroalimentación; y (b) una delección o disrupción en un gen endógeno que codifica GPD. Opcionalmente, la GPD heteróloga es inhibida en retroalimentación por glicerol-3-fosfato. En algunas realizaciones el microorganismo tiene una producción de glicerol disminuida en comparación con un microorganismo recombinante de control que carece de la GPD heteróloga.

- 55 También se proporcionan microorganismos recombinantes de la invención que comprenden una GPD heteróloga, en donde la GPD heteróloga tiene sustancialmente la misma afinidad por NADH y NADPH y/o es inhibida en retroalimentación, y en donde el microorganismo tiene una producción de glicerol disminuida en comparación con un

microorganismo recombinante de control que carece de la GPD heteróloga. Opcionalmente, la GPD heteróloga es inhibida en retroalimentación por glicerol-3-fosfato.

Breve descripción de los dibujos/figuras

La Figura 1 muestra un mapa del plásmido usado para expresar proteínas GPD variantes en *E. coli*.

- 5 La Figura 2 muestra una alineación parcial de las secuencias de GPD truncada humana (SEQ ID NO:190), *Saccharomyces cerevisiae* (GPD1) (SEQ ID NO:191), *Rickettsia prowazekii* (SEQ ID NO:192), *Beggiatoa alba* (SEQ ID NO: 193) y *Kangiella koreensis* (SEQ ID NO:194). El asterisco (*) indica las posiciones de los phe41 y phe97 en la secuencia truncada humana.

- 10 La Figura 3 muestra un gráfico que demuestra datos de 20 horas de producción para los cultivos de la variante de GPD1 indicada y células de control. Se ensayaron por duplicado dos clones para cada variante. 2145: cepa de control isobutanológica con WT GPD que es PNY2145 transformada con pLMH111-JM44; EC_1 y EC_2: GPD optimizada de *E. coli*; E3 y E8: variantes de GPD1 optimizadas de *E. coli*; N3 y N8: variantes de GPD con utilización de codones nativos de levadura; M3 y M8: variantes de GPD optimizados por codones de levadura. Las variantes E3, N3 y M3 tienen sustitución F73A, y las variantes E8, N8 y M8 tienen sustituciones F73G/F129G.

- 15 La Figura 4 muestra un gráfico que demuestra una comparación de la relación isobutanol (iBuOH)/glicerol (Gly) con la actividad de GPD medida (U/mg). La ecuación de regresión para la relación iBuOH/Gly es igual a $2,93 - 234\text{GPD}$ (U/mg) ($R\text{-Sq} = 60,1\%$; $R\text{-Sq}_{(\text{pred})} = 25,04\%$).

- 20 La Figura 5 muestra un gráfico que demuestra una comparación del título de isobutanol medido con valores calculados mediante la ecuación de regresión lineal (FIT_2) ($S = 0,159277$; $R\text{-Sq} = 98,6\%$; $R\text{-Sq}_{(\text{adj})} = 97,6\%$; $\text{PRESS} = 0,415575$; $R\text{-Sq}_{(\text{pred})} = 94,32\%$). La constante y coeficientes para la ecuación de regresión se proporcionan en la Tabla 12.

La Figura 6 muestra un gráfico que demuestra una comparación del rendimiento de isobutanol (gramos de isobutanol/gramo de glucosa consumido) con los valores calculados mediante la ecuación de regresión lineal (FIT_4) ($S = 0,0101071$; $R\text{-Sq} = 93,9\%$; $R\text{-Sq}_{(\text{adj})} = 91,4\%$; $\text{PRESS} = 0,00197878$; $R\text{-Sq}_{(\text{pred})} = 76,30\%$). La constante y coeficientes para la ecuación de regresión se proporcionan en la Tabla 13.

- 25 La Figura 7 muestra un gráfico del rendimiento de isobutanol (gramos de isobutanol producido por gramo de glucosa consumido) a 28 y 42 horas para las cepas isobutanológicas CPN97 y PNY2310.

La Figura 8 muestra un gráfico de la relación isobutanol/glicerol a 28 y 42 horas para las cepas isobutanológicas CPN97 y PNY2310.

- 30 La Figura 9 muestra un gráfico de la glucosa consumida en función del tiempo para las cepas isobutanológicas CPN97 y PNY2310.

Descripción detallada de la invención

- 35 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto corriente en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, la presente solicitud que incluye las definiciones prevalecerá. También, a menos que sea requerido de otro modo por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular.

A fin de definir adicionalmente esta invención, se proporcionan los siguientes términos, abreviaturas y definiciones.

- 40 Se entenderá que “derivado de”, con referencia a los polipéptidos descritos en la presente memoria, abarca secuencias sintetizadas en base a las secuencias de aminoácidos de las GPDs, u otras enzimas, presentes en los organismos indicados, así como los clonados directamente a partir del material genético del organismo.

- 45 Como se emplean en la presente memoria, se entenderá que los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “tiene”, “que tiene”, “contiene” o “que contiene”, o cualquier otra variación de los mismos, implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros, y se pretende que sean no exclusivos o de extremo abierto. Por ejemplo, una composición, una mezcla, un procedimiento, un método, un artículo, o un aparato que comprende una lista de elementos no está limitado necesariamente a solo esos elementos sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a tal composición, mezcla, procedimiento, método, artículo o aparato. Además, a menos que se indique expresamente lo contrario, “o” hace referencia a un o inclusivo, y no a un o exclusivo. Por ejemplo, una condición A o B es satisfecha por uno cualquiera de lo siguiente: A es verdadero (o presente) y B es falso (o no presente), A es falso (o no presente) y B es verdadero (o presente), tanto A como B son verdaderos (o presentes).

Como se emplea en la presente memoria, el término “consiste en”, o variaciones tales como “consisten en” o “que consiste en”, usados en toda la memoria descriptiva y reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier número entero

o grupo de números enteros recitados, pero que no puede añadirse ningún número entero o grupo de números enteros adicional al método, estructura o composición especificados.

Como se emplea en la presente memoria, el término “consiste esencialmente en”, o variaciones tales como “consisten esencialmente en” o “que consiste esencialmente en”, usados en toda la memoria descriptiva y reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier número entero o grupo de números enteros recitados, y la inclusión opcional de cualquier número entero o grupo de números enteros recitados que no cambien materialmente las propiedades básicas o nuevas del método, estructura o composición especificados. Véase M.P.E.P. § 2111.03.

También, se pretende que los artículos indefinidos “un” y “uno” que preceden un elemento o componente de la invención sean no restrictivos con respecto al número de casos, es decir, ocurrencias del elemento o componente. Por lo tanto “un/una” o “uno/una” deben ser leídos para incluir uno o al menos uno, y la forma de la palabra singular del elemento o componente también incluye el plural, a menos que signifique obviamente que el número sea singular.

El término “invención” o “presente invención”, como se emplea en la presente memoria, es un término no limitante y no pretende hacer referencia a ninguna realización única de la invención particular, sino que abarca todas las realizaciones posibles descritas en las reivindicaciones presentadas o enmendadas o suplementadas posteriormente, o en la memoria descriptiva.

Como se emplea en la presente memoria, el término “aproximadamente”, que modifica la cantidad de un ingrediente o reaccionante de la invención empleado, hace referencia a la variación en la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, mediante procedimientos típicos de medida y manejo de líquidos usados para preparar concentrados o disoluciones en el mundo real; mediante un error en estos procedimientos; mediante diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes empleados para preparar las composiciones o para llevar a cabo los métodos; y similares. El término “aproximadamente” también abarca cantidades que difieren debido a condiciones de equilibrio diferentes para una composición que resulta de una mezcla inicial particular. Ya sean modificadas o no por el término “aproximadamente”, las reivindicaciones incluyen equivalentes a las cantidades. En una realización, el término “aproximadamente” significa dentro de 10% del valor numérico reportado, o dentro de 5% del valor numérico reportado.

El término “ruta biosintética de butanol”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a la ruta enzimática para producir 1-butanol, 2-butanol o isobutanol.

El término “ruta biosintética de 1-butanol” hace referencia a una ruta enzimática para producir 1-butanol. Una “ruta biosintética de 1-butanol” puede hacer referencia a una ruta enzimática para producir 1-butanol a partir de acetil-coenzima A (acetil-CoA). Por ejemplo, se describen rutas biosintéticas de 1-butanol en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2008/0182308 y la publicación internacional N° WO 2007/041269.

El término “ruta biosintética de 2-butanol” hace referencia a una ruta enzimática para producir 2-butanol. Una “ruta biosintética de 2-butanol” puede hacer referencia a una ruta enzimática para producir 2-butanol a partir de piruvato. Por ejemplo, se describen rutas biosintéticas de 2-butanol en la patente de EE.UU. N° 8.206.970, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2007/0292927, las publicaciones internacionales Nos. WO 2007/130518 y WO 2007/130521.

El término “ruta biosintética de isobutanol” hace referencia a una ruta enzimática para producir isobutanol. Una “ruta biosintética de isobutanol” puede hacer referencia a una ruta enzimática para producir isobutanol a partir de piruvato. Por ejemplo, se describen rutas biosintéticas de isobutanol en la patente de EE.UU. N° 7.851.188, la publicación de solicitud de EE.UU. N° 2007/0092957, y la publicación internacional N° WO 2007/050671. De vez en cuando “ruta biosintética de isobutanol” se usa de manera sinónima con “ruta de producción de isobutanol”.

El término “butanol”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a los isómeros de butanol 1-butanol (1-BuOH), 2-butanol (2-BuOH), terc-butanol (t-BuOH) y/o isobutanol (iBuOH o i-BuOH, conocido también como 2-metil-1-propanol), bien individualmente o bien como mezclas de los mismos. De vez en cuando, como se emplean en la presente memoria, los términos “biobutanol” y “butanol bioproducido” pueden usarse de manera sinónima con “butanol”.

Los usos para el butanol pueden incluir, pero no se limitan a, combustibles (p.ej., biocombustibles), un aditivo para combustibles, un alcohol usado para la producción de ésteres que pueden usarse como combustible diésel o biodiésel, como producto químico en la industria de los plásticos, un ingrediente en productos formulados tales como cosméticos, y un compuesto químico intermedio. El butanol también puede usarse como disolvente para pinturas, revestimientos, barnices, resinas, gomas, tintes, grasas, ceras, resinas, goma laca, cauchos y alcaloides.

Como se emplea en la presente memoria, el término “bioproducido” significa que la molécula (p.ej., butanol) se produce a partir de una fuente renovable (p.ej., la molécula puede producirse durante un proceso de fermentación a partir de una materia prima renovable). Así, por ejemplo, un butanol bioproducido puede ser isobutanol producido por un proceso de fermentación a partir de una materia prima renovable. Las moléculas producidas a partir de una fuente renovable pueden ser definidas además por la relación de isótopos $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$. Una relación de isótopos $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el intervalo de 1:0 a mayor que 0:1 indica una molécula bioproducida, mientras que una relación de 0:1 indica que la molécula es de procedencia fósil.

- Una célula huésped recombinante que comprende una “ruta de producción de alcohol diseñada” (tal como una ruta de producción de butanol o isobutanol diseñada) hace referencia a una célula huésped que contiene una ruta modificada que produce alcohol de una manera diferente de la presente normalmente en la célula huésped. Tales diferencias incluyen la producción de un alcohol no producido típicamente por la célula huésped, o una producción aumentada o más eficaz.
- El término “ruta biosintética heteróloga”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a una ruta enzimática para producir un producto en el que al menos una de las enzimas no es endógena a la célula huésped que contiene la ruta biosintética.
- El término “extractante”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a uno o más disolventes orgánicos que pueden usarse para extraer alcohol (p.ej., butanol) de un caldo de fermentación.
- El término “productividad de isobutanol efectiva”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a la cantidad total en gramos de isobutanol producido por gramo de células.
- El término “título efectivo”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a la cantidad total de un alcohol particular (p.ej., butanol) producido por fermentación por litro de medio de fermentación. La cantidad total de butanol incluye: (i) la cantidad de butanol en el medio de fermentación; (ii) la cantidad de butanol recuperada del extractante orgánico; y (iii) la cantidad de butanol recuperada de la fase gaseosa, si se usa purificación de gases.
- El término “tasa efectiva”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a la cantidad total de alcohol (p.ej., butanol) producido por fermentación por litro de medio de fermentación por hora de fermentación.
- El término “rendimiento efectivo”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a la cantidad de alcohol (p.ej., butanol) producido por unidad de sustrato de carbono fermentable consumido por el biocatalizador.
- El término “separación”, como se emplea en la presente memoria, es sinónimo a “recuperación”, y hace referencia a retirar un compuesto químico de una mezcla inicial para obtener el compuesto en mayor pureza o en una concentración más alta que la pureza o concentración del compuesto en la mezcla inicial.
- El término “fase acuosa”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a la fase acuosa de una mezcla bifásica obtenida poniendo en contacto un caldo de fermentación con un extractante orgánico inmiscible con el agua. En una realización de un procedimiento descrito en la presente memoria que incluye extracción fermentativa, el término “caldo de fermentación” hace referencia específicamente entonces a la fase acuosa en extracción fermentativa bifásica.
- El término “fase orgánica”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a la fase no acuosa de una mezcla bifásica obtenida poniendo en contacto un caldo de fermentación con un extractante orgánico inmiscible con el agua.
- El término “sustrato de carbono” o “sustrato de carbono fermentable” hace referencia a una fuente de carbono capaz de ser metabolizada por organismos huéspedes de la presente descripción y particularmente fuentes de carbono seleccionadas del grupo que consiste en monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, y sustratos de un carbono o mezclas de los mismos. Se proporcionan en la presente memoria ejemplos no limitantes de sustratos de carbono, e incluyen, pero no se limitan a, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, etanol, lactato, succinato, glicerol, dióxido de carbono, metanol, glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, xilosa, arabinosa, dextrosa, celulosa, metano, aminoácidos o mezclas de los mismos.
- “Caldo de fermentación”, como se emplea en la presente memoria, significa la mezcla de agua, azúcares (fuentes de carbono fermentables), sólidos disueltos (si están presentes), microorganismos que producen alcohol, alcohol producto y todos los demás constituyentes del material en el que se está formando el alcohol producto por la reacción de azúcares a alcohol, agua y dióxido de carbono (CO₂) por los microorganismos presentes. De vez en cuando, como se emplea en la presente memoria, el término “medio de fermentación” y “mezcla fermentada” pueden usarse de manera sinónima con “caldo de fermentación”.
- Como se emplea en la presente memoria, un “fermentador” hace referencia a cualquier recipiente, recipientes o aparatos que se usan para fermentar un sustrato. Un fermentador puede contener un medio de fermentación y un microorganismo capaz de realizar una fermentación. El término “recipiente de fermentación” se refiere al recipiente en el que se lleva a cabo la reacción de fermentación por la cual se forma un alcohol tal como butanol. “Fermentador” puede usarse en la presente memoria de manera intercambiable con “recipiente de fermentación”.
- El término “producto de fermentación” incluye cualquier producto de interés deseado, que incluye, pero no se limita a, 1-butanol, 2-butanol, isopropanol, etc.
- “Biomasa”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a un producto natural que contiene un almidón hidrolizable que proporciona un azúcar fermentable, incluyendo cualquier material celulósico o lignocelulósico y materiales que comprenden celulosa, y que comprenden opcionalmente además hemicelulosa, lignina, almidón,

oligosacáridos, disacáridos y/o monosacáridos. La biomasa también puede comprender componentes adicionales, tales como proteínas y/o lípidos. La biomasa puede derivar de una única fuente, o la biomasa puede comprender una mezcla derivada de más que una fuente. Por ejemplo, la biomasa puede comprender una mezcla de mazorcas de maíz y rastrojo de maíz, o una mezcla de hierba y hojas. La biomasa incluye, pero no se limita a, cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, desechos sólidos urbanos, desechos sólidos industriales, fango de la fabricación de papel, desechos de jardinería, madera y desechos forestales. Los ejemplos de biomasa incluyen, pero no se limitan a, grano de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos tales como hojas de maíz, rastrojo de maíz, hierbas, trigo, centeno, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, pasto varilla, desechos de papel, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, arbustos y matorrales, vegetales, frutas, flores, estiércol animal y mezclas de los mismos.

“Materia prima”, como se emplea en la presente memoria, significa un producto que contiene una fuente de carbono fermentable. Las materias primas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, centeno, trigo, maíz, masa de maíz, caña, masa de caña, caña de azúcar, cebada, material celulósico, material lignocelulósico y mezclas de los mismos.

El término “biomasa”, como se emplea en la presente memoria, en algunos casos, hace referencia a la masa del cultivo, p.ej., la cantidad de microorganismos recombinantes, proporcionada típicamente en unidades de gramos por litro (g/l) de peso de células secas (dcw).

El término “condiciones aeróbicas”, como se emplea en la presente memoria, significa condiciones de crecimiento en presencia de oxígeno.

El término “condiciones microaeróbicas”, como se emplea en la presente memoria, significa condiciones de crecimiento con niveles de oxígeno bajos (es decir, por debajo de los niveles de oxígeno atmosférico normales).

El término “condiciones anaeróbicas”, como se emplea en la presente memoria, significa condiciones de crecimiento en ausencia de oxígeno.

El término “polinucleótido” pretende abarcar un ácido nucleico singular así como ácidos nucleicos plurales, y hace referencia a una molécula o constructo de ácido nucleico, p.ej., ARN mensajero (ARNm) o ADN plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede contener la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ADNc de longitud completa, o un fragmento de la misma, que incluye las secuencias 5' y 3' no traducidas y las secuencias codificantes. El polinucleótido puede estar compuesto de cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificados o ARN o ADN modificados. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden estar compuestos de ADN de hebra única y doble, ADN que es una mezcla de regiones de hebra única y doble, ARN de hebra única y doble, ARN que es una mezcla de regiones de hebra única y doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de hebra única o, más típicamente, de hebra doble o una mezcla de regiones de hebra única y doble. “polinucleótido” abarca formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente.

Una secuencia de polinucleótidos puede denominarse como “aislada”, en la que ha sido retirada de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido o fragmento de polipéptido que tiene actividad ALS contenida en un vector se considera aislado para los fines de la presente descripción. Ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcialmente o sustancialmente) en disolución. Los polinucleótidos aislados o ácidos nucleicos según la presente descripción incluyen además tales moléculas producidas sintéticamente. Un fragmento de polinucleótido aislado en la forma de un polímero de ADN puede estar comprendido de uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

Como se emplea en la presente memoria, “actividad reducida” hace referencia a cualquier disminución mensurable en una actividad biológica conocida de un polipéptido cuando se compara con la misma actividad biológica del polipéptido antes del cambio que da como resultado la actividad reducida. Tal cambio puede incluir una modificación de un polipéptido o un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria. Una actividad reducida de un polipéptido descrito en la presente memoria puede determinarse por métodos bien conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. La actividad reducida de una enzima hace referencia a regulación en descenso, ya sea parcial o total, de la actividad de la enzima en comparación con la actividad de la enzima de tipo salvaje. La regulación en descenso puede ocurrir cuando un gen nativo tiene una “disrupción” o “modificación”, que hacen referencia a una inserción, delección o mutación dirigida a diana dentro de una porción de ese gen, que da como resultado, p.ej., una eliminación completa del gen de tal modo que el gen es borrado del genoma y no se traduce ninguna proteína, o se traduce una subunidad de proteína que tiene una inserción, delección, sustitución de aminoácidos u otra mutación dirigida a diana. La ubicación de la modificación en la proteína puede estar, por ejemplo, dentro de la porción N-terminal de la proteína o dentro de la porción C-terminal de la proteína. La proteína modificada tendrá una actividad afectada con respecto a la proteína que no fue alterada, y puede ser no funcional. La actividad reducida en una enzima también podría resultar por manipulación de los dominios regulatorios corriente arriba o por el uso de tecnología de sentido, antisentido o ARNi, etc. Otro mecanismo para reducir la actividad de una enzima es la introducción de una mutación que altera las propiedades cinéticas de la enzima (p.ej., reduciendo la afinidad por un sustrato, disminuyendo el k_{cat} , etc.).

Como se emplea en la presente memoria, “actividad eliminada” hace referencia a la completa abolición de una actividad biológica conocida de un polipéptido cuando se compara con la misma actividad biológica del polipéptido antes del cambio que da como resultado la actividad eliminada. Tal cambio puede incluir una modificación de un polipéptido o un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria. Una actividad eliminada incluye una actividad biológica de un polipéptido que no es mensurable cuando se compara con la misma actividad biológica del polipéptido antes del cambio que da como resultado la actividad eliminada. Una actividad eliminada del polipéptido descrito en la presente memoria puede determinarse por métodos bien conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria.

Los términos “PDC-”, “inactivación de PDC” o “PDC-KO”, como se emplean en la presente memoria, hacen referencia a una célula que tiene una modificación genética para inactivar o reducir la expresión de un gen que codifica piruvato descarboxilasa (PDC), con lo que la célula carece sustancialmente o completamente de actividad enzimática piruvato descarboxilasa. Si la célula tiene más que un gen PDC expresado (activo), entonces cada uno de los genes PDC activos puede estar inactivado o tener una expresión mínima, produciendo de este modo una célula PDC-.

El término “actividad específica”, como se emplea en la presente memoria, se define como las unidades de actividad en una cantidad dada de proteína. Así, la actividad específica no se mide directamente, sino que se calcula dividiendo 1) la actividad en unidades/ml de la muestra de enzima por 2) la concentración de proteína en esa muestra, con lo que la actividad específica se expresa como unidades/mg, donde una unidad de enzima se define como moles de producto formado/minuto. La actividad específica de una muestra de enzima totalmente activa, pura, es una característica de esa enzima. La actividad específica de una muestra de una mezcla de proteínas es una medida de la fracción relativa de proteína en esa muestra que está compuesta de la enzima activa de interés.

Los términos “ k_{cat} ” y “ K_M ” son conocidos por los expertos en la técnica, y se describen en Enzyme Structure and Mechanism, 2ª ed. (Ferst; W.H. Freeman Press, NY, 1985; págs. 98-120). K_M , la constante de Michaelis, es la concentración de sustrato que conduce a la mitad de la velocidad máxima. El término “ k_{cat} ”, llamado a menudo “número de producción”, se define como el número máximo de moléculas de sustrato convertidas en productos por sitio activo por unidad de tiempo, o el número de veces que la enzima rinde por unidad de tiempo. $k_{cat} = V_{max}/[E]$, donde $[E]$ es la concentración de la enzima (Ferst, arriba). Los términos “producción total” y “número de producción total” se usan en la presente memoria para hacer referencia a la cantidad de producto formado por la reacción de una enzima con un sustrato.

El término “eficacia catalítica” se define como el k_{cat}/K_M de una enzima. La eficacia catalítica se usa para cuantificar la especificidad de una enzima por un sustrato.

El término “molécula de ácido nucleico aislado”, “fragmento de ácido nucleico aislado” y “constructo genético” se usan de manera intercambiable y significan un polímero de ARN o ADN que es de hebra única o doble, que contiene opcionalmente bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas. Un fragmento de ácido nucleico aislado en la forma de un polímero de ADN puede estar comprendido de uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

El término “aminoácido” hace referencia a la unidad estructural química básica de una proteína o polipéptido. Las abreviaturas en la Tabla 1 se usan en la presente memoria para identificar aminoácidos específicos.

Tabla 1: Aminoácidos y abreviaturas de los mismos.

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K

<u>Aminoácido</u>	<u>Abreviatura de tres letras</u>	<u>Abreviatura de una letra</u>
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

El término “gen” hace referencia a un fragmento de ácido nucleico que es capaz de ser expresado como una proteína específica, que incluye opcionalmente secuencias regulatorias que preceden (secuencias no codificantes 5’) o que siguen (secuencias no codificantes 3’) a la secuencia codificante. “Gen nativo” hace referencia a un gen encontrado en la naturaleza con sus propias secuencias regulatorias. “Gen quimérico” hace referencia a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias regulatorias y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias regulatorias y secuencias codificantes que derivan de fuentes diferentes, o secuencias regulatorias y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente de la encontrada en la naturaleza. “Gen endógeno” hace referencia a un gen nativo en su ubicación natural en el genoma de un microorganismo. Un gen “extraño” hace referencia a un gen no encontrado normalmente en el microorganismo huésped, pero que se introduce en el microorganismo huésped por transferencia de genes. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un microorganismo no nativo, o genes quiméricos. Un “transgen” es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.

Como se emplea en la presente memoria, “nativa” hace referencia a la forma de un polinucleótido, gen o polipéptido encontrado en la naturaleza con sus propias secuencias regulatorias, si están presentes.

Como se emplea en la presente memoria, el término “secuencia codificante” o “región codificante” hace referencia a una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de aminoácidos específica.

Como se emplea en la presente memoria, “endógena” hace referencia a la forma nativa de un polinucleótido, gen o polipéptido en su ubicación natural en el organismo o en el genoma de un organismo. “Polinucleótido endógeno” incluye un polinucleótido nativo en su ubicación natural en el genoma de un organismo. “Gen endógeno” incluye un gen nativo en su ubicación natural en el genoma de un organismo. “Polipéptido endógeno” incluye un polipéptido nativo en su ubicación natural en el organismo transcrito y traducido a partir de un polinucleótido o gen nativo en su ubicación natural en el genoma de un organismo.

El término “heterólogo”, cuando se emplea en referencia a un polinucleótido, un gen o un polipéptido hace referencia a un polinucleótido, gen o polipéptido no encontrado normalmente en el organismo huésped. “Heteróloga” también incluye una región codificante nativa, o porción de la misma, que es reintroducida en el organismo fuente en una forma que es diferente del gen nativo correspondiente, p.ej., no en su ubicación natural en el genoma del organismo. El polinucleótido o gen heterólogo puede ser introducido en el organismo huésped, p.ej., por transferencia de genes. Un gen heterólogo puede incluir una región codificante nativa con regiones regulatorias no nativas que es reintroducido en el huésped nativo. Por ejemplo, un gen heterólogo puede incluir una región codificante nativa que es una porción de un gen quimérico que incluye regiones regulatorias no nativas que es reintroducido en el huésped nativo. “Polipéptido heterólogo” incluye un polipéptido nativo que es reintroducido en el organismo fuente en una forma que es diferente del polipéptido nativo correspondiente. Un polipéptido o polinucleótido “heterólogo” también puede incluir un polipéptido o polinucleótido diseñado por ingeniería genética que comprende una diferencia del polipéptido o polinucleótido “nativo”, p.ej., una mutación de punto dentro del polinucleótido endógeno puede dar como resultado la producción de un polipéptido “heterólogo”. Como se emplea en la presente memoria, un “gen quimérico”, un “gen extraño” y un “transgen” pueden ser ejemplos de genes “heterólogos”.

Un “transgen” es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.

Como se emplea en la presente memoria, el término “modificación” hace referencia a un cambio en un polinucleótido descrito en la presente memoria que da como resultado una actividad reducida o eliminada de un polipéptido codificado por el polinucleótido, así como un cambio en un polipéptido descrito en la presente memoria que da como resultado una actividad reducida o eliminada del polipéptido. Tales cambios pueden hacerse por métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, delección, mutación (p.ej., mutagénesis espontánea, mutagénesis aleatoria, mutagénesis causada por genes mutadores, o mutagénesis de transposón), sustitución, inserción, regulación en descenso, alteración de la ubicación celular, alteración del estado del polinucleótido o polipéptido (p.ej., metilación,

fosforilación o ubiquitinación), retirada de un cofactor, introducción de un ARN/ADN antisentido, introducción de un ARN/ADN interferente, modificación química, modificación covalente, irradiación con rayos UV o X, recombinación homóloga, recombinación mitótica, métodos de reemplazo de promotores, y/o combinaciones de los mismos. Puede encontrarse una guía en la determinación de qué nucleótidos o residuos de aminoácidos pueden ser modificados comparando la secuencia del polinucleótido o polipéptido particular con la de polinucleótidos o polipéptidos homólogos, p.ej., de levaduras o bacterianos, y maximizando el número de modificaciones hechas en regiones de alta homología (regiones conservadas) o secuencias de consenso.

La expresión “elemento de expresión genética recombinante” hace referencia a un fragmento de ácido nucleico que expresa una o más proteínas específicas, que incluyen secuencias regulatorias que preceden (secuencias no codificantes 5') y que siguen (secuencias de terminación 3') a secuencias codificantes para las proteínas. Un gen quimérico es un elemento de expresión genética recombinante. Las regiones codificantes de un operón pueden formar un elemento de expresión genética recombinante, junto con un promotor enlazado de manera operable y una región de terminación.

“Secuencias regulatorias” hace referencia a secuencias de nucleótidos ubicadas corriente arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro de, o corriente abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, el procesamiento o estabilidad de ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias regulatorias pueden incluir promotores, potenciadores, operadores, represores, señales de terminación de transcripción, secuencias principales de traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitio de procesamiento de ARN, sitio de unión con efectores y estructura ...

El término “promotor” hace referencia a una secuencia de ácidos nucleicos capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En general, una secuencia codificante está situada 3' a una secuencia promotora. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ácidos nucleicos sintéticos. Los expertos en la técnica entienden que promotores diferentes pueden dirigir la expresión de un gen en tejidos o tipos celulares diferentes, o en diferentes fases de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. Los promotores que causan que un gen se exprese en la mayoría de los tipos celulares en la mayoría de las veces se denominan habitualmente “promotores constitutivos”. “Promotores inducibles”, por otra parte causan que un gen se exprese cuando el promotor es inducido o excitado por una señal o molécula específica al promotor. Se reconoce además que, dado que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias regulatorias no han sido definidos completamente, fragmentos de ADN de longitudes diferentes pueden tener una actividad promotora idéntica. Por ejemplo, se entenderá que puede usarse “promotor FBA1” para hacer referencia a un fragmento derivado de la región promotora del gen FBA1.

El término “terminador” como se emplea en la presente memoria, hace referencia a secuencias de ADN ubicadas corriente abajo de una secuencia codificante. Esto incluye secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales regulatorias capaces de afectar al procesamiento de ARNm o expresión de genes. La señal de poliadenilación se caracteriza habitualmente afectando a la adición de trectos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. La región 3' puede influir en la transcripción, procesamiento o estabilidad de ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Se reconoce que, dado que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias regulatorias no han sido definidos completamente, fragmentos de ADN de longitudes diferentes pueden tener una actividad terminadora idéntica. Por ejemplo, se entenderá que puede usarse “terminador CYC1” para hacer referencia a un fragmento derivado de la región terminadora del gen CYC1.

La expresión “enlazado de manera operable” hace referencia a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico, con lo que la función de uno es afectada por el otro. Por ejemplo, un promotor está enlazado de manera operable con una secuencia codificante cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden estar enlazadas de manera operable a secuencias regulatorias en orientación sentido o antisentido.

El término “expresión”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a la transcripción y acumulación estable de ARN sentido (ARNm) o antisentido derivado del fragmento de ácido nucleico de la descripción. Expresión también puede hacer referencia a traducción de ARNm en un polipéptido.

El término “sobreexpresión”, como se emplea en la presente memoria, hace referencia a una expresión que es más alta que la expresión endógena de un gen endógeno comparable.

El término sobreexpresión hace referencia a un aumento en el nivel de ácido nucleico o proteína en una célula huésped. Así, puede resultar sobreexpresión de aumentar el nivel de transcripción o traducción de una secuencia endógena en una célula huésped o puede resultar de la introducción de una secuencia heteróloga en una célula huésped. También puede resultar sobreexpresión de aumentar la estabilidad de una secuencia de ácido nucleico o proteína.

Como se emplea en la presente memoria, el término “transformación” hace referencia a la transferencia de un

fragmento de ácido nucleico al genoma de un microorganismo huésped, dando resultado una herencia genéticamente estable. Los microorganismos huéspedes que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformado se denominan microorganismos “transgénicos”, o “recombinantes” o “transformados”.

- Los términos “plásmido”, “vector” y “caja” hacen referencia a un elemento cromosómico extra que lleva a menudo genes que no son parte del metabolismo central de la célula, y están habitualmente en la forma de fragmentos de ADN de doble hebra circulares. Tales elementos pueden ser secuencias autónomamente replicantes, secuencias integradoras del genoma, secuencias de fagos o nucleótidos, lineales o circulares, de un ADN o ARN de hebra única o doble, derivadas de cualquier fuente, en la que varias secuencias de nucleótidos han sido unidas o recombinadas en una construcción única que es capaz de introducir un fragmento promotor y una secuencia de ADN para un producto genético seleccionado junto con una secuencia no traducida 3' apropiada en una célula. “Caja de transformación” hace referencia a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos además del gen extraño que facilita la transformación de una célula huésped particular. “Caja de expresión” hace referencia a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos además del gen extraño que permiten una expresión potenciada de ese gen en un huésped extraño.
- Como se emplea en la presente memoria, el término “degeneración de codón” hace referencia a la naturaleza en el código genético que permite la variación de la secuencia de nucleótidos sin afectar a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado. El experto en la materia conoce bien la “preferencia a codones” exhibida por una célula huésped específica en la utilización de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Por lo tanto, cuando se sintetiza un gen para una expresión mejorada en una célula huésped, es deseable diseñar el gen de tal modo que su frecuencia de utilización de codones se acerca a la frecuencia de utilización de codones preferida de la célula huésped.

El término “optimizado por codones”, cuando hace referencia a genes o regiones codificantes de moléculas de ácidos nucleicos para la transformación de diversos huéspedes, hace referencia a la alteración de codones en el gen o regiones codificantes de las moléculas de ácidos nucleicos para reflejar la utilización de codones típica del organismo huésped sin alterar el polipéptido codificado por el ADN. Tal optimización incluye reemplazar al menos uno, o más que uno, o un número significativo de codones con uno o más codones que son usados más frecuentemente en los genes de ese organismo.

Las desviaciones en la secuencia de nucleótidos que comprenden los codones que codifican los aminoácidos de cualquier cadena polipeptídica permiten variaciones en la secuencia que codifica para el gen. Dado que cada codón consiste en tres nucleótidos, y los nucleótidos que comprenden ADN están restringidos a cuatro bases específicas, hay 64 combinaciones posibles de nucleótidos, 61 de las cuales codifican aminoácidos (los tres codones restantes codifican señales que terminan la traducción). El “código genético” que muestra qué codones codifican qué aminoácidos se reproduce en la presente memoria como Tabla 2A. Como resultado, muchos aminoácidos son designados por más que un codón. Por ejemplo, los aminoácidos alanina y prolina son codificados por cuatro tripletes, la serina y arginina por seis, mientras que el triptófano y la metionina son codificados por sólo un triplete. Esta degeneración permite que la composición de bases del ADN varíe sobre un amplio intervalo sin alterar la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por el ADN.

Tabla 2A: El código genético estándar

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F) TTC “ TTA Leu (L) TTG “	TCT Ser (S) TCC “ TCA “ TCG “	TAT Tyr (Y) TAC “ TAA Stop TAG Stop	TGT Cys (C) TGC TGA Stop TGG Trp (W)
C	CTT Leu (L) CTC “ CTA “ CTG “	CCT Pro (P) CCC “ CCA “ CCG “	CAT His (H) CAC “ CAA Gln (Q) CAG “	CGT Arg (R) CGC “ CGA “ CGG “
A	ATT Ile (I) ATC “ ATA “ ATG Met (M)	ACT Thr (T) ACC “ ACA “ ACG “	AAT Asn (N) AAC “ AAA Lys (K) AAG “	AGT Ser (S) AGC “ AGA Arg (R) AGG “
G	GTT Val (V) GTC “ GTA “ GTG “	GCT Ala (A) GCC “ GCA “ GCG “	GAT Asp (D) GAC “ GAA Glu (E) GAG “	GGT Gly (G) GGC “ GGA “ GGG “

Muchos organismos presentan una tendencia al uso de codones particulares para codificar para la inserción de un aminoácido particular en una cadena peptídica creciente. La preferencia de codones, o tendencia de codones, las diferencias en la utilización de codones entre organismos, es proporcionada por la degeneración del código genético, y está bien documentada entre muchos organismos. La tendencia de codones a menudo se correlaciona con la eficacia de la traducción del ARN mensajero (ARNm), que a su vez se cree que es dependiente de, entre otros, las propiedades de los codones que se traducen y la disponibilidad de moléculas de ARN de transferencia (ARNt). La predominancia de ARNts seleccionados en una célula es generalmente un reflejo de los codones usados más frecuentemente en la síntesis de péptidos.

Por consiguiente, los genes pueden ser adaptados para una expresión de genes óptima en un organismo dado en base a la optimización por codones.

Dado el gran número de secuencias de genes disponibles para una amplia variedad de especies animales, vegetales y microbianas, es posible calcular las frecuencias relativas de utilización de codones. Están fácilmente disponibles tablas de utilización de codones, por ejemplo, en el "Codon Usage Database" disponible en <http://www.kazusa.or.jp/codon/> (visitada el 20 de marzo de 2008), y estas tablas pueden ser adaptadas de varias maneras. Véase Nakamura, Y., et al. Nucl. Acids Res. 28:292 (2000). Las tablas de utilización de codones para la levadura, calculadas a partir de GenBank Release 128.0 [15 de febrero de 2002], se reproducen a continuación como Tabla 2B. Esta tabla usa la nomenclatura de ARNm, y por tanto, en lugar de timina (T), que se encuentra en el ADN, las tablas usan uracilo (U), que se encuentra en el ARN. La Tabla 2B ha sido adaptada para que se calculen las frecuencias para cada aminoácido, en vez de para los 64 codones.

Tabla 2B: Tabla de utilización de codones para *Saccharomyces cerevisiae*

Aminoácido	Codón	Número	Frecuencia por mil
Phe	UUU	170666	26,1
Phe	UUC	120510	18,4
Leu	UUA	170884	26,2
Leu	UUG	177573	27,2
Leu	CUU	80076	12,3
Leu	CUC	35545	5,4
Leu	CUA	87619	13,4
Leu	CUG	68494	10,5
Ile	AUU	196893	30,1
Ile	AUC	112176	17,2
Ile	AUA	116254	17,8
Met	AUG	136805	20,9
Val	GUU	144243	22,1
Val	GUC	76947	11,8
Val	GUA	76927	11,8
Val	GUG	70337	10,8
Ser	UCU	153557	23,5
Ser	UCC	92923	14,2
Ser	UCA	122028	18,7
Ser	UCG	55951	8,6

ES 2 735 024 T3

Aminoácido	Codón	Número	Frecuencia por mil
Ser	AGU	92466	14,2
Ser	AGC	63726	9,8
Pro	CCU	88263	13,5
Pro	CCC	44309	6,8
Pro	CCA	119641	18,3
Pro	CCG	34597	5,3
Thr	ACU	132522	20,3
Thr	ACC	83207	12,7
Thr	ACA	116084	17,8
Thr	ACG	52045	8,0
Ala	GCU	138358	21,2
Ala	GCC	82357	12,6
Ala	GCA	105910	16,2
Ala	GCG	40358	6,2
Tyr	UAU	122728	18,8
Tyr	UAC	96596	14,8
His	CAU	89007	13,6
His	CAC	50785	7,8
Gln	CAA	178251	27,3
Gln	CAG	79121	12,1
Asn	AAU	233124	35,7
Asn	AAC	162199	24,8
Lys	AAA	273618	41,9
Lys	AAG	201361	30,8
Asp	GAU	245641	37,6
Asp	GAC	132048	20,2
Glu	GAA	297944	45,6
Glu	GAG	125717	19,2

Aminoácido	Codón	Número	Frecuencia por mil
Cys	UGU	52903	8,1
Cys	UGC	31095	4,8
Trp	UGG	67789	10,4
Arg	CGU	41791	6,4
Arg	CGC	16993	2,6
Arg	CGA	19562	3,0
Arg	CGG	11351	1,7
Arg	AGA	139081	21,3
Arg	AGG	60289	9,2
Gly	GGU	156109	23,9
Gly	GGC	63903	9,8
Gly	GGA	71216	10,9
Gly	GGG	39359	6,0
Stop	UAA	6913	1,1
Stop	UAG	3312	0,5
Stop	UGA	4447	0,7

Utilizando esta tabla o similares, un experto habitual en la técnica puede aplicar las frecuencias a cualquier secuencia polipeptídica dada, y producir un fragmento de ácido nucleico de una región codificante optimizada por codones que codifica el polipéptido, pero que usa codones óptimos para una especie dada.

- 5 Asignar al azar codones a una frecuencia optimizada para codificar una secuencia polipeptídica dada puede hacerse manualmente calculando las frecuencias de codón para cada aminoácido, y asignando después los codones a la secuencia polipeptídica al azar. Adicionalmente, están disponible para los expertos habituales en la técnica diversos algoritmos y programas informáticos. Por ejemplo, la función "EditSeq" en el Paquete Lasergene, disponible en DNASTar, Inc., Madison, WI, la función de retrotraducción en el Paquete VectorNTI, disponible en InforMax, Inc., Bethesda, MD, y la función "retrotraducir" en el Paquete GCG-Wisconsin, disponible en Accelrys, Inc., San Diego, CA.
- 10 Además, están disponibles públicamente varios recursos para optimizar por codones secuencias de regiones codificantes, p.ej., la función de "retrotraducción" en <http://www.entelechon.com/bioinformatics/backtranslation.php?lanl=eng> (visitada el 15 de abril de 2008) y la función "retro-transeq" disponible en <http://bioinfo.pbi.nrc.ca:8090/EMBOSS/index.html> (visitada el 9 de julio de 2002).
- 15 Construir un algoritmo rudimentario para asignar codones en base a una frecuencia dada también puede ser llevado a cabo fácilmente con funciones matemáticas básicas por un experto habitual en la técnica.

Las regiones codificantes optimizadas en codones pueden diseñarse por diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen paquetes informáticos tales como "diseñador de genes sintéticos" (userpages.umbc.edu/~wug1/codon/sgd/, visitada el 19 de marzo de 2012).

- 20 Un polinucleótido o fragmento de ácido nucleico es "hibridable" a otro fragmento de ácido nucleico, tal como un ADNc, ADN genómico, o molécula de ARN, cuando una forma de hebra única del fragmento de ácido nucleico puede combinarse con el otro fragmento de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica en disolución. Las condiciones de hibridación y lavado son bien conocidas, y se ilustran en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989), particularmente el Capítulo 11 y la Tabla 11.1 en el mismo. Las condiciones de temperatura y fuerza iónica
- 25 determinan la "astringencia" de la hibridación. Las condiciones de astringencia pueden ajustarse para cribar fragmentos moderadamente similares (tales como secuencias homólogas de organismos relacionados lejanamente), a fragmentos altamente similares (tales como genes que duplican enzimas funcionales de organismos relacionados estrechamente). Los lavados post-hibridación determinan las condiciones de astringencia. Un juego de condiciones usa una serie de lavados que parten de 6X SSC, 0,5% SDS a temperatura ambiente durante 15 minutos, repetido
- 30 después con 2X SSC, 0,5% SDS a 45°C durante 30 min, y repetido después dos veces con 0,2X SSC, 0,5% SDS a

50°C durante 30 min. Otro juego de condiciones astringentes usa temperaturas más altas, en las que los lavados son idénticos a los anteriores excepto que la temperatura de los dos lavados de 30 min finales en 0,2X SSC, 0,5% SDS se aumentó hasta 60°C. Otro juego de condiciones altamente astringentes usa dos lavados finales en 0,1X SSC, 0,1% SDS a 65°C. Un juego adicional de condiciones astringentes incluye una hibridación a 0,1X SSC, 0,1% SDS, 65°C y lavados con 2X SSC, 0,1% SDS seguido de 0,1X SSC, 0,1% SDS, por ejemplo.

La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la astringencia de la hibridación, son posibles las discordancias entre bases. La astringencia apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y el grado de complementación, variables bien conocidas en la técnica. Cuanto mayor es el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor es el valor de T_m para los híbridos de ácidos nucleicos que tengan esas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a un T_m más alto) de las hibridaciones de ácidos nucleicos disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos mayores que 100 nucleótidos de longitud, se han derivado ecuaciones para calcular T_m (véase Sambrook et al, arriba, 9.50-9.51). Para hibridaciones con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de las discordancias se hace más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook et al, arriba, 11.7-11.8). En una realización la longitud para un ácido nucleico hibridable es al menos aproximadamente 10 nucleótidos. En una realización, una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es al menos aproximadamente 15 nucleótidos; al menos aproximadamente 20 nucleótidos; o la longitud es al menos aproximadamente 30 nucleótidos. Además, el experto en la materia reconocerá que la temperatura y concentración salina de la disolución de lavado puede ajustarse como sea necesario según factores tales como la longitud de la sonda.

Como se emplea en la presente memoria, el término "polipéptido" pretende abarcar un "polipéptido" singular, así como "polipéptidos" plurales, y hace referencia a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) enlazados linealmente por enlaces amida (conocidos también como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" hace referencia a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no hace referencia a una longitud específica del producto. Por tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos", o cualquier otro término usado para hacer referencia a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, están incluidos dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" puede usarse en lugar de, o de manera intercambiable con, cualquiera de estos términos. Un polipéptido puede derivar de una fuente biológica natural o producirse por tecnología recombinante, pero no es traducido necesariamente desde una secuencia de ácidos nucleicos designada. Puede generarse de cualquier manera, incluyendo por síntesis química.

Mediante un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante o derivado del mismo se quiere decir un polipéptido que no está en su entorno natural. No se requiere ningún nivel de purificación particular. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede ser retirado de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de manera recombinante expresados en células huésped se consideran aislados para los fines de la descripción, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados, o purificados parcialmente o sustancialmente por cualquier técnica adecuada.

Como se emplea en la presente memoria, los términos "variante" y "mutante" son sinónimos y hacen referencia a un polipéptido que difiere de un polipéptido recitado específicamente en una o más inserciones, deleciones, mutaciones y sustituciones de aminoácidos, creadas usando, p.ej., técnicas de ADN recombinante, tales como mutagénesis. Puede encontrarse una guía para determinar qué residuos de aminoácidos pueden ser reemplazados, añadidos o borrados sin abolir actividades de interés, comparando la secuencia del polipéptido particular con la de polipéptidos homólogos, p.ej., de levadura o bacterianos, y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos hechos en regiones de alta homología (regiones conservadas) o reemplazando aminoácidos con secuencias de consenso.

"Polipéptido diseñado", como se emplea en la presente memoria, hace referencia a un polipéptido que es sintético, es decir, que difiere de alguna manera de un polipéptido encontrado en la naturaleza.

Alternativamente, pueden sintetizarse o seleccionarse variantes de polinucleótidos recombinantes que codifican estos mismos o similares polipéptidos haciendo uso de la "redundancia" en el código genético. Pueden introducirse diversas sustituciones de codones, tales como cambios silenciosos que producen diversos sitios de restricción, para optimizar la clonación en un plásmido o vector vírico para expresión. Las mutaciones en la secuencia del polinucleótido pueden reflejarse en el polipéptido o dominios de otros péptidos añadidos al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido. Por ejemplo, pueden usarse mutaciones para reducir o eliminar la expresión de una proteína diana, e incluyen, pero no se limitan a, delección del gen entero o una porción del gen, inserción de un fragmento de ADN en el gen (en el promotor o bien la región codificante) para que la proteína no se exprese o se exprese en niveles más bajos, introducir una mutación en la región codificante que añade un codón de parada o desplazamiento estructural de tal modo que una proteína funcional no se exprese, e introducir una o más mutaciones en la región codificante para alterar aminoácidos para que se exprese una proteína no funcional o una menos activa enzimáticamente.

Las "sustituciones" de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir, reemplazos de aminoácidos conservativos, o pueden

ser el resultado de reemplazar un aminoácido con un aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes, es decir, reemplazos de aminoácidos no conservativos. Las sustituciones de aminoácidos “conservativas” pueden hacerse en base a similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Alternativamente, las sustituciones de aminoácidos “no conservativas” pueden hacerse seleccionando las diferencias en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, o la naturaleza anfipática de cualquiera de estos aminoácidos. Las “inserciones” o “deleciones” pueden estar dentro del intervalo de variación tolerado estructuralmente o funcionalmente por las proteínas recombinantes. La variación permitida puede determinarse experimentalmente haciendo sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en una molécula de polipéptido usando técnicas de ADN recombinante y ensayando las variantes recombinantes resultantes en cuanto a actividad.

Una “porción sustancial” de una secuencia de aminoácidos o nucleótidos es la porción que comprende lo suficiente de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o la secuencia de nucleótidos de un gen para identificar putativamente ese polipéptido o gen, bien por evaluación manual de la secuencia por un experto en la técnica, o bien por comparación y/o identificación de secuencias automatizada por ordenador usando algoritmos tales como BLAST (Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1993)). En general, es necesaria una secuencia de diez o más aminoácidos contiguos o treinta o más nucleótidos para identificar putativamente una secuencia de polipéptidos o ácidos nucleicos como homóloga a una proteína o gen conocidos. Además, con respecto a secuencias de nucleótidos, pueden usarse sondas de oligonucleótidos específicas a genes que comprenden 20-30 nucleótidos contiguos en métodos dependientes de secuencias de identificación de genes (p.ej., hibridación Sureña) y aislamiento (p.ej., hibridación in situ de colonias bacterianas o placas de bacteriófagos). Además, pueden usarse oligonucleótidos cortos de 12-15 bases como cebadores de amplificación en PCR para obtener un fragmento de ácido nucleico particular que comprende los cebadores. Por consiguiente, una “porción sustancial” de una secuencia de nucleótidos comprende lo suficiente de la secuencia para identificar específicamente y/o aislar un fragmento de ácido nucleico que comprende la secuencia. La presente memoria descriptiva explica la secuencia de aminoácidos y nucleótidos completa que codifica proteínas particulares. El experto en la materia, que tiene el beneficio de las secuencias reportadas en la presente memoria, puede usar ahora todo o una porción sustancial de las secuencias descritas para fines conocidos por los expertos en esta técnica. Por consiguiente, la presente descripción comprende las secuencias completas reportadas en el Listado de Secuencias acompañante, así como porciones sustanciales de esas secuencias definidas anteriormente.

El término “complementarias” se usa para describir la relación entre bases de nucleótidos que son capaces de hibridarse unas a otras. Por ejemplo, con respecto al ADN, la adenina es complementaria a la timina y la citosina es complementaria a la guanina, y con respecto al ARN, la adenina es complementaria al uracilo y la citosina es complementaria a la guanina.

La expresión “porcentaje de identidad”, como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada comparando las secuencias. En la técnica, “identidad” también significa el grado de relación de secuencias entre secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, como pueda ser el caso, determinada por la concordancia entre cuerdas de tales secuencias. La “identidad” y “similitud” pueden calcularse fácilmente por métodos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en: 1.) Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., Ed.) Oxford University: NY (1988); 2.) Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., Ed.) Academic: NY (1993); 3.) Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A.M. and Griffin, H. G., eds.) Humana: NJ (1994); 4.) Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., Ed.) Academic (1987); y 5.) Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. y Devereux, J., Eds.) Stockton: NY (1991).

Los métodos para determinar la identidad están diseñados para dar la mejor concordancia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos disponibles públicamente. Las alineaciones de secuencias y cálculos de porcentajes de identidad pueden realizarse usando el programa MegAlign™ del paquete de computación bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Las alineaciones múltiples de secuencias se realizan usando el “método de alineación Clustal” que abarca varias variedades del algoritmo que incluye el “método de alineación Clustal V” correspondiente al método de alineación etiquetado como Clustal V (descrito por Higgins y Sharp, CABIOS. 5:151-153 (1989); Higgins, D. G. et al., Comput. Appl. Biosci., 8:189-191 (1992)) y encontrado en el programa MegAlign™ del paquete de computación bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc.). Para alineaciones múltiples, los valores por defecto corresponden a GAP PENALTY=10 y GAP LENGTH PENALTY=10. Los parámetros por defecto para alineaciones por pares y el cálculo de porcentajes de identidad de secuencias de proteínas usando el método Clustal son KTUPLE=1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 y DIAGONALS SAVED=5. Para ácidos nucleicos estos parámetros son KTUPLE=2, GAP PENALTY=5, WINDOW=4 y DIAGONALS SAVED=4. Después de la alineación de las secuencias usando el programa Clustal V, es posible obtener un “porcentaje de identidad” viendo la tabla de “distancias de secuencias” en el mismo programa. Adicionalmente está disponible el “método de alineación Clustal W”, y corresponde al método de alineación etiquetado como Clustal W (descrito por Higgins y Sharp, CABIOS. 5:151-153 (1989); Higgins, D. G. et al., Comput. Appl. Biosci., 8:189-191 (1992)) y encontrado en el programa MegAlign™ v6.1 del paquete de computación bioinformática

LASERGENE (DNASTAR Inc.). Los parámetros por defecto para alineación múltiple (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,2, Secs. Divergentes de Retardo(%)=30, Peso de Transición de ADN=0,5, Matriz de Peso de Proteína=Serie Gonnet, Matriz de Peso de ADN=IUB). Después de la alineación de las secuencias usando el programa Clustal W, es posible obtener un "porcentaje de identidad" viendo la tabla de "distancias de secuencias" en el mismo programa.

En bien entendido por un experto en la técnica que son útiles muchos niveles de identidad de secuencias en la identificación de polipéptidos, tal como de otras especies, en donde tales polipéptidos tienen la misma o similar función o actividad, o en la descripción de los polinucleótidos correspondientes. Los ejemplos útiles de porcentajes de identidad incluyen, pero no se limitan a: 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o puede ser útil cualquier porcentaje en número entero de 55% a 100% en la descripción de la presente descripción, tales como 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Los fragmentos de polinucleótidos adecuados no solo tienen las homologías anteriores, sino que comprenden típicamente un polinucleótido que tiene al menos 50 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos, al menos 150 nucleótidos, al menos 200 nucleótidos o al menos 250 nucleótidos. Además, los fragmentos de polinucleótidos adecuados que tienen las homologías anteriores codifican un polipéptido que tiene al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, al menos 200 aminoácidos o al menos 250 aminoácidos.

La expresión "programa de análisis de secuencias" hace referencia a cualquier algoritmo de ordenador o programa informático que es útil para el análisis de secuencias de nucleótidos o aminoácidos. El "programa informático de análisis de secuencias" puede estar disponible en el mercado o desarrollarse independientemente. Un programa informático de análisis de secuencias típico incluirá, pero no se limita a: 1.) el paquete de programas GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); 2.) BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)); 3.) DNASTAR (DNASTAR, Inc. Madison, WI); 4.) Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI); y 5.) el programa FASTA que incorpora el algoritmo de Smith-Waterman (W. R. Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandor. Plenum: New York, NY). Dentro del contexto de esta solicitud se entenderá que donde se usa un programa informático de análisis de secuencias para análisis, los resultados del análisis estarán basados en los "valores por defecto" del programa referenciado, a menos que se especifique de otro modo. Como se emplea en la presente memoria, "valores por defecto" significarán cualquier juego de valores o parámetros que se cargan originariamente con el programa informático cuando se inicia por primera vez.

Las técnicas estándar de ADN recombinante y clonación molecular se conocen bien en la técnica y son descritas por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) (en lo sucesivo "Maniatis"); y por Silhavy, T. J., Bannan, M. L. y Enquist, L. W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1984); y por Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987). Los métodos adicionales usados aquí están en Methods in Enzymology, Volume 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology (Part A, 2004, Christine Guthrie y Gerald R. Fink (Eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, CA). Se conocen en la técnica otras herramientas y técnicas moleculares, e incluyen división por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con extensión solapante (Yu et al. (2004) Fungal Genet. Biol. 41:973-981), selección positiva para mutaciones en el locus URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* (Boeke, J.D. et al. (1984) Mol. Gen. Gent. 197, 345-346; M A Romanos, et al. Nucleic Acids Res. 11 Enero 1991; 19(1): 187), el sistema de recombinación específico a sitio cre-lox, así como sitios lox mutantes y mutaciones de sustrato FLP (Sauer, B. (1987) Mol Cell Biol 7:2087-2096; Senecoff, et al. (1988) Journal of Molecular Biology, Volumen 201, Número 2, Páginas 405-421; Albert, et al. (1995) The Plant Journal. Volumen 7, Número 4, páginas 649-659), delección de genes "sin costuras" (Akada, et al. (2006) Yeast;23(5):399-405), y metodología de reparación de huecos (Ma et al., Genetics 58:201-216; 1981).

Polipéptidos con actividad GPD

La "glicerol-3-fosfato deshidrogenasa" o "GPD" dependiente de NAD endógena es una enzima clave en la síntesis de glicerol, que convierte el fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) en glicerol-3-fosfato. Los términos "glicerol-3-fosfato deshidrogenasa" y "GPD" hacen referencia a cualquier polipéptido (o polipéptidos) que tiene la función biológica de la GPD. Tales polipéptidos incluyen polipéptidos que tienen una actividad enzimática que cataliza la conversión de fosfato de dihidroxiacetona en glicerol-3-fosfato. Las GPDs están ampliamente extendidas en la naturaleza y pueden clasificarse en tres categorías. En la primera categoría, EC 1.1.1.8, una GPD es una enzima citoplasmática soluble donde el cofactor redox es la pareja NAD/NADH, las GPDs en la categoría EC 1.1.1.8 se describen como específicas a NADH, pero esto no excluye que algunas de las GPDs puedan tener una actividad mensurable con NADPH. La GPD1 de *Saccharomyces cerevisiae* es un ejemplo de este tipo de GPD (Albertyn et. Al, 1992, FEBS Lett 308: 130-132; Valadi, et al, 2004, J. Biol. Chem 279: 39677-39685). Otro ejemplo es la GPD1 humana, para la que hay múltiples estudios estructurales tridimensionales (Ou et al, 2005, J.Mol.Biol. 357: 858-869). Los ensayos para enzimas en esta categoría pueden utilizar la medida espectrofotométrica de la oxidación de NADH en presencia de DHAP y la enzima GPD (Niesel et al. 1982 Methods Enzymol 89: 296-301). La segunda categoría, EC 1.1.5.3, las enzimas GPD son proteínas de membrana intrínsecas de la membrana mitocondrial interna, y contienen un cofactor de flavina, y equivalentes reductores son transferidos a la pareja quinona/quinol en la mitocondria. Hay una tercera categoría menor

de GPDs, EC 1.1.1.94, que utilizan NADH o bien NADPH con sustancialmente la misma afinidad. Las GPDs de la tercera categoría menor también pueden ser inhibidas en retroalimentación por el glicerol-3-fosfato.

Los microorganismos recombinantes tales como la levadura pueden tener uno o más genes endógenos que codifican glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD). En algunas levaduras, tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *P. stipitis*, GPD1 y GPD2 son homólogos funcionales. Cualquiera de los genes que codifican enzimas GPD de levadura puede ser alterado para reducir la actividad GPD en una célula de levadura.

Uno de los mecanismos clave de la pérdida de rendimiento en la producción de butanol en levaduras es la pérdida de carbono y equivalentes reductores que son desviados de la glicólisis por la conversión de fosfato de dihidroxiacetona en glicerol. Dado que la GPD cataliza la primera etapa en esta conversión de fosfato de dihidroxiacetona en glicerol, la actividad de la GPD puede contribuir a la producción de glicerol y la pérdida del rendimiento de butanol. Como resultado, algunos han considerado eliminar la función de la GPD (por ejemplo, eliminando el gen que codifica la proteína GPD) en la levadura productora de butanol. Sin embargo, se requiere glicerol para el crecimiento, y es un osmoprotector importante. Por tanto, retener la capacidad de producir algo de glicerol ofrece ciertas ventajas.

Una manera de retener la capacidad de producir glicerol, pero también mejorar la producción del alcohol producto, es alterar la especificidad al cofactor de la GPD. La GPD1 de *Saccharomyces cerevisiae* favorece generalmente el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido ("NADH") en la catálisis de la primera etapa en la conversión de fosfato de dihidroxiacetona en glicerol en una célula de levadura. Sin embargo, como se demuestra en la presente memoria, las enzimas GPD también pueden usar el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ("NADPH").

El uso de enzimas GPD con preferencia por NADPH en comparación con NADH puede permitir a las células huésped retener la capacidad para producir glicerol en condiciones metabólicas diferentes cuando se comparan con enzimas con una preferencia por NADH. Sin embargo, esta producción de glicerol puede ser limitada ventajosamente en condiciones anaeróbicas cuando la producción de NADPH es limitada.

Al mismo tiempo, disminuir la preferencia por NADH por la GPD puede aumentar la disponibilidad de NADH en una célula huésped. El NADH también es usado por otras enzimas en una ruta de producción de alcohol producto, por ejemplo, en la ruta de producción de isobutanol el NADH disponible puede ser utilizado por KARI y alcohol deshidrogenasa. Por tanto, disminuir la afinidad de la GPD por NADH puede aumentar la producción del alcohol producto (p.ej., isobutanol). Por consiguiente, en algunas realizaciones, la GPD diseñada se expresa en un microorganismo recombinante que también expresa una enzima que utiliza NADH, por ejemplo, una enzima que utiliza NADH que actúa en la ruta de producción de isobutanol tal como KARI y alcohol deshidrogenasa.

Una manera adicional de mejorar la producción de un alcohol producto (p.ej., butanol) es alterar la GPD para disminuir la K_M para NADPH. Disminuir la K_M para NADPH alterando la GPD puede aumentar la velocidad de oxidación del NADPH catalizada por GPD, permitiendo así un aumento en la disponibilidad de NADH en la célula huésped. El NADH disponible puede ser usado por otras enzimas en la ruta de producción de alcohol producto, por ejemplo, en la ruta de producción de isobutanol NADH disponible puede ser utilizado por KARI y alcohol deshidrogenasa. Por tanto, aumentar la afinidad de la GPD por NADPH puede aumentar la producción del alcohol producto (p.ej., isobutanol). Por consiguiente, en algunas realizaciones, la JPD diseñada por ingeniería genética se expresa en un microorganismo recombinante que también expresa otras enzimas que utilizan NADH, por ejemplo, una enzima que utiliza NADH que actúa en la ruta de producción de isobutanol tal como KARI y alcohol deshidrogenasa.

Otra manera de retener la capacidad de producir algo de glicerol y mejorar también la producción de alcohol producto es usar enzimas GPD heterólogas que pueden reducir la cantidad de glicerol producida en comparación con la cantidad producida por las enzimas GPD endógenas. Un ejemplo de enzima heteróloga es la *gpsA* de *E. coli*. Dos rasgos mecánicos de la *gpsA* de *E. coli* que pueden contribuir a su capacidad para producir menos glicerol incluyen (1) la *gpsA* es inhibida en producto por glicerol-3-fosfato, y (2) la *gpsA* utiliza los cofactores NADH y NADPH con sustancialmente la misma afinidad (Edgar y Bell, JBC 255:3492-7 (1980)) y en ciertas condiciones esto también puede permitir la producción de glicerol usando NADPH, permitiendo así la disponibilidad de NADH en la célula huésped. La inhibición en producto por glicerol-3-fosfato en *Saccharomyces* puede dar como resultado una producción de glicerol reducida, especialmente si la reacción enzimática de glicerol-3-fosfato fosfatasa es más lenta que la reacción enzimática que la GPD. Las constantes de Michaelis publicadas para las fosfatasas de *Saccharomyces* GPP1 y GPP2 son 3,1 y 3,9, respectivamente (Norbeck, JBC 271:13875-81 (1996), que es casi 1.000 veces más alta que la constante de inhibición (K_i) del glicerol-3-fosfato en *gpsA* de *E. coli* (Edgar y Bell, JBC 253:6345-63 (1978)). La mayoría de condiciones son favorables para la inhibición de producto por glicerol-3-fosfato.

Las enzimas GPD que pueden utilizar NADH o NADPH y/o son inhibidas en retroalimentación por glicerol-3-fosfato pueden incluir tanto proteínas existentes en la naturaleza como proteínas diseñadas. Por ejemplo, se describen enzimas GPD que utilizan NADH o que utilizan NADPH por EC 1.1.1.94 y se han encontrado en *Aspergillus oryzae*, *Candida versatilis*, *Escherichia coli* y *Oryctolagus cuniculus*.

En algunos ejemplos, la GPD heteróloga descrita en la presente memoria es una GPD de *Leishmania mexicana*, *Dunaliella viridis*, *Jaculus orientalis*, *Archeoglobus fulgidus*, *Rickettsia prowazekii*, *Beggiatoa alba*, *Kangiella koreenis*, *Aspergillus oryzae*, *Candida versatilis*, *Escherichia coli* o *Oryctolagus cuniculus*.

En ciertas realizaciones, las secuencias de otras enzimas GPD que pueden utilizar NADH o bien NADPH y/o son inhibidas en retroalimentación por glicerol-3-fosfato puede ser identificadas en la bibliografía, y pueden identificarse candidatos en bases de datos de bioinformática bien conocidas por el experto en la materia usando secuencias descritas en la presente memoria y disponibles en la técnica. Por ejemplo, tales secuencias pueden ser identificadas mediante una búsqueda BLAST de bases de datos disponibles públicamente con secuencias de polinucleótidos o polipéptidos que codifican GPD conocidas. En tal método, las identidades pueden estar basadas en el método de alineación Clustal W usando los parámetros por defectos GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 0,1, y la serie Gonnet 250 de matriz de peso de proteína.

Adicionalmente, pueden usarse secuencias de polinucleótidos o polipéptidos de GPD descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica para identificar otros homólogos de GPD candidatos en la naturaleza. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican GPD descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica pueden usarse para aislar genes que codifican proteínas homólogas. El aislamiento de genes homólogos usando protocolos dependientes de secuencias incluyen, pero no se limitan a (1) métodos de hibridación de ácidos nucleicos; (2) métodos de amplificación de ADN Y ARN, ilustrados por diversos usos de tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos (p.ej., reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Mullis et al; patente de EE.UU. N° 4.683.202; reacción en cadena de la ligasa (LCR), Tabor, S. et al; PNAS USA 82:1074 (1985); o amplificación por desplazamiento de hebras (SDA), Walker et al; PNAS USA 89:392 (1992)]; y (3) métodos de construcción de librerías y cribado por complementación.

Otra manera de mejorar la producción de un alcohol producto es alterar la GPD para aumentar la K_M para NADH. Aumentar la K_M para NADH alterando la GPD puede disminuir la velocidad de oxidación del NADH catalizada por GPD, permitiendo así un aumento en la disponibilidad de NADH en una célula huésped. El NADH puede ser usado por otras enzimas en la ruta de producción del alcohol producto, por ejemplo, en la ruta de producción de isobutanol el NADH disponible puede ser utilizado por KARI y alcohol deshidrogenasa. Por tanto, disminuir la afinidad de la GPD por NADH puede aumentar la producción del alcohol producto (p.ej., isobutanol). Por consiguiente, en algunas realizaciones, la GPD diseñada se expresa en un microorganismo recombinante que también expresa otras enzimas que utilizan NADH, por ejemplo, una enzima que utiliza NADH que actúa en la ruta de producción de isobutanol tal como KARI y alcohol deshidrogenasa.

Las enzimas GPD con una K_M para NADH aumentada también pueden producirse por medio de diseño de proteínas por ingeniería genética. En la invención, la GPD tiene al menos 90% o 95% de identidad a la GPD1 de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 195), pero no es 100% idéntica a SEQ ID NO:195. La GPD comprende al menos una sustitución en un residuo que corresponde a la posición 73 o 129 de la GPD1 de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO:195). Puede haber sustituciones adicionales en un residuo que corresponde a la posición 42, 44, 45, 71, 75, 95, 124, 126, 151, 152, 183, 184, 185, 246, 310, 336, 337 o 339.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la GPD comprende una sustitución del residuo que corresponde a la posición 44 de SEQ ID NO:195 (Asn en SEQ ID NO:195) a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, C, G, I, L, M, S y V.

En algunas realizaciones, la GPD comprende una sustitución del residuo que corresponde a la posición 45 de SEQ ID NO:195 (Trp en SEQ ID NO:195) a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T y V.

En algunas realizaciones, la GPD comprende una sustitución del residuo que corresponde a la posición 73 de SEQ ID NO:195 (Phe en SEQ ID NO:195) a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en G, A, R y K.

En algunas realizaciones, la GPD comprende una sustitución del residuo que corresponde a la posición 129 de SEQ ID NO:195 (Phe en SEQ ID NO:195) a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en G, A, R y K.

En algunas realizaciones, la GPD comprende una sustitución del residuo que corresponde a la posición 337 de SEQ ID NO:195 (Ser en SEQ ID NO:195) a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, C, D, E, G, I, L, M, N, Q y V.

En algunas realizaciones, la GPD comprende una sustitución del residuo que corresponde a la posición 339 de SEQ ID NO:195 (Gln en SEQ ID NO:195) a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, C, G, I, L, M, S y V.

En algunas realizaciones, la GPD comprende una sustitución del residuo que corresponde a la posición 42, 71, 75, 95, 124, 126, 151, 152, 183, 184, 185, 246, 310, y/o 336 de SEQ ID NO:195 (Ser, Trp, Glu, Tyr, Gln, Pro, Leu, Lys, Asn, Ile, Ala, Asn, Arg, Gln de SEQ ID NO:195, respectivamente) a cualquier otro aminoácido seleccionado de los 19 aminoácidos existentes en la naturaleza.

En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADH que es aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADH que es aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADH que es aproximadamente 0,10 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADH que es aproximadamente 0,15 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADH que es aproximadamente 0,20 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADH

que es aproximadamente 0,30 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADH que es aproximadamente 0,40 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADH que es aproximadamente 0,50 mM a aproximadamente 1 mM. Se describen ensayos para medir la K_M para NADH de la GPD en el Ejemplo 1 más adelante y se conocen en la técnica, véase, p.ej., Niesel et al., *Methods Enzymol.* 89:296-301 (1982). Ciertos ensayos pueden denominarse “ensayos de consumo de NADH”, que hacen referencia a un ensayo enzimático para la determinación de la actividad específica de la enzima GPD, que implica medir la desaparición del cofactor de la GPD, el NADH, de la reacción enzimática.

En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADPH que es aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADPH que es aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADPH que es aproximadamente 0,10 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADPH que es aproximadamente 0,15 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADPH que es aproximadamente 0,20 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADPH que es aproximadamente 0,30 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADPH que es aproximadamente 0,40 mM a aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la GPD tiene una K_M para NADPH que es aproximadamente 0,50 mM a aproximadamente 1 mM. Los ensayos de NADH descritos más adelante en el Ejemplo 1 pueden adaptarse para medir la K_M para NADPH de la GPD reemplazando el NADH con NADPH. Se conocen en la técnica ensayos adicionales para medir la K_M para NADPH de la GPD, véase, p.ej., Niesel et al., *Methods Enzymol.* 89:296-301 (1982). Ciertos ensayos pueden denominarse “ensayos de consumo de NADPH”, que hacen referencia a un ensayo enzimático para la determinación de la actividad específica de la enzima GPD, que implica medir la desaparición del cofactor de la GPD, el NADH, de la reacción enzimática.

En algunas realizaciones, la GPD diseñada puede aumentar el crecimiento de un microorganismo recombinante que comprende la GPD diseñada en comparación con un microorganismo recombinante que no contiene la GPD diseñada.

En algunas realizaciones, la GPD diseñada puede aumentar la producción del alcohol producto (p.ej., isobutanol) de un microorganismo recombinante que comprende la GPD diseñada en comparación con un microorganismo recombinante que no contiene la GPD diseñada.

En algunas realizaciones, la GPD diseñada puede disminuir la producción de glicerol de un microorganismo recombinante que comprende la GPD diseñada en comparación con un microorganismo recombinante que no contiene la GPD diseñada.

En algunas realizaciones, la GPD diseñada puede aumentar la relación de alcohol producto (p.ej., isobutanol) a glicerol producidos por un microorganismo recombinante que comprende la GPD diseñada en comparación con un microorganismo recombinante que no contiene la GPD diseñada.

En algunas realizaciones, la GPD diseñada puede aumentar el rendimiento (p.ej., gramos de isobutanol producidos por gramo de sustrato consumido) de un microorganismo recombinante que comprende la GPD diseñada en comparación con un microorganismo recombinante que no contiene la GPD diseñada.

Por tanto, en un microorganismo recombinante que comprende una ruta biosintética de butanol, una GPD diseñada que tiene una K_M para NADH más alta que la GPD endógena del microorganismo, y una delección o disrupción de un gen endógeno que codifica la GPD, “producción mejorada de butanol” puede hacer referencia a una producción aumentada de butanol, una producción disminuida de glicerol o ambos, en comparación con un microorganismo que carece de la GPD diseñada.

En un microorganismo recombinante que comprende una GPD diseñada que tiene una K_M para NADH más alto que la GPD endógena del microorganismo, y una delección o disrupción de un gen endógeno que codifica la GPD, “producción mejorada de alcohol” puede hacer referencia a una producción aumentada de alcohol, una producción disminuida de glicerol o ambos, en comparación con un microorganismo que carece de la GPD diseñada.

Por tanto, en un microorganismo recombinante que comprende una ruta biosintética de butanol, una GPD heteróloga que tiene sustancialmente la misma afinidad por NADH y NADPH y/o es inhibida en retroalimentación por glicerol-3-fosfato, y una delección o disrupción de un gen endógeno que codifica la GPD, “producción mejorada de butanol” puede hacer referencia a una producción aumentada de butanol, una producción disminuida de glicerol o ambos, en comparación con un microorganismo que carece de la GPD heteróloga.

En un microorganismo recombinante que comprende una GPD heteróloga que tiene sustancialmente la misma afinidad por NADH y NADPH y/o es inhibida en retroalimentación por glicerol-3-fosfato, y una delección o disrupción de un gen endógeno que codifica la GPD, “producción mejorada de alcohol” puede hacer referencia a una producción aumentada de alcohol, una producción disminuida de glicerol o ambos, en comparación con un microorganismo que carece de la GPD heteróloga.

Microorganismos recombinantes

Aunque no se desea estar limitado por una teoría, se cree que los procedimientos descritos en la presente memoria

son útiles en relación con cualquier microorganismo productor de alcohol, particularmente microorganismos recombinantes que producen alcohol.

Los microorganismos recombinantes que producen alcohol son también conocidos en la técnica (p.ej., Ohta et al., Appl. Environ. Microbiol. 57:893-900 (1991); Underwood et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1071-81 (2002); Shen y Liao, Metab. Eng. 10:312-20 (2008); Hahnai et al., Appl. Environ. 73:7814-8 (2007); patente de EE.UU. N° 5.514.583; patente de EE.UU. N° 5.712.133; publicación internacional N° WO 1995/028476; Feldmann et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:354-61 (1992); Zhang et al., Science 267:240-3 (1995); publicación de patente de EE.UU. N° 2007/0031918A1; patente de EE.UU. N° 7.223.575; patente de EE.UU. N° 7.741.119; publicación de patente de EE.UU. N° 2009/0203099A1; publicación de patente de EE.UU. N° 2009/0246846A1; y publicación internacional N° WO 2010/075241).

Por ejemplo, las rutas metabólicas de los microorganismos pueden ser modificadas genéticamente para producir butanol. Estas rutas pueden ser modificadas también para reducir o eliminar metabolitos indeseados, y mejorar de este modo el rendimiento del alcohol producto. La producción de alcohol por un microorganismo se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 7.851.188; 7.993.889; 8.178.328, 8.206.970; las publicaciones de solicitudes de patente de EE.UU. Nos. 2007/0292927; 2008/0182308; 2008/0274525; 2009/0305363; 2009/0305370; 2011/0250610; 2011/0313206; 2011/0111472; 2012/0258873; y 2013/0071898. En ciertas realizaciones, el microorganismo se modifica genéticamente para comprender una ruta biosintética de butanol o una ruta biosintética para un isómero de butanol, tal como 1-butanol, 2-butanol o isobutanol. En ciertas realizaciones, al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco polipéptidos que catalizan conversiones de sustrato a producto en la ruta biosintética de butanol son codificados por polinucleótidos heterólogos en el microorganismo. En ciertas realizaciones, todos los polipéptidos que catalizan las conversiones de sustrato a producto en la ruta biosintética de butanol son codificados por polinucleótidos heterólogos en el microorganismo. Se apreciará que los microorganismos que comprenden una ruta biosintética de butanol pueden comprender además una o más modificaciones genéticas, como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2013/0071898.

En la invención, el microorganismo es *Saccharomyces cerevisiae*.

En la invención, la célula huésped es *Saccharomyces cerevisiae*. Los *Saccharomyces cerevisiae* son bien conocidos en la técnica, y están disponibles a partir de diversas fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, American Type Culture Collection (Rockville, MD), Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre, LeSaffre, Gert Strand AB, Ferm Solutions, North American Bioproducts, Martrex, y Lallemand. Los *S. cerevisiae* incluyen, pero no se limitan a, BY4741, CEN.PK 113-7D, levadura Ethanol Red®, levadura Ferm Pro™, levadura Bio-Ferm®, levadura de alcohol Gert Strand Prestige Batch Turbo, levadura Gert Strand Pot Distillers, levadura Gert Strand Pot Distillers Turbo, levadura FerMax™ Green, levadura FerMax™ Gold, levadura Thermosacc®, BG-1, PE-2, CAT-1, CBS7959, CBS7960 y CBS7961.

En algunas realizaciones, el microorganismo puede ser inmovilizado o encapsulado. Por ejemplo, el microorganismo puede ser inmovilizado o encapsulado usando alginato, alginato de calcio o geles de poliácridamida, o mediante la inducción de la formación de biopelícula sobre diversas matrices de soporte de alta área de superficie tales como diatomeas, celite, tierra de diatomeas, geles de sílice, plásticos o resinas. En algunas realizaciones, puede usarse ISPR en combinación con microorganismos inmovilizados o encapsulados. Esta combinación puede mejorar la productividad, tal como la productividad volumétrica específica, velocidad metabólica, rendimientos de alcohol producto, tolerancia al alcohol producto. Además, la inmovilización y encapsulación pueden minimizar los efectos de las condiciones de proceso, tales como el cizallamiento sobre los microorganismos.

Las rutas biosintéticas para la producción de isobutanol que pueden usarse incluyen las descritas por Donaldson et al. en la patente de EE.UU. N° 7.851.188; la patente de EE.UU. N° 7.993.388; y la publicación internacional N° WO 2007/050671. En una realización, la ruta biosintética de isobutanol comprende las siguientes conversiones de sustrato a producto:

a) piruvato a acetolactato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;

b) el acetolactato de la etapa a) a 2,3-dihidroxiisovalerato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por cetol-ácido reductoisomerasa;

c) el 2,3-dihidroxiisovalerato de la etapa c) a α -cetoisovalerato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por dihidroxiácido deshidratasa;

d) el α -cetoisovalerato de la etapa c) a isobutiraldehído, que puede ser catalizada, por ejemplo, por una α -cetoácido de cadena ramificada descarboxilasa; y

e) el isobutiraldehído de la etapa d) a isobutanol, que puede ser catalizada, por ejemplo, por una alcohol de cadena ramificada deshidrogenasa.

En otra realización, la ruta biosintética de isobutanol comprende las siguientes conversiones de sustrato a producto:

- a) piruvato a acetolactato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;
- b) el acetolactato de la etapa a) a 2,3-dihidroxiisovalerato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por cetol-ácido reductoisomerasa;
- 5 c) el 2,3-dihidroxiisovalerato de la etapa c) a α -cetoisovalerato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por dihidroxiácido deshidratasa;
- d) el α -cetoisovalerato de la etapa c) a valina, que puede ser catalizada, por ejemplo, por transaminasa o valina deshidrogenasa;
- e) la valina de la etapa d) a isobutilamina, que puede ser catalizada, por ejemplo, por valina descarboxilasa;
- f) la isobutilamina de la etapa e) a isobutiraldehído, que puede ser catalizada, por ejemplo, por omega transaminasa;
- 10 g) el isobutiraldehído de la etapa f) a isobutanol, que puede ser catalizada, por ejemplo, por una alcohol de cadena ramificada deshidrogenasa.
- En otra realización, la ruta biosintética de isobutanol comprende las siguientes conversiones de sustrato a producto:
- a) piruvato a acetolactato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;
- 15 b) el acetolactato de la etapa a) a 2,3-dihidroxiisovalerato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por cetol-ácido reductoisomerasa;
- c) el 2,3-dihidroxiisovalerato de la etapa c) a α -cetoisovalerato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por dihidroxiácido deshidratasa;
- d) el α -cetoisovalerato de la etapa c) a isobutiril-CoA, que puede ser catalizada, por ejemplo, por cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa;
- 20 e) la isobutiril-CoA de la etapa d) a isobutiraldehído, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acilación de aldehído deshidrogenasa; y
- f) el isobutiraldehído de la etapa e) a isobutanol, que puede ser catalizada, por ejemplo, por una alcohol de cadena ramificada deshidrogenasa.
- Las rutas biosintéticas para la producción de 1-butanol que pueden usarse incluyen las descritas en la publicación de patente de EE.UU. N° 2008/0182308 y la solicitud de patente internacional WO2007/041269. En una realización, la ruta biosintética de 1-butanol comprende las siguientes conversiones de sustrato a producto:
- 25 a) acetil-CoA a acetoacetil-CoA, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetil-CoA acetiltransferasa;
- b) la acetoacetil-CoA de la etapa a) a 3-hidroxibutiril-CoA, que puede ser catalizada, por ejemplo, por 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa;
- 30 c) la 3-hidroxiacil-CoA de la etapa b) a crotonil-CoA, que puede ser catalizada, por ejemplo, por crotonasa;
- d) la crotonil-CoA de la etapa c) a butiril-CoA, que puede ser catalizada, por ejemplo, por butiril-CoA deshidrogenasa;
- e) la butiril-CoA de la etapa d) a butiraldehído, que puede ser catalizada, por ejemplo, por butiraldehído deshidrogenasa; y
- f) el butiraldehído de la etapa e) a 1-butanol, que puede ser catalizada, por ejemplo, por butanol deshidrogenasa.
- 35 Las rutas biosintéticas para la producción de 2-butanol que pueden usarse incluyen las descritas por Donaldson et al. en la patente de EE.UU. N° 8.206.970; las publicaciones de solicitudes de patente de EE.UU. Nos. 2007/0292927 y 2009/0155870; las publicaciones internacionales Nos. WO 2007/130518 y WO 2007/130521. En una realización, la ruta biosintética de 2-butanol comprende las siguientes conversiones de sustrato a producto:
- a) piruvato a alfa-acetolactato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;
- 40 b) el alfa-acetolactato de la etapa a) a acetoína, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetolactato descarboxilasa;
- c) la acetoína de la etapa b) a 3-amino-2-butanol, que puede ser catalizada, por ejemplo, acetoina aminasa;
- d) el 3-amino-2-butanol de la etapa c) a 3-amino-2-butanol fosfato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por aminobutanol cinasa;
- 45 e) el 3-amino-2-butanol fosfato de la etapa d) a 2-butanona, que puede ser catalizada, por ejemplo, por aminobutanol

fosfato fosforilasa; y

f) la 2-butanona de la etapa e) a 2-butanol, que puede ser catalizada, por ejemplo, por butanol deshidrogenasa.

En otra realización, la ruta biosintética de 2-butanol comprende las siguientes conversiones de sustrato a producto:

a) piruvato a alfa-acetolactato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;

5 b) el alfa-acetolactato de la etapa a) a acetoína, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetolactato descarboxilasa;

c) la acetoína a 2,3-butanodiol de la etapa b), que puede ser catalizada, por ejemplo, por butanodiol deshidrogenasa;

d) el 2,3-butanodiol de la etapa c) a 2-butanona, que puede ser catalizada, por ejemplo, por diol deshidratasa; y,

e) la 2-butanona de la etapa d) a 2-butanol, que puede ser catalizada, por ejemplo, por butanol deshidrogenasa.

10 Las rutas biosintéticas para la producción de 2-butanona que pueden usarse incluyen las descritas en la patente de EE.UU. Nº 8.206.970 y las publicaciones de solicitudes de patente de EE.UU. Nos. 2007/0292927 y 2009/0155870. En una realización, la ruta biosintética de 2-butanona comprende las siguientes conversiones de sustrato a producto:

a) piruvato a alfa-acetolactato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;

15 b) el alfa-acetolactato de la etapa a) a acetoína, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetolactato descarboxilasa;

c) la acetoína de la etapa b) a 3-amino-2-butanol, que puede ser catalizada, por ejemplo, acetoína aminasa;

d) el 3-amino-2-butanol de la etapa c) a 3-amino-2-butanol fosfato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por aminobutanol cinasa; y,

20 e) el 3-amino-2-butanol fosfato de la etapa d) a 2-butanona, que puede ser catalizada, por ejemplo, por aminobutanol fosfato fosforilasa.

En otra realización, la ruta biosintética de 2-butanona comprende las siguientes conversiones de sustrato a producto:

a) piruvato a alfa-acetolactato, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;

b) el alfa-acetolactato de la etapa a) a acetoína, que puede ser catalizada, por ejemplo, por acetolactato descarboxilasa;

25 c) la acetoína de la etapa b) a 2,3-butanodiol, que puede ser catalizada, por ejemplo, por butanodiol deshidrogenasa;

d) el 2,3-butanodiol de la etapa c) a 2-butanona, que puede ser catalizada, por ejemplo, por diol deshidratasa.

30 Los términos “acetohidroxiácido sintasa”, “acetolactato sintasa” y “acetolactato sintetasa” (abreviados como “ALS”) se usan de manera intercambiable en la presente memoria para hacer referencia a una enzima que cataliza la conversión de piruvato a acetolactato y CO₂. Los ejemplos de acetolactato sintasas se conocen por el número EC 2.2.1.6 (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego). Estas enzimas están disponibles de varias fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus subtilis* (Nos. GenBank: CAB07802.1, Z99122, NCBI (National Center for Biotechnology Information) secuencia de aminoácidos, secuencia de nucleótidos NCBI, respectivamente), CAB15618, *Klebsiella pneumoniae* (Nos. GenBank: AAA25079, M73842), y *Lactococcus lactis* (Nos. GenBank:AAA25161, L16975).

35 El término “cetol-ácido reductoisomerasa” (“KARI”), “acetohidroxiácido isomerorreductasa”, y “acetohidroxiácido reductoisomerasa” se usarán de manera intercambiable, y hacen referencia a enzimas capaces de catalizar la reacción de (S)-acetolactato a 2,3-dihidroxiisovalerato. Los ejemplos de enzimas KARI pueden clasificarse como número EC 1.1.1.86 (Enzyme Nomenclature, 1992, Academic Press, San Diego), y están disponibles de un vasto grupo de microorganismos, que incluyen, pero no se limitan a, *Escherichia coli* (Nos. GenBank: NP_418222, NC_000913), *Saccharomyces cerevisiae* (Nos. GenBank: NP_013459, NC_001144), *Methanococcus maripaludis* (Nos. GenBank: CAF30210, BX957220), y *Bacillus subtilis* (Nos. GenBank: CAB14789, Z99118). Los KARIs incluyen las variantes de KARI de *Anaerostipes caccae* “K9G9” (SEQ ID NO:85), “K9D3” (SEQ ID NO:86) y “K9JB4P” (SEQ ID NO:87). Se describen enzimas cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) en las patentes de EE.UU. Nos. 7.910.342 y 8.129.162; las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. Nos. 2008/0261230, 2009/0163376, 2010/0197519, publicación de solicitud PCT Nº WO/2011/041415, publicación de solicitud PCT Nº WO2012/129555; y publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. US 2014/0093930, presentada el 26 de septiembre de 2013. Los ejemplos de KARIs descritos en los mismos son los de mutantes de *Lactococcus lactis*, *Vibrio cholera*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, y *Pseudomonas fluorescens* PF5. En algunas realizaciones, el KARI utiliza NADH. En algunas realizaciones, el KARI utiliza NADPH. En algunas realizaciones, el KARI utiliza NADH o NADPH.

El término “acetohidroxiácido deshidratasa” y “dihidroxiácido deshidratasa” (DHAD”) hace referencia a una enzima que

cataliza la conversión de 2,3-dihidroxiisovalerato a α -cetoisovalerato. Las acetohidroxiácido deshidratasas ilustrativas se conocen por el número EC 4.2.1.9. Tales enzimas están disponibles de una vasta variedad de microorganismos, que incluyen, pero no se limitan a, *E. coli* (Nos. GenBank: YP_026248, NC000913), *Saccharomyces cerevisiae* (Nos. GenBank: NP_012550, NC 001142), *M. maripaludis* (Nos. GenBank: CAF29874, BX957219), *B. subtilis* (Nos. GenBank: CAB14105, Z99115), *L. lactis* (SEQ ID NO:88), y *N. crassa*. La publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2010/0081154, la patente de EE.UU. N° 7.851.188 y la patente de EE.UU. N° 8.241.878 describen dihidroxiácido deshidratasas (DHADs), que incluyen una DHAD de *Streptococcus mutans* (SEQ ID NO:89) y variantes de la misma.

El término “ α -cetoácido descarboxilasa”, “a-cetoácido descarboxilasa”, “a-cetoisovalerato descarboxilasa” o “2-cetoisovalerato descarboxilasa” (“KIVD”) hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de α -cetoisovalerato a isobutiraldehído y CO₂. Los ejemplos de α -cetoácido de cadena ramificada descarboxilasas se conocen por el número EC 4.1.1.72, y están disponibles en varias fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, *Lactococcus lactis* (Nos. GenBank: AAS49166, AY548760; CAG34226, AJ746364), *Salmonella typhimurium* (Nos. GenBank: NP_461346, NC_003197), *Clostridium acetobutylicum* (Nos. GenBank: NP_149189, NC_001988), *M. caseolyticus*, y *L. grayi*. α -cetoácido de cadena ramificada descarboxilasas adecuadas pueden comprender SEQ ID NO:90 de *Lactococcus lactis* y SEQ ID NO:91 de *Listeria grayi*.

El término “alcohol de cadena ramificada deshidrogenasa (ADH)” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de isobutiraldehído a isobutanol. Los ejemplos de alcohol de cadena ramificada deshidrogenasas se conocen por el número EC 1.1.1.265, pero también pueden clasificarse bajo otras alcohol deshidrogenasas (específicamente, EC 1.1.1.1 o 1.1.1.2). Las alcohol deshidrogenasas pueden ser dependientes de NADPH o dependientes de NADH. Tales están disponibles de varias fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, *S. cerevisiae* (Nos. GenBank: NP_010656, NC_001136, NP_014051, NP_001145), *E. coli* (Nos. GenBank: NP_417484, NC_000913), *C. acetobutylicum* (Nos. GenBank: NP_349892, NC_003030; NP_349891, NC_003030). La publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2009/0269823 describe SadB, una alcohol deshidrogenasa (ADH) de *Achromobacter xylosoxidans* (SEQ ID NO: 92). Las alcohol deshidrogenasas también incluyen ADH de hígado de caballo (SEQ ID NO:93) y ADH de *Beijerinckia indica* (SEQ ID NO:94) (descrita por la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2011/0269199).

El término “butanol deshidrogenasa” hace referencia a un polipéptido (o polipéptidos) que tiene una actividad enzimática que cataliza la conversión de isobutiraldehído a isobutanol o la conversión de 2-butanona y 2-butanol. Las butanol deshidrogenasas son un subconjunto de una amplia familia de alcohol deshidrogenasas. La butanol deshidrogenasa puede ser dependiente de NAD o de NADP. Las enzimas dependientes de NAD se conocen como EC 1.1.1.1 y están disponibles, por ejemplo, de *Rhodococcus ruber* (Nos. GenBank: CAD36475, AJ491307). Las enzimas dependientes de NADP se conocen como EC 1.1.1.2 y están disponibles, por ejemplo, de *Pyrococcus furiosus* (Nos. GenBank: AAC25556, AF013169). Adicionalmente, está disponible una butanol deshidrogenasa de *Escherichia coli* (Nos. GenBank: NP_417484, NC_000913) y está disponible una ciclohexanol deshidrogenasa de *Acinetobacter sp.* (Nos. GenBank: AAG10026, AF282240). El término “butanol deshidrogenasa” también hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de butiraldehído a 1-butanol, usando NADH o bien NADPH como cofactor. Las butanol deshidrogenasas están disponibles de, por ejemplo, *C. acetobutylicum* (Nos. GenBank: NP_149325, NC_001988; nota: esta enzima posee actividad tanto aldehído como alcohol deshidrogenasa); NP_349891, NC_003030; y NP_349892, NC_003030) y *E. coli* (Nos. GenBank: NP_417-484, NC_000913).

El término “cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de α -cetoisovalerato a isobutiril-CoA (isobutiril-coenzima A), usando típicamente NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido) como aceptor de electrones. Los ejemplos de cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasas se conocen por el número EC 1.2.4.4. Tales cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasas están comprendidas de cuatro subunidades, y las secuencias de todas las subunidades están disponibles de una vasta variedad de microorganismos, que incluyen, pero no se limitan a, *B. subtilis* (Nos. GenBank: CAB14336, Z99116; CAB14335, Z99116; CAB14334, Z99116; y CAB14337, Z99116) y *Pseudomonas putida* (Nos. GenBank: AAA65614, M57613; AAA65615, M57613; AAA65617, M57613; y AAA65618, M57613).

El término “aldehído deshidrogenasa de acilación” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de isobutiril-CoA a isobutirlaldehído, usando típicamente NADH o bien NADPH como donador de electrones. Los ejemplos de aldehído deshidrogenasas de acilación se conocen por los números EC 1.2.1.10 y 1.2.1.57. Tales enzimas están disponibles de múltiples fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, *Clostridium beijerinckii* (Nos. GenBank: AAD31841, AF157306), *C. acetobutylicum* (Nos. GenBank: NP_149325, NC_001988; NP_149199, NC_001988), *P. putida* (Nos. GenBank: AAA89106, U13232), y *Thermus thermophilus* (Nos. GenBank: YP_145486, NC_006461).

El término “transaminasa” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de α -cetoisovalerato a L-valina, usando alanina o bien glutamato como donador de amina. Los ejemplos de transaminasas se conocen por los números EC 2.6.1.42 y 2.6.1.66. Tales enzimas están disponibles de varias fuentes. Los ejemplos de fuentes para enzimas dependientes de alanina incluyen, pero no se limitan a, *E. coli* (Nos. GenBank: YP_026231, NC_000913) y *Bacillus licheniformis* (Nos. GenBank: YP_093743, NC_006322). Los ejemplos de fuentes para enzimas dependientes de glutamato incluyen, pero no se limitan a, *E. coli* (Nos. GenBank: YP_026247, NC_000913), *Saccharomyces cerevisiae* (Nos. GenBank: NP_012682, NC_001142) y *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Nos. GenBank: NP_276546, NC_000916).

El término “valina deshidrogenasa” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de α -cetoisovalerato a L-valina, usando típicamente NAD(P)H como donador de electrones y amoníaco como donador de amina. Los ejemplos de valina deshidrogenasas se conocen por los números EC 1.4.1.8 y 1.4.1.9, y tales enzimas están disponibles de varias fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, *Streptomyces coelicolor* (Nos. GenBank: NP_628270, NC_003888) y *B. subtilis* (Nos. GenBank: CAB14339, Z99116).

El término “valina descarboxilasa” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de L-valina a isobutilamina y CO₂. Los ejemplos de valina descarboxilasas se conocen por el número EC 4.1.1.14. Tales enzimas se encuentran en *Streptomyces*, tales como por ejemplo, *Streptomyces viridifaciens* (Nos. GenBank: AAN10242, AY116644).

El término “omega transaminasa” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de isobutilamina a isobutiraldehído usando un aminoácido adecuado como donador de amina. Los ejemplos de omega transaminasas se conocen por el número EC 2.6.1.18 y están disponibles de varias fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, *Alcaligenes denitrificans* (AAP92672, AY330220), *Ralstonia eutropha* (Nos. GenBank: YP_294474, NC_007347), *Shewanella oneidensis* (Nos. GenBank: NP_719046, NC_004347), y *P. putida* (Nos. GenBank: AAN66223, AE016776).

El término “acetil-CoA acetiltransferasa” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de dos moléculas de acetil-CoA a acetoacetil-CoA y coenzima A (CoA). Los ejemplos de acetil-CoA acetiltransferasas son acetil-CoA acetiltransferasas con preferencias de sustrato (reacción en la dirección hacia adelante) para una acil-CoA de cadena corta y acetil-CoA, y se clasifican como EC 2.3.1.9 [Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego]; aunque enzimas con un intervalo de sustratos más amplio (E.C. 2.3.1.16) funcionarán también. Las acetil-CoA acetiltransferasas están disponibles de varias fuentes, por ejemplo, *Escherichia coli* (Nos. GenBank: NP_416728, NC_000913; secuencia de aminoácidos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) secuencia de nucleótidos de NCBI), *Clostridium acetobutylicum* (Nos. GenBank: NP_349476.1, NC_003030; NP_149242, NC_001988, *Bacillus subtilis* (Nos. GenBank: NP_390297, NC_000964), y *Saccharomyces cerevisiae* (Nos. GenBank: NP_015297, NC_001148).

El término “3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de acetoacetil-CoA a 3-hidroxi-butiril-CoA. Los ejemplos de 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasas pueden ser dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), con una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxi-butiril-CoA o (R)-3-hidroxi-butiril-CoA. Los ejemplos pueden clasificarse como E.C. 1.1.1.35 y E.C. 1.1.1.30, respectivamente. Adicionalmente, las 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasas pueden ser dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), con una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxi-butiril-CoA o (R)-3-hidroxi-butiril-CoA, y se clasifican como E.C. 1.1.1.157 y E.C. 1.1.1.36, respectivamente. Las 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasas están disponibles de varias fuentes, por ejemplo, *C. acetobutylicum* (Nos. GenBank: NP_349314, NC_003030), *B. subtilis* (Nos. GenBank: AAB09614, U29084), *Ralstonia eutropha* (Nos. GenBank: YP_294481, NC_007347), y *Alcaligenes eutrophus* (Nos. GenBank: AAA21973, J04987).

El término “crotonasa” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de 3-hidroxi-butiril-CoA a crotonil-CoA y H₂O. Los ejemplos de crotonasas pueden tener una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxi-butiril-CoA o (R)-3-hidroxi-butiril-CoA, y pueden clasificarse como E.C. 4.2.1.17 y E.C. 4.2.1.155, respectivamente. Las crotonasas están disponibles de varias fuentes, por ejemplo, *E. coli* (Nos. GenBank: NP_415911, NC_000913), *C. acetobutylicum* (Nos. GenBank: NP_349318, NC_003030), *B. subtilis* (Nos. GenBank: CAB13705, Z99113), y *Aeromonas caviae* (Nos. GenBank: BAA21816, D88825).

El término “butiril-CoA deshidrogenasa” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de crotonil-CoA a butiril-CoA. Los ejemplos de butiril-CoA deshidrogenasas pueden ser dependientes de NADH, dependientes de NADPH, o dependientes de flavina, y pueden clasificarse como E.C. 1.3.1.44, E.C. 1.3.1.38 y E.C. 1.3.99.2, respectivamente. Las butiril-CoA deshidrogenasas están disponibles de varias fuentes, por ejemplo, *C. acetobutylicum* (Nos. GenBank: NP_347102, NC_003030), *Euglena gracilis* (Nos. GenBank: Q5EU90, AY741582), *Streptomyces collinus* (Nos. GenBank: AAA92890, U37135), y *Streptomyces coelicolor* (Nos. GenBank: CAA22721, AL939127).

El término “butiraldehído deshidrogenasa” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de butiril-CoA a butiraldehído, usando NADH o NADPH como cofactor. Las butiraldehído deshidrogenasas con una preferencia por NADH se conocen como E.C. 1.2.1.57 y están disponibles de, por ejemplo, *Clostridium beijerinckii* (Nos. GenBank: AAD31841, AF157306) y *C. acetobutylicum* (Nos. GenBank: NP_149325, NC_001988).

El término “isobutil-CoA mutasa” hace referencia a una enzima que cataliza la conversión de butiril-CoA a isobutil-CoA. Esta enzima usa la coenzima B₁₂ como cofactor. Los ejemplos de isobutil-CoA mutasas se conocen por el número EC 5.4.99.13. Estas enzimas se encuentran en varios *Streptomyces*, que incluyen, pero no se limitan a, *Streptomyces cinnamomensis* (Nos. GenBank: AAC08713, U67612; CAB59633, AJ246005), *S. coelicolor* (Nos. GenBank: CAB70645, AL939123; CAB92663, AL939121), y *Streptomyces avermitilis* (Nos. GenBank: NP_824008, NC_003155; NP_824637, NC_003155).

El término “acetolactato descarboxilasa” hace referencia a un polipéptido (o polipéptidos) que tiene una actividad enzimática que cataliza la conversión de alfa-acetolactato a acetoina. Los ejemplos de acetolactato descarboxilasas

se conocen como EC 4.1.1.5, y están disponibles, por ejemplo, de *Bacillus subtilis* (Nos. GenBank: AAA22223, L04470), *Klebsiella terrigena* (Nos. GenBank: AAA25054, L04507) y *Klebsiella pneumoniae* (Nos. GenBank: AAU43774, AY722056).

El término “acetoína aminasa” o “acetoína transaminasa” hace referencia a un polipéptido (o polipéptidos) que tiene una actividad enzimática que cataliza la conversión de acetoína a 3-amino-2-butanol. La acetoína aminasa puede utilizar el cofactor piridoxal 5'-fosfato o NADH (nicotinamida adenina dinucleótico reducido) o NADPH (nicotinamida adenina dinucleótico fosfato reducido). El producto resultante puede tener estereoquímica (R) o (S) en la posición 3. La enzima dependiente de piridoxal fosfato puede usar un aminoácido tal como alanina o glutamato como donador de amina. Las enzimas dependientes de NADH o NADPH pueden usar amoníaco como segundo sustrato. Un ejemplo adecuado de una acetoína aminasa dependiente de NADH, conocida también como amino alcohol deshidrogenasa, es descrito por Ito, et al. (patente de EE.UU. N° 6.432.688). Un ejemplo de una acetoína aminasa dependiente de piridoxal es la amina:piruvato aminotransferasa (llamada también amina:piruvato transaminasa) descrita por Shin y Kim (J. Org. Chem. 67:2848-2853, 2002).

El término “acetoína cinasa” hace referencia a un polipéptido (o polipéptidos) que tiene una actividad enzimática que cataliza la conversión de acetoína a fosfoacetoína. La acetoína cinasa puede utilizar ATP (trifosfato de adenosina) o fosfoenolpiruvato como donador de fosfato en la reacción. Las enzimas que catalizan la reacción análoga en el sustrato similar dihidroxiacetona, por ejemplo, incluyen enzimas conocidas como EC 2.7.1.29 (García-Alles, et al., Biochemistry 43:13037-13046, 2004).

El término “acetoína fosfato aminasa” hace referencia a un polipéptido (o polipéptidos) que tiene una actividad enzimática que cataliza la conversión de fosfoacetoína a 3-amino-2-butanol O-fosfato. La acetoína fosfato aminasa puede usar el cofactor piridoxal 5'-fosfato, NADH o NADPH. El producto resultante puede tener estereoquímica (R) o (S) en la posición 3. La enzima dependiente de piridoxal fosfato puede usar un aminoácido tal como alanina o glutamato. Las enzimas dependientes de NADH o NADPH pueden usar amoníaco como segundo sustrato. Aunque no hay informes de enzimas que catalizan esta reacción sobre la fosfoacetoína, hay una enzima dependiente de piridoxal fosfato que está propuesta para llevar a cabo la reacción análoga sobre el sustrato similar serinol fosfato (Yasuta, et al., Appl. Environ. Microbial. 67:4999-5009, 2001).

El término “aminobutanol fosfato fosfoliasa”, llamado también “amino alcohol O-fosfato liasa”, hace referencia a un polipéptido (o polipéptidos) que tiene una actividad enzimática que cataliza la conversión de 3-amino-2-butanol O-fosfato a 2-butanona. La aminobutanol fosfato fosfoliasa puede utilizar el cofactor piridoxal 5'-fosfato. Hay informes de enzimas que catalizan la reacción análoga sobre el sustrato similar 1-amino-2-propanol fosfato (Jones, et al., Biochem J. 134:167-182, 1973). La publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2007/0259410 describe una aminobutanol fosfato fosfoliasa del organismo *Erwinia carotovora*.

El término “aminobutanol cinasa” hace referencia a un polipéptido (o polipéptidos) que tiene una actividad enzimática que cataliza la conversión de 3-amino-2-butanol a 3-amino-2-butanol O-fosfato. La aminobutanol cinasa puede utilizar ATP como donador de fosfato. Aunque no hay informes de enzimas que catalizan esta reacción sobre 3-amino-2-butanol, hay informes de enzimas que catalizan la reacción análoga sobre los sustratos similares etanolamina y 1-amino-2-propanol (Jones, et al., arriba). La publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2009/0155870 describe, en el Ejemplo 14, una aminoalcohol cinasa de *Erwinia carotovora subsp. Atroseptica*.

El término “butanodiol deshidrogenasa”, conocida también como “acetoína reductasa”, hace referencia a un polipéptido (o polipéptidos) que tiene una actividad enzimática que cataliza la conversión de acetoína a 2,3-butanodiol. Las butanodiol deshidrogenasas son un subgrupo de la amplia familia de alcohol deshidrogenasas. Las enzimas butanodiol deshidrogenasas pueden tener especificidad para la producción de estereoquímica (R) o (S) en el alcohol producto. Las butanodiol deshidrogenasas específicas a (S) se conocen como EC 1.1.1.76 y están disponibles, por ejemplo, de *Klebsiella pneumoniae* (Nos. GenBank: BBA13085, D86412). Las butanodiol deshidrogenasas específicas a (R) se conocen como EC 1.1.1.4 y están disponibles, por ejemplo, de *Bacillus cereus* (Nos. GenBank NP 830481, NC_004722; AAP07682, AE017000), y *Lactococcus lactis* (Nos. GenBank AAK04995, AE006323).

El término “butanodiol deshidratasa”, conocido también como “dial deshidratasa” o “propanodiol deshidratasa” hace referencia a un polipéptido (o polipéptidos) que tiene una actividad enzimática que cataliza la conversión de 2,3-butanodiol a 2-butanona. La butanodiol deshidratasa puede utilizar el cofactor adenosilcobalamina (conocido también como coenzima B₁₂ o vitamina B₁₂; aunque la vitamina B₁₂ puede hacer referencia también a otras formas de cobalamina que no son coenzima B₁₂). Las enzimas dependientes de adenosilcobalamina se conocen como EC 4.2.1.28 y están disponibles, por ejemplo, de *subunidad alfa* (Nos. GenBank: AA08099 (subunidad alfa), D45071; BAA08100 (subunidad beta), D45071; y BBA08101 (subunidad gamma), D45071 (Nota, se requieren las tres subunidades para la actividad), y *Klebsiella pneumonia* (Nos. GenBank: AAC98384 (subunidad alfa), AF102064; Nos. GenBank: AAC98385 (subunidad beta), AF102064, Nos. GenBank: AAC98386 (subunidad gamma), AF102064). Otras dial deshidratasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, dial deshidratasas dependientes de B₁₂ disponibles de *Salmonella typhimurium* (Nos. GenBank: AAB84102 (subunidad grande), AF026270; Nos. GenBank: AAB84103 (subunidad media), AF026270; Nos. GenBank: AAB84104 (subunidad pequeña), AF026270); y *Lactobacillus collinoides* (Nos. GenBank: CAC82541 (subunidad grande), AJ297723; GenBank Nos: CAC82542 (subunidad media); AJ297723, Nos. GenBank: CAD01091 (subunidad pequeña), AJ297723); y enzimas de *Lactobacillus brevis*

(particularmente las cepas CNRZ734 y CNRZ735, Speranza, et al., J. Agric. Food Chem. 45:3476-3480, 1997), y secuencias de nucleótidos que codifican las enzimas correspondientes. Los métodos de aislamiento de genes de diol deshidrogenasa son bien conocidos en la técnica (p.ej., patente de EE.UU. N° 5.686.276).

5 El término "piruvato descarboxilasa" hace referencia a una enzima que cataliza la descarboxilación de ácido pirúvico a acetaldehído y dióxido de carbono. Las piruvato descarboxilasas se conocen por el número EC 4.1.1.1. Estas enzimas se encuentran en varias levaduras, que incluyen *Saccharomyces cerevisiae* (Nos. GenBank. CAA97575, CAA97705, CAA97091).

10 Se apreciará que las células huésped que comprenden una ruta biosintética de isobutanol proporcionada en la presente memoria pueden comprender además una o más modificaciones adicionales. La publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2009/0305363 describe una conversión aumentada de piruvato a acetolactato diseñando levadura para la expresión de una acetolactato sintasa citosol-localizada y una eliminación sustancial de la actividad piruvato descarboxilasa. En algunas realizaciones, las células huésped comprenden modificaciones para reducir la actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y/o una disrupción en al menos un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad piruvato descarboxilasa o una disrupción en al menos un gen que codifica un elemento regulatorio que controla la expresión de genes de piruvato descarboxilasa, como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2009/0305363, modificaciones a una célula huésped que proporcionan un flujo de carbono aumentado a través de una Ruta de Entner-Doudoroff o un equilibrio de equivalentes reductores como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2010/0120105. Otras modificaciones incluyen la integración de al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido que cataliza una etapa en una ruta biosintética que utiliza piruvato.

20 Otras modificaciones incluyen al menos una delección, mutación y/o sustitución en un polinucleótido endógeno que codifica un polipéptido que tiene actividad acetolactato reductasa. Como se emplea en la presente memoria, "actividad acetolactato reductasa" hace referencia a la actividad de cualquier polipéptido que tiene la capacidad de catalizar la conversión de acetolactato a DHMB. Tales polipéptidos pueden determinarse por métodos bien conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. Como se emplea en la presente memoria, "DHMB" hace referencia a butirato de 2,3-dihidroxi-2-metilo. DHMB incluye "DHMB rápido", que tiene la configuración 2S, 3S, y "DHMB lento", que tiene la configuración 2S, 3R. véase Kaneko et al., Phytochemistry 39: 115-120 (1995), que hace referencia a DHMB rápido como ácido anglicérico y DHMB como ácido tiglicérico. En realizaciones, el polipéptido que tiene actividad acetolactato reductasa es YMR226C de *Saccharomyces cerevisiae* o un homólogo del mismo.

30 Las modificaciones adicionales incluyen una delección, mutación y/o sustitución en un polinucleótido endógeno que codifica un polipéptido que tiene actividad aldehído deshidrogenasa y/o aldehído oxidasa. Como se emplea en la presente memoria, "actividad aldehído deshidrogenasa" hace referencia a cualquier polipéptido que tiene una función biológica de una aldehído deshidrogenasa. Tales polipéptidos incluyen un polipéptido que cataliza la oxidación (deshidrogenación) de aldehídos. Tales polipéptidos incluyen un polipéptido que cataliza la conversión de isobutiraldehído a ácido isobutírico. Tales polipéptidos también incluyen un polipéptido que corresponde a Enzyme Commission Numbers EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4 o EC 1.2.1.5. Tales polipéptidos pueden determinarse por métodos bien conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. Como se emplea en la presente memoria, "actividad de aldehído oxidasa" hace referencia a cualquier polipéptido que tiene una función biológica de una aldehído oxidasa. Tales polipéptidos incluyen un polipéptido que cataliza la producción de ácidos carboxílicos a partir de aldehídos. Tales polipéptidos incluyen un polipéptido que cataliza la conversión de isobutiraldehído a ácido isobutírico. Tales polipéptidos también incluyen un polipéptido que corresponde a Enzyme Commission Number EC 1.2.3.1. Tales polipéptidos pueden determinarse por métodos bien conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad aldehído deshidrogenasa es *ALD6* de *Saccharomyces cerevisiae* o un homólogo del mismo.

45 Una modificación genética que tiene el efecto de reducir la represión de glucosa en donde la célula huésped de producción de levadura es *pdc-* se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2011/0124060. En algunas realizaciones, la piruvato descarboxilasa que es borrada o regulada en descenso se selecciona del grupo que consiste en: PDC1, PDC5, PDC6 y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la piruvato descarboxilasa se selecciona de piruvato descarboxilasa PDC1 de *Saccharomyces cerevisiae*, piruvato descarboxilasa PDC5 de *Saccharomyces cerevisiae*, piruvato descarboxilasa PDC6 de *Saccharomyces cerevisiae*, piruvato descarboxilasa de *Candida glabrata*, piruvato descarboxilasa PDC1 de *Pichia stipites*, piruvato descarboxilasa PDC2 de *Pichia stipites*, piruvato descarboxilasa de *Kluyveromyces lactis*, piruvato descarboxilasa de *Yarrowia lipolytica*, piruvato descarboxilasa de *Schizosaccharomyces pombe*, y piruvato descarboxilasa de *Zygosaccharomyces rouxii*. En algunas realizaciones, las células huésped contienen una delección o regulación en descenso de un polinucleótido que codifica un polipéptido que cataliza la conversión de gliceraldehído-3-fosfato a glicerato 1,3 bifosfato. En algunas realizaciones, la enzima que cataliza esta reacción es gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

60 La publicación WIPO número WO 2011/103300 describe células huésped recombinantes que comprenden (a) al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido que tiene actividad dihidroxiácido deshidratasa; (b)(i) al menos una delección, mutación, y/o sustitución en un gen endógeno que codifica un polipéptido que afecta a la biosíntesis de centros Fe-S; y/o (ii) al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido que afecta a la biosíntesis de centros Fe-S. En realizaciones, el polipéptido que afecta a la biosíntesis de centros Fe-S es codificado por AFT1, AFT2, FRA2, GRX3 o CCC1. En realizaciones, el polipéptido que afecta a la biosíntesis de centros Fe-S es

AFT1 L99A, AFT1 L102A, AFT1 C291F o AFT1 C293F mutantes constitutivos.

Adicionalmente, las células huésped pueden comprender polinucleótidos heterólogos que codifican un polipéptido con actividad fosfocetolasa y/o un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido con actividad fosfotransacetilasa como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N° 2012/0156735.

- 5 En algunas realizaciones, cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular puede ser al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos o secuencia de polipéptidos descrita en la presente memoria. El término "porcentaje de identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinado comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencias entre secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, como sea el caso, determinado por la concordancia entre cuerdas de tales secuencias. La "identidad" y "similitud" pueden calcularse fácilmente por métodos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en: 1.) Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., Ed.) Oxford University: NY (1988); 2.) Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., Ed.) Academic: NY (1993); 3.) Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., Eds.) Humana: NJ (1994); 4.) Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., Ed.) Academic (1987); y 5.) Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. y Devereux, J., Ed.s) Stockton: NY (1991).

- Las técnicas estándar de ADN recombinante y de clonación molecular son bien conocidas en la técnica, y son descritas por Sambrook, et al. (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989, denominado en la presente memoria Maniatis) y por Ausubel, et al. (Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, pub. por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience, 1987). Se describen ejemplos de métodos para construir microorganismos que comprenden una ruta biosintética de butanol, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 7.851.188, y las publicaciones de solicitudes de patente de EE.UU. Nos. 2007/0092957; 2007/0259410; 2007/0292927; 2008/0182308; 2008/0274525; 2009/0155870; 2009/0305363; y 2009/0305370.

Expresión de una ruta biosintética de butanol en *Saccharomyces cerevisiae*

- 25 Los métodos para expresión de genes en *Saccharomyces cerevisiae* se conocen en la técnica (p.ej., Methods in Enzymology, Volume 194, Guide to yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part A, 2004, Christine Guthrie and Gerald R. Fink, eds., Elsevier Academic Press, San Diego, CA). La expresión de genes en levadura requiere típicamente un promotor, seguido del gen de interés, y un terminador transcripcional. Pueden usarse varios promotores de levadura, incluyendo los usados en los Ejemplos en la presente memoria, en la construcción de cajas de expresión para genes que codifican una ruta biosintética de butanol, que incluyen, pero no se limitan a, promotores constitutivos FBA, GPD, ADH1 y GPM, y los promotores inducibles GAL1, GAL10 y CUP1. Los terminadores transcripcionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, FBAt, GPDt, GPMt, ERG10t, GAL1t, CYC1 y ADH1. Por ejemplo, promotores adecuados, terminadores transcripcionales, y los genes de una ruta biosintética de butanol pueden clonarse en vectores lanzadera de *E. coli*-levadura y transformarse en células de levadura como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2010/0129886. Estos vectores permiten la propagación de cepas tanto en cepas de *E. coli* como de levadura. Por regla general, el vector contiene un marcador seleccionable y secuencias que permiten la replicación autónoma o la integración cromosómica en el huésped deseado. Los plásmidos usados típicamente en levadura son vectores lanzadera pRS423, pRS424, pRS425 y pRS426 (American Type Culture Collection, Rockville, MD), que contienen un origen de replicación de *E. coli* (p.ej., pMB1), un origen de replicación 2μ de levadura, y un marcador para selección nutricional. Los marcadores de selección para estos cuatro vectores son His3 (vector pRS423), Trp1 (vector pRS424), Leu2 (vector pRS425) y Ura3 (vector pRS426). La construcción de vectores de expresión con genes que codifican polipéptidos de interés puede realizarse por técnicas estándar de clonación molecular en *E. coli* o bien por el método de recombinación por reparación de huecos en levadura.

- La estrategia de clonación por reparación de huecos aprovecha la altamente eficaz recombinación homóloga en la levadura. Por regla general, se digiere un ADN vector de levadura (p.ej., en su sitio de clonación múltiple) para crear un "hueco" en su secuencia. Se generan varios ADNs de inserto de interés que contienen una secuencia ≥ 21 bp tanto en ambos extremos 5' y 3' que se solapan secuencialmente unos con otros, y con el 'termino 5' y 3' del ADN vector. Por ejemplo, para construir un vector de expresión de levadura para 'Gen X', se seleccionan un promotor de levadura y un terminador de levadura para la caja de expresión. El promotor y el terminador se amplifican a partir del ADN genómico de levadura, y el Gen X es amplificado por PCR desde su organismo fuente o bien es obtenido de un vector de clonación que comprende la secuencia del Gen X. Hay al menos una secuencia solapante de 21 bp entre el extremo 5' del vector linealizado y la secuencia del promotor, entre el promotor y el Gen X, entre el Gen X y la secuencia del terminador, y entre el terminador y el extremo 3' del vector linealizado. El vector "dotado de huecos" y los ADNs de inserto son cotransformados después en una cepa de levadura y puestos en placa en el medio que contiene las mezclas de compuestos apropiadas que permiten una complementación de los marcadores de selección nutricional en los plásmidos. La presencia de combinaciones de insertos correctas puede ser confirmada por mapeo PCR usando ADN plásmido preparado a partir de las células seleccionadas. El ADN plásmido aislado de levadura (habitualmente bajo en concentración) puede ser transformado después en una cepa de *E. coli*, p.ej., TOP10, seguido de mini preps y mapeo de restricción para verificar adicionalmente el constructo del plásmido. Finalmente el constructo puede ser verificado por análisis de secuencias.

Como la técnica de reparación de huecos, la integración en el genoma de levadura también aprovecha el sistema de recombinación homóloga en la levadura. Por regla general, una caja que contiene una región codificante y elementos de control (promotor y terminador) y marcador auxotrófico es amplificada por PCR con una ADN polimerasa de alta fidelidad usando cebadores que se hibridan a la caja y contienen 40-70 pares de bases de homología de secuencia a las regiones 5' y 3' del área genómica donde se desea la inserción. El producto de PCR es transformado después en levadura y puesto en placa en un medio que contiene las mezclas de compuestos apropiadas que permiten la selección para el marcador auxotrófico integrado. Por ejemplo, para integrar el "Gen X" en la ubicación cromosómica "Y", el constructo promotor-región codificante X-terminador es amplificado por PCR a partir de un constructo de ADN plásmido y unido a un marcador autotrófico (tal como URA3) por PCR SOE o bien por digestiones de restricción habituales y clonación. La caja completa, que contiene el promotor-región codificante X-terminador-región URA3, es amplificada por PCR con secuencias de cebadores que contienen 40-70 bp de homología a las regiones 5' y 3' de la ubicación "Y" en el cromosoma de levadura. El producto de PCR es transformado en levadura y seleccionado en medios de crecimiento que carecen de uracilo. Los transformantes pueden ser verificados por PCR de colonias o bien por secuenciación directa de ADN cromosómico.

Crecimiento para la producción

Las células huésped recombinantes descritas en la presente memoria se ponen en contacto con sustratos de carbono adecuados, típicamente en medios de fermentación. Los sustratos de carbono adicionales pueden incluir, pero no se limitan a, monosacáridos tales como fructosa, oligosacáridos tales como lactosa, maltosa, galactosa o sacarosa, polisacáridos tales como almidón o celulosa o mezclas de los mismos y mezclas no purificadas de materias primas renovables tales como permeado de suero de queso, licor de maicena, melazas de remolacha y malta de cebada. Otros sustratos de carbono pueden incluir etanol, lactato, succinato o glicerol.

Adicionalmente el sustrato de carbono también pueden ser sustratos de un carbono tales como dióxido de carbono, o metanol, para los que se ha demostrado la conversión metabólica en intermedios bioquímicos clave. Además de sustratos de uno o dos carbonos, también se sabe que organismos metilotróficos utilizan varios otros compuestos que contienen carbono tales como metilamina, glucosamina y diversos aminoácidos para actividad metabólica. Por ejemplo, se sabe que levaduras metilotróficas utilizan el carbono de la metilamina para formar trehalosa o glicerol (Bellion et al., *Microb. Growth C1 Compd.*, [Int. Symp.], 7th (1993), 415-32, Editores: Murrell, J. Collin, Kelly, Don P.; Publicador: Intercept, Andover, UK). De manera similar, diversas especies de *Candida* metabolizarán alanina o ácido oleico (Sulter et al., *Arch. Microbiol.* 153:485-489 (1990)). Por tanto se contempla que la fuente de carbono utilizada en la presente invención puede abarcar una amplia variedad de sustratos que contienen carbono y solo será limitada por la elección del organismo.

Aunque se contempla que todos los sustratos de carbono mencionados anteriormente y mezclas de los mismos son adecuados en la presente invención, en algunas realizaciones, los sustratos de carbono son glucosa, fructosa y sacarosa, o mezclas de estas con azúcares C5 tales como xilosa y/o arabinosa para células de levadura modificadas para usar azúcares C5. La sacarosa puede derivar de fuentes de azúcar renovables tales como caña de azúcar, remolachas, mandioca, sorgo dulce, y mezclas de los mismos. La glucosa y dextrosa pueden derivar de fuentes de grano renovables mediante la sacarificación de materias primas basadas en almidón, que incluyen granos tales como maíz, trigo, centeno, cebada, avena, y mezclas de los mismos. Además, los azúcares fermentables pueden derivar de biomasa celulósica o lignocelulósica renovable mediante procedimientos de pretratamiento y sacarificación, como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2007/0031918 A1. La biomasa, cuando se usa en referencia a sustrato de carbono, hace referencia a cualquier material celulósico o lignocelulósico, e incluye materiales que comprenden celulosa, y que comprenden opcionalmente además hemicelulosa, lignina, almidón, oligosacáridos y/o monosacáridos. La biomasa también puede comprender componentes adicionales, tales como proteína y/o lípido. La biomasa puede derivar de una única fuente, o la biomasa puede comprender una mezcla derivada de más que una fuente; por ejemplo, la biomasa puede comprender una mezcla de mazorcas de maíz y rastrojos de maíz, o una mezcla de hierba y hojas. La biomasa incluye, pero no se limita a, cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, desechos sólidos urbanos, desechos sólidos industriales, fango de la fabricación de papel, desechos de jardinería, madera y desechos forestales. Los ejemplos de biomasa incluyen, pero no se limitan a, grano de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos tales como hojas de maíz, rastrojo de maíz, hierbas, trigo, centeno, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, pasto varilla, desechos de papel, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, arbustos y matorrales, vegetales, frutas, flores, estiércol animal y mezclas de los mismos.

Además de una fuente de carbono apropiada, los medios de fermentación deben contener minerales adecuados, sales, cofactores, amortiguadores y otros componentes, conocidos por los expertos en la técnica, adecuados para el crecimiento de los cultivos y la promoción de una ruta enzimática descrita en la presente memoria.

Condiciones de cultivo

Por regla general, las células se cultivan a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C en un medio apropiado. Los medios de crecimiento adecuados en la presente descripción son medios habituales preparados en el mercado, tales como caldo de Luria Bertani (LB), caldo de Dextrosa de Saboraud (SD) o caldo de Medio Levadura (YM), o caldo que incluye base de nitrógeno de levadura, sulfato de amonio y dextrosa

(como fuente de carbono/energía) o medio YPD, una mezcla de peptona, extracto de levadura y dextrosa en proporciones óptimas para cultivar la mayoría de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. También pueden usarse otros medios de crecimiento definidos o sintéticos, y el medio apropiado para el crecimiento del microorganismo particular será conocido por un experto en la técnica de la microbiología o ciencia de fermentación. El uso de agentes conocidos por modular la represión de catabolitos directamente o indirectamente, p.ej., adenosina 2',3'-monofosfato cíclica (AMPc), también puede incorporarse en el medio de fermentación.

Los intervalos de pH adecuados para la fermentación están entre aproximadamente pH 5.0 y pH 9.0, donde se prefiere pH 6.0 a pH 8.0 para la condición inicial. Los intervalos de pH adecuados para la fermentación de levadura están típicamente entre aproximadamente pH 3.0 y aproximadamente pH 9.0. En una realización, se usa aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 8.0 para la condición inicial. Los intervalos de pH adecuados para la fermentación de otros microorganismos están entre aproximadamente pH 3.0 y aproximadamente pH 7.5. En una realización, se usa aproximadamente pH 4.5 a aproximadamente pH 6.5 para la condición inicial.

Las fermentaciones pueden realizarse en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. En una realización, se usan condiciones anaeróbicas o microaeróbicas para la fermentación.

15 Fermentaciones industriales discontinuas y continuas

El butanol, u otros productos, pueden producirse usando un método de fermentación discontinuo. Una fermentación discontinua clásica es un sistema cerrado donde la composición del medio se ajusta al comienzo de la fermentación y no se somete a alteraciones artificiales durante la fermentación. Una variación en el sistema discontinuo estándar es el sistema discontinuo alimentado. Los procedimientos de fermentación discontinuos alimentados son adecuados también en la presente invención, y comprenden un sistema discontinuo típico con la excepción de que el sustrato se añade en incrementos según progresa la fermentación. Los sistemas discontinuos alimentados son útiles cuando la represión de catabolitos es apta para inhibir el metabolismo de las células y donde es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en los medios. Las fermentaciones discontinuas y discontinuas alimentadas son habituales y bien conocidas en la técnica, y se pueden encontrar ejemplos en Thomas D. Brock en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA., o Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36:227, (1992).

El butanol, u otros productos, también puede producirse usando métodos de fermentación continua. La fermentación continua es un sistema abierto donde se añade continuamente un medio de fermentación definido a un biorreactor, y se retira simultáneamente una cantidad igual de medios acondicionados para procesamiento. la fermentación continua mantiene generalmente los cultivos a una densidad alta constante, donde las células están principalmente en crecimiento de fase logarítmica. La fermentación continua permite la modulación de un factor o cualquier número de factores que afectan al crecimiento celular o la concentración del producto final. Los métodos para modular nutrientes y factores de crecimiento para procedimientos de fermentación continua, así como las técnicas para maximizar la velocidad de formación de producto, son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial, y diversos métodos son detallados por Brock, arriba.

Se contempla que la producción de butanol, u otros productos, puede practicarse usando procedimientos discontinuos, discontinuos alimentados o continuos, y que cualquier modo conocido de fermentación sería adecuado. Adicionalmente, se contempla que las células pueden ser inmovilizadas en un sustrato como catalizadores celulares enteros, y ser sometidas a condiciones de fermentación para la producción de butanol.

40 Métodos para el aislamiento de butanol del medio de fermentación

El butanol bioproducido puede aislarse del medio de fermentación usando métodos conocidos en la técnica para fermentaciones ABE (véase, p.ej., Durre, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:639-648 (1998), Groot et al., *Process. Biochem.* 27:61-75 (1992), y las referencias en los mismos). Por ejemplo, los sólidos pueden retirarse del medio de fermentación por centrifugación, filtración, decantación o similares. El butanol puede aislarse del medio de fermentación usando métodos tales como destilación, destilación azeotrópica, extracción líquido-líquido, adsorción, purificación con gas, evaporación por membrana o pervaporación.

Debido a que el butanol forma una mezcla azeotrópica, de bajo punto de ebullición, con el agua, puede usarse destilación para separar la mezcla hasta su composición azeotrópica. La destilación puede usarse en combinación con los procedimientos descritos en la presente memoria para obtener la separación alrededor del azeótropo. Los métodos que pueden usarse en combinación con destilación para aislar y purificar el butanol incluyen, pero no se limitan a, decantación, extracción líquido-líquido, adsorción y técnicas basadas en membranas. Adicionalmente, el butanol puede aislarse usando destilación azeotrópica usando un arrastrador (véase, p.ej., Doherty y Malone, *Conceptual Design of Distillation Systems*, McGraw Hill, Nueva York, 2001).

La mezcla butanol-agua forma un azeótropo heterogéneo, con lo que puede usarse destilación en combinación con decantación para aislar y purificar el isobutanol. En este método, el caldo de fermentación que contiene butanol se destila a cerca de la composición azeotrópica. Después, la mezcla azeotrópica se condensa, y el butanol se separa del medio de fermentación por decantación. La fase acuosa decantada puede ser devuelta a la primera columna de destilación como reflujo o a una columna de purificación independiente. La fase orgánica decantada rica en butanol

puede ser purificada adicionalmente por destilación en una segunda columna.

El butanol también puede aislarse del medio de fermentación usando extracción líquido-líquido en combinación con destilación. En este método, el butanol se extrae del caldo de fermentación usando extracción líquido-líquido con un disolvente adecuado. La fase orgánica que contiene butanol se destila después para separar el butanol del disolvente.

- 5 También puede usarse destilación en combinación con adsorción para aislar el butanol del medio de fermentación. En este método, el caldo de fermentación que contiene el butanol se destila a cerca de la composición azeotrópica, y después el agua restante se retira mediante el uso de un adsorbente, tal como tamices moleculares (Aden et al., Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover, Report NREL/TP-510-32438, National Renewable Energy Laboratory, junio de 2002).

Adicionalmente, puede usarse destilación en combinación con pervaporación para aislar y purificar el butanol del medio de fermentación. En este método, el caldo de fermentación que contiene el butanol se destila a cerca de la composición azeotrópica, y después el agua restante se retira por pervaporación mediante una membrana hidrófila (Guo et al., J. Membr. Sci. 245, 199-210 (2004)).

- 15 Puede usarse la retirada de producto in situ (ISPR) (denominada también fermentación extractiva) para retirar el butanol (u otro alcohol fermentativo) del recipiente de fermentación según se produce, permitiendo de este modo que el microorganismo produzca butanol en altos rendimientos. Un método para ISPR para retirar el alcohol fermentativo que se ha descrito en la técnica es la extracción líquido-líquido. En general, con respecto a la fermentación de butanol, por ejemplo, el medio de fermentación, que incluye el microorganismo, se pone en contacto con un extractante orgánico en un tiempo antes de que la concentración de butanol alcance un nivel tóxico. El extractante orgánico y el medio de fermentación forman una mezcla bifásica. El butanol se reparte en la fase del extractante orgánico, disminuyendo la concentración en la fase acuosa que contiene el microorganismo, limitando de este modo la exposición del microorganismo al butanol inhibitorio.

- 25 La extracción líquido-líquido puede realizarse, por ejemplo, según los procedimientos descritos en las publicaciones de solicitudes de patente de EE.UU. Nos. 2009/0305370 y 2011/0097773. Las publicaciones de solicitudes de patente de EE.UU. Nos. 2009/0305370 y 2011/0097773 describen métodos para producir y recuperar butanol de un caldo de fermentación usando extracción líquido-líquido, comprendiendo los métodos la etapa de poner en contacto el caldo de fermentación con un extractante inmiscible con el agua para formar una mezcla de dos fases que comprende una fase acuosa y una fase orgánica. Por regla general, el extractante puede ser un extractante orgánico seleccionado del grupo que consiste en alcoholes grasos C_{12} a C_{22} saturados, monoinsaturados, poliinsaturados (o mezclas de los mismos), ácidos grasos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos grasos C_{12} a C_{22} , aldehídos grasos C_{12} a C_{22} , y mezclas de los mismos. El (los) extractante(s) para ISPR pueden ser extractantes no de alcohol. El extractante ISPR puede ser un extractante orgánico exógeno tal como alcohol oleílico, alcohol behenílico, alcohol cetílico, alcohol laurílico, alcohol mirístico, alcohol estearílico, 1-undecanol, ácido oleico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido esteárico, miristato de metilo, oleato de metilo, undecanal, aldehído láurico, 20-metilundecanal, y mezclas de los mismos.

- En algunas realizaciones, , puede formarse un éster de alcohol poniendo en contacto el alcohol en un medio de fermentación con un ácido orgánico (p.ej., ácidos grasos) y un catalizador capaz de esterificar el alcohol con el ácido orgánico. En tales realizaciones, el ácido orgánico puede servir como extractante de ISPR en el que los ésteres de alcohol se reparten. El ácido orgánico puede ser suministrado al recipiente de fermentación y/o derivar de la biomasa que suministra carbono fermentable alimentada al recipiente de fermentación. Los lípidos presentes en la materia prima pueden ser hidrolizados catalíticamente a ácido orgánico, y el mismo catalizador (p.ej., enzimas) puede esterificar el ácido orgánico con el alcohol. En ciertas realizaciones, los lípidos presentes en la materia prima pueden ser convertidos en ácidos grasos y glicerol utilizando los catalizadores (p.ej., enzimas) descritos anteriormente. El glicerol puede, por ejemplo, proporcionarse al recipiente de fermentación para suplementar los microorganismos con producción de glicerol reducida descritos en la presente memoria. Suplementar los microorganismos puede, por ejemplo, mejorar la producción de biomasa y la salud de las células de los microorganismos. El glicerol será proporcionado en cantidades suficientes más allá de las producidas por la levadura en condiciones de fermentación. Los ácidos carboxílicos que se producen durante la fermentación pueden ser esterificados adicionalmente con el alcohol producido por el mismo o un catalizador diferente. El catalizador puede ser suministrado a la materia prima antes de la fermentación, o puede ser suministrado al recipiente de fermentación antes o al mismo tiempo que con el suministro de la materia prima. Cuando se suministra el catalizador al recipiente de fermentación, pueden obtenerse ésteres de alcohol por hidrólisis de los lípidos a ácido orgánico una esterificación sustancialmente simultánea del ácido orgánico con el butanol presente en el recipiente de fermentación. También puede alimentarse ácido orgánico y/o aceite nativo no derivado de la materia prima al recipiente de fermentación, hidrolizándose el aceite nativo a ácido orgánico. Cualquier ácido orgánico no esterificado con el alcohol puede servir como parte del extractante ISPR. El extractante que contiene ésteres de alcohol puede ser separado del medio de fermentación, y el alcohol puede ser recuperado del extractante. El extractante puede ser reciclado al recipiente de fermentación. Así, en el caso de la producción de butanol, por ejemplo, la conversión del butanol a un éster reduce la concentración de butanol libre en el medio de fermentación, protegiendo a los microorganismos del efecto tóxico de aumentar la concentración de butanol. Además, puede usarse grano no fraccionado como materia prima sin separación de los lípidos en los mismos, dado que los lípidos pueden ser hidrolizados catalíticamente a ácido orgánico, disminuyendo de este modo la velocidad

de acumulación de lípidos en el extractante ISPR.

La retirada de producto in situ puede llevarse a cabo de un modo discontinuo o un modo continuo. En un modo continuo de retirada de producto in situ, el producto se retira continuamente del reactor. En un modo discontinuo de retirada de producto in situ, se añade un volumen de extractante orgánico al recipiente de fermentación y el extractante no se retira durante el procedimiento. Para la retirada de producto in situ, el extractante orgánico puede contactar con el medio de fermentación al inicio de la fermentación formando un medio de fermentación bifásico. Alternativamente, el extractante orgánico puede contactar con el medio de fermentación después de que el microorganismo haya alcanzado una cantidad de crecimiento deseada, que puede determinarse midiendo la densidad óptica del cultivo. Además, el extractante orgánico puede contactar con el medio de fermentación en un momento en el que el nivel de alcohol producto en el medio de fermentación alcanza un nivel preseleccionado. En el caso de la producción de butanol según algunas realizaciones de la presente invención, el extractante de ácido orgánico puede contactar con el medio de fermentación en un momento antes de que la concentración de butanol alcance un nivel tóxico, para esterificar el butanol con el ácido orgánico para producir ésteres de butanol y por consiguiente reducir la concentración de butanol en el recipiente de fermentación. La fase orgánica que contiene ésteres puede ser retirada después del recipiente de fermentación (y separada del caldo de fermentación que constituye la fase acuosa) después de que se alcance un título efectivo deseado de los ésteres de butanol. En algunas realizaciones, la fase orgánica que contiene ésteres es separada de la fase acuosa después de que la fermentación del azúcar fermentable disponible en el recipiente de fermentación esté sustancialmente completa.

Confirmación de la producción de isobutanol

La presencia y/o concentración de isobutanol en el medio de cultivo puede determinarse por varios métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 7.851.188). Por ejemplo, un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) específico utiliza una columna Shodex SH-1011 con una columna de protección Shodex SHG, ambas pueden adquirirse en Waters Corporation (Milford, Mass.), con detección de índices de refracción (RI). La separación cromatográfica se consigue usando H_2SO_4 0,01 M como fase móvil con un caudal de 0,5 ml/min y una temperatura de columna de 50°C. El isobutanol tiene un tiempo de retención de 46,6 min en las condiciones usadas.

Alternativamente, están disponibles métodos de cromatografía de gases (GC). Por ejemplo, un método GC específico utiliza una columna HP-INNOWax (30 m x 0,53 mm id, 1 μm de espesor de película, Agilent Technologies, Wilmington, DE), con un detector de ionización de llama (FID). El gas portador es helio a un caudal de 4,5 ml/min, medido a 150°C con presión en cabeza constante; el fraccionamiento del inyector es 1:25 a 200°C; la temperatura de la estufa es 45°C durante 1 min, 45 a 220°C a 10°C/min, y 220°C durante 5 min; y la detección FID se emplea a 240°C con 26 ml/min de gas helio de reconstitución. El tiempo de retención del isobutanol es 4,5 min.

Aunque se han descrito en la presente memoria diversas realizaciones de la presente invención, debe entenderse que se han presentado a modo de ejemplo solamente, y no de limitación. Será evidente para las personas expertas en la técnica relevante que pueden hacerse en la misma diversos cambios en forma y detalle sin apartarse del alcance de la invención.

Por tanto, la amplitud y alcance de la presente invención no deben ser limitados por ninguna de las realizaciones ilustrativas descritas anteriormente, sino que deben ser definidos solamente de acuerdo con las reivindicaciones y sus equivalentes.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la que esta invención pertenece.

Ejemplos

La presente invención se define adicionalmente en los siguientes Ejemplos. Debe entenderse que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones de la invención, se dan a modo de ilustración solamente. A partir de la discusión anterior y estos Ejemplos, un experto en la técnica puede comprobar las características esenciales de esta invención, y sin apartarse del alcance de la misma, puede hacer diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

Métodos generales

Las técnicas estándar de ADN recombinante, de clonación molecular, y los protocolos de transformación usados en los Ejemplos son bien conocidos en la técnica, y son descritos por Sambrook et al. (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989 denominado en la presente memoria Maniatis), por Ausubel et al. (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987), y por Amberg et al. (Amberg, D. C., Burke, D. J. y Strathern, J. N. (Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Press, 2005). Los materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de cultivos bacterianos son bien conocidos en la técnica. Las técnicas adecuadas para el uso en los siguientes ejemplos pueden encontrarse como se expone en manual of Methods for General Bacteriology (Phillipp et al., eds., American Society for Microbiology, Washington DC., 1994) o por Thomas D. Brock en (Brock, Biotechnology: A Textbook of Industrial

Microbiology, Segunda Edición, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989). Todos los reactivos, enzimas de restricción y materiales usados para el crecimiento y mantenimiento de células bacterianas se obtuvieron en Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO), BD Diagnostic Systems (Sparks, MD), Invitrogen (Carlsbad, CA), HiMedia (Mumbai, India), SD Fine Chemicals (India), o Takara Bio Inc. (Shiga, Japón), a menos que se especifique otra cosa.

- 5 El significado de las abreviaturas es como sigue: “seg” significa segundo(s), “min” significa minuto(s), “h” significa hora(s), “nm” significa nanómetros, “ul” significa microlitro(s), “ml” significa mililitro(s), “mg/ml” significa miligramos por mililitro, “l” significa litro(s), “nM” significa nanomolar, “mM” significa milimolar, “M” significa molar, “mmol” significa milimol(es), “μmol” significa micromol(es), “kg” significa kilogramo, “g” significa gramo(s), “μg” significa microgramo(s) y “ng” significa nanogramo(s), “PCR” significa reacción en cadena de la polimerasa, “OD” significa densidad óptica, “OD600” significa la densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm, “kDa” significa kilodaltons, “g” también puede significar la constante de gravitación, “bp” significa par(es) de bases, “kbp” significa kilopar(es) de bases, “kb” significa kilobase, “%” significa tanto por ciento, “% p/v” significa tanto por ciento en peso/volumen, “% v/v” significa tanto por ciento en volumen/volumen, “HPLC” significa cromatografía líquida de alta resolución, “g/l” significa gramos por litro, “μg/l” significa microgramos por litro, “ng/μl” significa nanogramos por microlitro, “pmol/μl” significa picomoles por microlitro, “RPM” significa rotación por minuto, “μmol/min/mg” significa micromoles por minuto por miligramo, “p/v” significa peso por volumen, “v/v” significa volumen por volumen.

Construcción de cepas

Construcción de la cepa PNY2115

- 20 Se usa la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* PNY0827 como célula huésped para la manipulación genética adicional para PNY2115. PNY0827 hace referencia a una cepa derivada de *Saccharomyces cerevisiae* que ha sido depositada en el ATCC bajo el Tratado de Budapest el 22 de septiembre de 2011 en el American Type Culture Collection, Patent Depository 10801 University Boulevard, Manassas, Va 20110-2209, y tiene la designación de depósito de patente PTA-12105.

Deleción de URA3 y esporulación en haploides

- 25 A fin de suprimir la región codificante de URA3 endógeno, se amplificó por PCR una caja de deleción de pLA54 (SEQ ID NO: 95) que contiene una caja PTEF1-kanMX4-TEF1t flanqueada por sitios loxP para permitir la recombinación homóloga in vivo y la retirada posterior del marcador KANMX4. La PCR se hizo usando Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs; Ipswich, MA) y los cebadores BK505 (SEQ ID NO: 96) y BK506 (SEQ ID NO: 97). La porción de URA3 de cada cebador derivaba de la región 5' 180bp corriente arriba del ATG de URA3 y la región 3' 78bp corriente abajo de la región codificante, de tal modo que la integración de la caja kanMX4 da como resultado el reemplazo de la región codificante de URA3. El producto de la PCR se transformó en PNY0827 usando técnicas genéticas estándar (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201-202) y se seleccionaron los transformantes en medio YEP suplementado con 2% de glucosa y 100 μg/ml de Geneticina a 30°C. Los transformantes fueron cribados por PCR de colonias con los cebadores LA468 (SEQ ID NO: 98) y LA492 (SEQ ID NO: 99) para verificar la presencia de la caja de integración. Se obtuvo un diploide heterocigótico: NYLA98 que tiene el genotipo MATa/α URA3/ura3::loxP-kanMX4.loxP. Para obtener haploides, se esporuló NYLA98 usando métodos estándar (Codon AC, Gasent-Ramírez JM, Benítez T. Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast. Appl Environ Microbiol. 1995 PMID: 7574601). Las tetradas se diseccionaron usando un micromanipulador y se cultivaron en medio YPE suplementado en 2% de glucosa. Las tetradas que contenían cuatro esporas viables fueron puestas sobre medio completo sintético que carecía de uracilo suplementado con 2% de glucosa, y el tipo concordante se verificó por PCR de colonias multiplex usando los cebadores AK109-1 (SEQ ID NO: 100), AK109-2 (SEQ ID NO: 101), AK109-3 (SEQ ID NO: 102). La cepa haploide identificada resultante llamada NYLA103, que tiene el genotipo: MATα ura3Δ::loxP-kanMX4-loxP, y NYLA106, que tiene el genotipo: MATa ura3Δ::loxP-kanMX4-loxP.

- 45 Deleción de His3

- Para suprimir la región codificante de HIS3 endógena, se usó una caja de deleción sin marcas. Los cuatro fragmentos para la caja de PCR para la deleción de HIS3 sin marcas se amplificaron usando Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs; Ipswich, MA) y ADN genómico de CEN.PK 113-7D como plantilla, preparado con un kit Gentra Puregene Yeast/Bact (Qiagen; Valencia, CA). El Fragmento A de His3 fue amplificado con el cebador oBP452 (SEQ ID NO: 103) y el cebador oBP453 (SEQ ID NO 104), que contenían una cola 5' con homología al extremo 5' del Fragmento B de His3. El Fragmento B de His3 fue amplificado con el cebador oBP454 (SEQ ID NO: 105), que contenía una cola 5' con homología al extremo 3' del Fragmento A de His3, y el cebador oBP455 (SEQ ID NO: 106), que contenía una cola 5' con homología al extremo 5' del Fragmento U de His3. El Fragmento U de His3 fue amplificado con el cebador oBP456 (SEQ ID NO: 107), que contenía una cola 5' con homología al extremo 3' del Fragmento B de His3, y el cebador oBP457 (SEQ ID NO: 108), que contenía una cola 5' con homología al extremo 5' del Fragmento C de His3. El Fragmento C de His3 fue amplificado con el cebador oBP458 (SEQ ID NO: 109), que contenía una cola 5' con homología al extremo 3' del Fragmento U de His3, y el cebador oBP459 (SEQ ID NO: 110). Los productos de PCR fueron purificados con un kit PCR Purification (Qiagen). El Fragmento AB de His3 fue creado por PCR solapante mezclando el Fragmento A de His3 y el Fragmento B de His3 y amplificando con los cebadores oBP452 (SEQ ID NO:

103) y oBP455 (SEQ ID NO: 106). El Fragmento UC de His3 fue creado por PCR solapante mezclando el Fragmento U de His3 y el Fragmento C de His3 y amplificando con los cebadores oBP456 (SEQ ID NO: 107) y oBP459 (SEQ ID NO: 110). Los productos de PCR resultantes se purificaron en un gel de agarosa seguido de un kit Gel Extraction (Qiagen). La caja HIS3 fue creada por PCR solapante mezclando el Fragmento AB de HIS3 y el Fragmento UC de HIS3 y amplificando con los cebadores oBP452 (SEQ ID NO: 103) y oBP459 (SEQ ID NO: 110). El producto de PCR se purificó con un kit PCR Purification (Qiagen). Se transformaron células competentes de NYLA106 con la caja de PCR HIS3 ABUC y se pusieron en placa en medio completo sintético que carecía de uracilo suplementado con 2% de glucosa a 30°C. Los transformantes se cribaron para verificar la correcta integración poniendo en placa en réplica sobre medio completo sintético que carecía de histidina y suplementado con 2% de glucosa a 30°C. Se hicieron preps de ADN genómico para verificar la integración por PCR usando los cebadores oBP460 (SEQ ID NO: 111) y LA135 (SEQ ID NO: 112) para el extremo 5' y los cebadores oBP461 (SEQ ID NO: 113) y LA92 (SEQ ID NO: 114) para el extremo 3'. El marcador URA3 se recicló poniendo en placa en medio completo sintético que carecía de histidina y suplementado con 2% de glucosa y 5-FOA a 30°C siguiendo protocolos estándar. La retirada del marcador se confirmó poniendo colonias de las placas de 5-FOA sobre medio SD-URA para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa identificada resultante, llamada PNY2003, tiene el genotipo: MATa ura3Δ::loxP-kanMX4-loxP his3Δ.

Delección de PDC1

Para suprimir la región codificante de PDC1 endógena, se amplificó por PCR una caja de delección a partir de pLA59 (SEQ ID NO: 115), que contiene un marcador URA3 flanqueado por sitios loxP degenerados para permitir la recombinación homóloga in vivo y la retirada posterior del marcador URA3. La PCR se hizo usando Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs; Ipswich, MA) y los cebadores LA678 (SEQ ID NO: 116) y LA679 (SEQ ID NO: 117). La porción de PDC1 de cada cebador fue derivada de la región 5' 50bp corriente abajo del codón de inicio de PDC1 y la región 3' 50bp corriente arriba del codón de parada, de tal modo que la integración de la caja de URA3 da como resultado el reemplazo de la región codificante de PDC1 pero deja las primeras 50 bp y las últimas 50 bp de la región codificante. El producto de PCR fue transformado en PNY2003 usando técnicas genéticas estándar, y se seleccionaron transformantes en medio completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con 2% de glucosa a 30°C. Los transformantes se cribaron para verificar la correcta integración por PCR de colonias usando los cebadores LA337 (SEQ ID NO: 118), externo a la región codificante 5', y LA135 (SEQ ID NO: 112), un cebador interno para URA3. Después los transformantes positivos se cribaron por PCR de colonias usando los cebadores LA692 (SEQ ID NO: 119) y LA693 (SEQ ID NO: 120), internos a la región codificante de PDC1. El marcador URA3 se recicló por transformación con pLA34 (SEQ ID NO: 121), que contenía la recombinasa CRE bajo el promotor GAL1, y se puso en placa en medio completo sintético que carecía de histidina y suplementado con 2% de glucosa a 30°C. Los transformantes se pusieron en placa en medio rico suplementado con 0,5% de galactosa para inducir la recombinasa. La retirada del marcador se confirmó poniendo las colonias en medio completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con 2% de glucosa para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa identificada resultante, llamada PNY2008, tiene el genotipo: MATa ura3Δ::loxP-kanMX4-loxP his3Δpdc1Δ::loxP71/66.

Delección de PDC5

Para suprimir la región codificante de PDC5 endógena, se amplificó por PCR una caja de delección a partir de pLA59 (SEQ ID NO: 115), que contiene un marcador URA3 flanqueado por sitios loxP degenerados para permitir la recombinación homóloga in vivo y la retirada posterior del marcador URA3. La PCR se hizo usando Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs; Ipswich, MA) y los cebadores LA722 (SEQ ID NO: 122) y LA733 (SEQ ID NO: 123). La porción de PDC5 de cada cebador fue derivada de la región 5' 50 bp corriente arriba del codón de inicio de PDC5 y la región 3' 50 bp corriente abajo del codón de parada, de tal modo que la integración de la caja de URA3 da como resultado el reemplazo de la región codificante de PDC5 entera. El producto de PCR fue transformado en PNY2008 usando técnicas genéticas estándar, y se seleccionaron transformantes en medio completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se cribaron para verificar la correcta integración por PCR de colonias usando los cebadores LA453 (SEQ ID NO: 124), externo a la región codificante 5', y LA135 (SEQ ID NO: 112), un cebador interno para URA3. Después los transformantes positivos se cribaron por PCR de colonias usando los cebadores LA694 (SEQ ID NO: 125) y LA695 (SEQ ID NO: 126), internos a la región codificante de PDC5. El marcador URA3 se recicló por transformación con pLA34 (SEQ ID NO: 121), que contenía la recombinasa CRE bajo el promotor GAL1, y se puso en placa en medio completo sintético que carecía de histidina y suplementado con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se pusieron en placa en medio YEP rico suplementado con 1% de etanol y 0,5% de galactosa para inducir la recombinasa. La retirada del marcador se confirmó poniendo las colonias en medio completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con 1% de etanol para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa identificada resultante, llamada PNY2009, tiene el genotipo: MATa ura3Δ::loxP-kanMX4-loxP his3Δpdc1Δ::loxP71/66 pdc5Δ::loxP71/66.

Delección de FRA2

La delección de FRA2 se diseñó para suprimir 250 nucleótidos del extremo 3' de la secuencia codificante, dejando los primeros 113 nucleótidos de la secuencia codificante de FRA2 intactos. Estaba presente un codón de parada en la estructura 7 nucleótidos corriente abajo de la delección. Los cuatro fragmentos para la caja PCR para la delección de FRA2 sin marcas fueron amplificados usando Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs; Ipswich, MA) y ADN genómico CEN.PK 113-7D como plantilla, preparado con un kit Gentra Puregene Yeast/Bact (Quiagen;

Valencia, CA). El Fragmento A de FRA2 fue amplificado con el cebador oBP594 (SEQ ID NO: 127) y el cebador oBP595 (SEQ ID NO: 128), que contenían una cola 5' con homología para el extremo 5' del Fragmento B de FRA2. El Fragmento B de FRA2 fue amplificado con el cebador oBP596 (SEQ ID NO: 129), que contenía una cola 5' con homología al extremo 3' del Fragmento A de FRA2, y el cebador oBP597 (SEQ ID NO: 130), que contenía una cola 5' con homología al extremo 5' del Fragmento U de FRA2. El Fragmento U de FRA2 fue amplificado con el cebador oBP598 (SEQ ID NO: 131), que contenía una cola 5' con homología al extremo 3' del Fragmento B de FRA2, y el cebador oBP599 (SEQ ID NO: 132), que contenía una cola 5' con homología al extremo 5' del Fragmento C de FRA2. El Fragmento C de FRA2 fue amplificado con el cebador oBP600 (SEQ ID NO: 133), que contenía una cola 5' con homología al extremo 3' del Fragmento U de FRA2, y el cebador oBP601 (SEQ ID NO: 134). Los productos de PCR fueron purificados con un kit PCR Purification (Qiagen). El Fragmento AB de FRA2 fue creado por PCR solapante mezclando el Fragmento A de FRA2 y el Fragmento B de FRA2 y amplificando con los cebadores oBP594 (SEQ ID NO: 127) y oBP597 (SEQ ID NO: 130). El Fragmento UC de FRA2 fue creado por PC solapante mezclando el Fragmento U de FRA2 y el Fragmento C de FRA2 y amplificando con los cebadores oBP598 (SEQ ID NO: 131) y oBP601 (SEQ ID NO: 134). Los productos de PCR resultantes fueron purificados en un gel de agarosa seguido de un kit Gel Extraction (Qiagen). La caja ABUC de FRA2 fue creada por PCR solapante mezclando el Fragmento AB de FRA2 y el Fragmento UC de FRA2 y amplificando con los cebadores oBP594 (SEQ ID NO: 127) y oBP601 (SEQ ID NO: 134). El producto de PCR fue purificado con un kit PCR Purification (Qiagen).

Para suprimir la región codificante de FRA2 endógena, la caja de delección sin marcas obtenida anteriormente fue transformada en PNY2009 usando técnicas estándar, y se puso en placa en medio completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con 1% de etanol. Se hicieron preps de ADN genómico para verificar la integración por PCR usando los cebadores oBP602 (SEQ ID NO: 135) y LA135 (SEQ ID NO: 112) para el extremo 5', y los cebadores oBP602 (SEQ ID NO: 135) y oBP603 (SEQ ID NO: 136) para amplificar el locus entero. El marcador URA3 se recicló poniendo en placa en medio completo sintético suplementado con 1% de etanol y 5-FOA (ácido 5-fluoroorótico) a 30°C siguiendo protocolos estándar. La retirada del marcador se confirmó poniendo las colonias de las placas 5-FOA sobre medio completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con 1% de etanol para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa identificada resultante, PNY2037, tiene el genotipo: MATa ura3Δ::loxP-kanMX4.loxP his3Δ pdc1Δ::loxP71/66 pdc5Δ::loxP71/66 fra2Δ.

Adición de plásmido 2 micrón nativo

El marcador loxP71-URA3-loxP66 fue amplificado por PCR usando Phusion DNA polimerasa (New England Biolabs; Ipswich, MA) a partir de pLA59 (SEQ ID NO: 115), y transformado junto con los fragmentos de plásmido 2-micrón LA811x817 (SEQ ID Nos: 137, 138) y LA812x818 (SEQ ID Nos: 139, 140) (amplificados a partir del plásmido 2-micrón nativo de CEN.PK 113-7D; Centraalbureau voor Schimmecultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre) en la cepa PNY2037 en placas de SE-URA a 30°C. La cepa resultante PNY20372μ::loxP71-UPA3-loxP66 fue transformada con pLA34 (pRS423::cre) (llamada también pLA34) (SEQ ID NO: 121) y seleccionada sobre placas de SE -HIS -URA a 30°C. Los transformantes se pusieron sobre placas de YP-1% de galactosa y se dejaron crecer durante 48 h a 30°C para inducir la expresión de Cre recombinasa. Las colonias individuales se pusieron después sobre placas SE -URA, SE -HIS y YPE para confirmar la retirada del marcador URA3. La cepa identificada resultante, PNY2050, tiene el genotipo: MATa ura3Δ::loxP-kanMX4-loxP, his3Δ pdc1Δ::loxP71/66 pdc5Δ::loxP71/66 fra2Δ 2-micrón.

Construcción de PNY2115 a partir de PNY2050

La construcción de PNY2115 [MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc5Δ::loxP66/71 fra2Δ 2-micrón plásmido (CEN.PK2) pdc1Δ::P[PDC1]-ALS|alsS_Bs-CYC1t-loxP71/66 pdc6Δ::UAS|PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP71/66 adh1Δ::P[ADH1]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66 fra2Δ::P[ILV5]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66 gpd2A::loxP71/66] de PNY2050 fue como sigue.

Pdc1Δ::P[PDC1]-ALS|alsS_Bs-CYC1t-loxP71/66

Para integrar alsS en el locus pdc1Δ::loxP66/71 de PNY2050 usando el promotor de PDC1 endógeno, se amplificó por PCR una caja de integración a partir de pLA71 (SEQ ID NO: 146), que contiene el gen acetolactato sintasa de la especie *Bacillus subtilis* con un promotor FAB1 y un terminador CYC1, y un marcador URA3 flanqueado por sitios loxP degenerados para permitir la recombinación homóloga in vivo y la retirada posterior del marcador URA3. La PCR se hizo usando KAPA HiFi y los cebadores 895 (SEQ ID NO: 149) y 679 (SEQ ID NO: 150). La porción PDC1 de cada cebador fue derivada de 60bp de la corriente arriba de la secuencia codificante y 50bp que son 53bp corriente arriba del codón de parada. El producto de PCR fue transformado en PNY2050 usando técnicas genéticas estándar, y los transformantes se seleccionaron en medios completos sintéticos que carecían de uracilo y suplementados con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes fueron cribados para verificar la correcta integración por PCR de colonias usando los cebadores 681 (SEQ ID NO: 151), externo a la región codificante 3', y 92 (SEQ ID NO: 152), interno al gen URA3. Después los transformantes positivos se prepararon para ADN genómico y se cribaron por PCR usando los cebadores N245 (SEQ ID NO: 153) y N246 (SEQ ID NO: 154). El marcador de URA3 se recicló por transformación con pLA34 (SEQ ID NO: 121) que contenía la recombinasa CRE bajo el promotor GAL1, y se puso en placa en medios completos sintéticos que carecían de histidina y suplementados con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se pusieron en placa en medios ricos suplementados con 1% de etanol y 0,5% de galactosa para inducir la recombinasa. La retirada del marcador fue confirmada poniendo las colonias en medios completos sintéticos que carecían de uracilo y

suplementados con 1% de etanol para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa identificada resultante, llamada PNY2090, tiene el genotipo MATa ura3Δ::loxP, his3Δ, pdc1Δ::loxP71/66, pdc5Δ::loxP71/66 fra2Δ 2-micrón pdc1Δ::[PDC1]-ALS|alsS_Bs-CYC1t-loxP71/66.

Pdc6Δ::(UAS)PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP71/66

- 5 Para suprimir la región codificante de PDC6 endógena, se amplificó por PCR una caja de integración a partir de pLA78 (SEQ ID NO: 147), que contiene el gen *kivD* de la especie *Listeria Grayi* con un promotor Fab1 híbrido y un terminador TDH3, y un marcador URA3 flanqueado por sitios loxP degenerados para permitir la recombinación homóloga in vivo y la retirada posterior del marcador URA3. La PCR se hizo usando KAPA HiFi y los cebadores 896 (SEQ ID NO: 155) y 897 (SEQ ID NO: 156). La porción de PDC6 de cada cebador derivaba de 60bp corriente arriba de la secuencia codificante y 59bp corriente abajo de la región codificante. El producto de PCR fue transformado en PNY2090 usando técnicas genéticas estándar, y los transformantes se seleccionaron en medios completos sintéticos que carecían de uracilo y suplementados con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se cribaron para verificar la correcta integración por PCR de colonias usando los cebadores 365 (SEQ ID NO: 157) y 366 (SEQ ID NO: 158), cebadores internos al gen PDC6. Los transformantes con una ausencia de producto se cribaron después por PCR de colonias N638 (SEQ ID NO: 159), externo al extremo 5' del gen, y 740 (SEQ ID NO: 160), interno al promotor FBA1. Los transformantes positivos se prepararon para el ADN genómico y se seleccionaron mediante PCR con dos cebadores externos para la secuencia de codificación de PDC6. Los integrantes positivos darían un producto de 4720bp, mientras que los transformantes de tipo salvaje PDC6 darían un producto de 2130 bp. El marcador URA3 se recicló por transformación con pLA34 que contenía la CRE recombinasa bajo el promotor GAL1 y se puso en placa en medios completos sintéticos que carecían de histidina y suplementados con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se pusieron en medios ricos suplementados con 1% de etanol y 0,5% de galactosa para inducir la recombinasa. La retirada del marcador fue confirmada poniendo las colonias en medios completos sintéticos que carecían de uracilo y suplementados con 1% de etanol para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa identificada resultante se llama PNY2093, y tiene el genotipo MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc5Δ::loxP71/66 fra2Δ 2-micrón pdc1Δ::P[PDC1]-ALS|alsS_Bs-CYC1t-loxP71/66 pdc6Δ::(UAS)PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP71/66.
- 25

Adh1Δ::Pr[ADH1]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66

- 30 Para suprimir la región codificante de ADH1 endógena e integrar BiADH usando el promotor ADH1 endógeno, se amplificó por PCR una caja de integración a partir de pLA65 (SEQ ID NO: 148), que contiene la alcohol deshidrogenasa de la especie *Beijerinckii* con un promotor ILV5 y un terminador ADH1, y un marcador URA3 flanqueado por sitios loxP degenerados para permitir la recombinación homóloga in vivo y la retirada posterior del marcador URA3. La PCR se hizo usando KAPA HiFi y los cebadores 856 (SEQ ID NO: 161) y 857 (SEQ ID NO: 162). La porción de ADH1 de cada cebador derivaba de la región 5' 50 bp corriente arriba del codón de partida ADH1 y los últimos 50 bp de la región codificante. El producto de PCR fue transformado en PNY2093 usando técnicas genéticas estándar, y los transformantes se seleccionaron en medios completos sintéticos que carecían de uracilo y suplementados con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se cribaron para verificar la correcta integración por PCR de colonias usando los cebadores PK415 (SEQ ID NO: 163, externo a la región codificante 5', y N1092 (SEQ ID NO: 164), interno al gen BiADH. Después los transformantes positivos fueron cribados por PCR de colonias usando los cebadores 413 (SEQ ID NO: 169), externo a la región codificante 3', y 92 (SEQ ID NO: 152), interno al marcador URA3. El marcador URA3 se recicló por transformación con pLA34 (SEQ ID NO: 121) que contenía la recombinasa CRE bajo el promotor GAL1, y se puso en placa en medios completos sintéticos que carecían de histidina y suplementados con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se pusieron en placa en medios ricos suplementados con 1% de etanol y 0,5% de galactosa para inducir la recombinasa. La retirada del marcador fue confirmada poniendo las colonias en medios completos sintéticos que carecían de uracilo y suplementados con 1% de etanol para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa identificada resultante, llamada PNY2101, tiene el genotipo MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc5Δ::loxP71/66 fra2Δ 2-micrón pdc1Δ::P[PDC1]-ALS|alsS_Bs-CYC1t-loxP71/66 pdc6Δ::(UAS)PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP71/66 adh1Δ::P[ADH1]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66.
- 45

Fra2Δ::P[ILV5]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66

- 50 Para integrar BiADH en el locus fra2Δ de PNY2101, se amplificó por PCR una caja de integración a partir de pLA65 (SEQ ID NO: 148), que contiene la alcohol deshidrogenasa de la especie *Beijerinckii indica* con un promotor ILV5 y un terminador ADH1, y un marcador URA3 flanqueado por sitios loxP degenerados para permitir la recombinación homóloga in vivo y la retirada posterior del marcador URA3. La PCR se hizo usando KAPA HiFi y los cebadores 906 (SEQ ID NO: 165) y 907 (SEQ ID NO: 166). La porción de FRA2 de cada cebador derivó de las primeras 60bp de la secuencia codificante partiendo de la ATG y 56bp corriente abajo del codón de parada. El producto de PCR fue transformado en PNY2101 usando técnicas genéticas estándar, y los transformantes se seleccionaron en medios completos sintéticos que carecían de uracilo y suplementados con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se cribaron para verificar la correcta integración por PCR de colonias usando los cebadores 667 (SEQ ID NO: 167), externo a la región codificante 5', y 749 (SEQ ID NO: 168), interno al promotor ILV5. El marcador URA3 se recicló por transformación con pLA34 (SEQ ID NO: 121) que contenía la recombinasa CRE bajo el promotor GAL1, y se puso en placa en medios completos sintéticos que carecían de histidina y suplementados con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se pusieron en placa en medios ricos suplementados con 1% de etanol y 0,5% de galactosa para inducir la recombinasa. La retirada del marcador se confirmó poniendo colonias en medios completos sintéticos que
- 60

carecían de uracilo y suplementados con 1% de etanol para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa identificada resultante, llamada PNY2110, tiene el genotipo MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc5Δ::loxP66/71 2-micrón pdc1Δ::P[PDC1]-ALS|alsS_Bs-CYC1t-loxP71/66 pdc6Δ::(UAS)PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP71/66 adh1Δ::P[ADH1]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66 fra2Δ::P[ILV5]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66.

5 Deleción de GPD2

Para suprimir la región codificante GPD2 endógena, se amplificó por PCR una caja de deleción a partir de pLA59 (SEQ ID NO: 115), que contiene un marcador URA3 flanqueado por sitios loxP degenerados para permitir la recombinación homóloga in vivo y la retirada posterior del marcador URA3. La PCR se hizo usando KAPA HiFi y los cebadores LA512 (SEQ ID NO: 141) y LA513 (SEQ ID NO: 142). La porción de GPD2 de cada cebador derivó de la región 5' 50bp corriente arriba del codón de inicio GPD2 y la región 3' 50bp corriente abajo del codón de parada, de tal modo que la integración de la caja URA3 da como resultado el reemplazo de la región codificante de GPD2 entera. El producto de la PCR fue transformado en PNY2110 usando técnicas genéticas estándar, y los transformantes se seleccionaron en medio completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se cribaron para verificar la correcta integración por PCR de colonias usando los cebadores LA516 (SEQ ID NO: 143), externo a la región codificante 5', y LA135 (SEQ ID NO: 112), interno a URA3. Después los transformantes positivos se cribaron por PCR de colonias usando los cebadores LA514 (SEQ ID NO: 144) y LA515 (SEQ ID NO: 145), internos a la región codificante de GPD2. El marcador URA3 se recicló por transformación con pLA34 (SEQ ID NO: 121) que contenía la recombinasa CRE bajo el promotor GAL1, y se puso en placa en medio completo sintético que carecía de histidina y suplementado con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se pusieron en placa en medio rico suplementado con 1% de etanol y 0,5% de galactosa para inducir la recombinasa. La retirada del marcador se confirmó poniendo las colonias en medio completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con 1% de etanol para verificar la ausencia de crecimiento. La cepa identificada resultante, llamada PNY2115, tiene el genotipo MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc5Δ::loxP66/71 fra2Δ 2-micrón pdc1Δ::P[PDC1]-ALS|alsS_Bs-CYC1t-loxP71/66 pdc6Δ::(UAS)PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP71/66 adh1Δ::P[ADH1]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66 fra2Δ::P[ILV5]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66 gpd2Δ::loxP71/66.

Creación de PNY2145 a partir de PNY2115

El PNY2145 se construyó a partir del PNY2115 mediante la integración adicional de una caja de genes de fosfocetolasa en el locus pdc5Δ y reemplazando el gen AMN1 nativo con una versión optimizada por codón del ortólogo de CEN.PK. Los constructos de integración se describen adicionalmente a continuación.

30 Pdc5Δ: :FBA(L8)-xpk1-CYC1t-loxP71/66

El gen TEF(M4)-xpk1-CYC1t de pRS423::TEF(M4)-xpk1-ENO1-eutD (SEQ ID NO: 170) se amplificó por PCR usando los cebadores N1341 y N1338 (SEQ ID NOS: 171 y 172), generando un producto de 3.1 kb. La caja del gen URA3 flanqueado por loxP de pLA59 (SEQ ID NO: 115) se amplificó con los cebadores N1033c y N1342 (SEQ ID NOS: 173 y 174), generando un producto de 1,6 kb. Los productos de PCR xpk1 y URA3 se fusionaron combinándolos sin cebadores durante 10 ciclos adicionales de PCR usando ADN polimerasa Phusion. La mezcla de reacción resultante se usó después como plantilla para una reacción de PCR con KAPA Hi Fi y los cebadores N1342 y N1364 (SEQ ID NOS: 174 y 175). Se recuperó un producto de PCR de 4,2 kb por purificación desde un gel de agarosa de electroforesis (kit Zymo). Se amplificó la variante L8 del promotor FBA (SEQ ID NO: 176) usando los cebadores N1366 y N1368 (SEQ ID NOS: 177 y 178). El producto de PCR xpk1 ::URA3 se combinó con el promotor FBA por rondas adicionales de PCR. El producto resultante fue fosforilado con polinucleótido cinasa y ligado a pBR322 que había sido digerido con EcoRV y tratado con fosfatasa intestinal de ternero. La reacción de ligación fue transformada en células de *E. coli* (células competentes Stbl3 de Invitrogen). La caja de integración se confirmó por secuenciación. Para preparar ADN para integración, se usó el plásmido como plantilla en una reacción PCR con Kapa HiFi y los cebadores N1371 y N1372 (SEQ ID NOS: 179 y 180). El producto de PCR fue aislado por extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol (usando métodos estándar; p.ej., Maniatis, et al.). Se usaron cinco microgramos de ADN para transformar la cepa PNY2115. Los transformantes se seleccionaron en medio que carecía de uracilo (medio completo sintético menos uracilo con 1% de etanol como fuente de carbono). Las colonias se cribaron en cuanto al caso de integración usando PCR (JumpStart) con los cebadores BK93 y N1114 (SEQ ID NOS: 181 y 182). Se seleccionaron dos clones para seguir adelante. El marcador URA3 se recicló por transformación con pJT254 (SEQ ID NO: 183) que contenía la recombinasa CRE bajo el promotor GAL1 y poniendo en placa sobre medio completo sintético que carecía de histidina y suplementado con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se cultivaron en medio rico suplementado con 1% de etanol para liberar la recombinasa. La retirada del marcador se confirmó para aislamientos de colonias individuales poniéndolas en medio completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con 1% de etanol para verificar la ausencia de crecimiento. La pérdida del plásmido de recombinasa, pJT254, se confirmó poniendo en placa las colonias en medio completo sintético que carecía de histidina y suplementado con 1% de etanol. La retirada apropiada del marcador se confirmó por PCR (cebadores N160SeqF5 (SEQ ID NO: 184) y BK380. Un clon resultante se designó como PNY2293.

Amn1Δ::AMN1(y)-loxP71/66

Para reemplazar la copia endógena de AMN1 con una versión optimizada en codones del gen AMN1 de CEN.PK2,

una caja de integración que contenía el promotor de CEN.PK AMN1, el gen AMN1(y) (SEQ ID de ácidos nucleicos NO: 185; SEQ ID de aminoácidos NO: 186), y el terminador de CEN.PK AMN1 fue ensamblada por PCR SOE y subclonada en el vector lanzadera pLA59. El gen AMN1(y) se ordenó a partir de ADN 2.0 con optimización de codones para *S. cerevisiae*. El plásmido PLA67 completado (SEQ ID NO: 187) contenía: 1) la secuencia principal del vector pUC19 que contenía un origen de replicación de *E. coli* y gen de resistencia a la ampicilina; 2) un marcador de selección URA3 flanqueado por sitios loxP71 y loxP66; y 3) la caja de expresión $P_{AMN1(CEN.PK)}-AMN1(y)-term_{AMN1(CEN.PK)}$. La amplificación por PCR de la caja AMN1(y)-loxP71-URA3-loxP66 se hizo usando KAPA KiFi de Kapa Biosystems, Woburn, MA, y los cebadores LA712 (SEQ ID NO: 188) y LA746 (SEQ ID NO: 189). El producto de PCR se transformó en PNY2293 usando técnicas genéticas estándar, y los transformantes se seleccionaron en medio completo sintético que carecía de uracilo y suplementado con 1% de etanol a 30°C. Los transformantes se observaron bajo aumento en cuanto a la ausencia de un fenotipo agrupador con respecto al control (PNY2293). El marcador URA3 se recicló usando el plásmido de recombinasa pJT254 Cre descrito anteriormente. Después del reciclado del marcador, los clones se observaron de nuevo bajo aumento para confirmar la ausencia del fenotipo agrupador. Una cepa identificada resultante, PNY2145, tiene el genotipo: MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc5Δ::P[FBA(L8)]-XPK[xpk1_Lp-CYC1-loxP66/71 fra2Δ 2-micrón plásmido (CEN.PK2) pdc1Δ::P[PDC1]-ALS|alsS_Bs-CYC1t-loxP71/66 pdc6Δ::(UAS)PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP71/66 adh1Δ::P[ADH1]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66 fra2Δ::P[ILV5]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66 gpd2Δ::loxP71/66 amn1Δ::AMN1(y).

Creación de PNY2310 a partir de PNY2145

Se generó PNY2310 transformando la cepa PNY2145 con los plásmidos pLH804-L2V4 y pRS413::BiADH-kivD. El plásmido pLH804-L2V4 (SEQ ID NO: 12) es un vector lanzadera de levadura-*E. coli* basado en pHR81 (ATCC#87541). Contiene genes para la expresión de la variante de KARI K9JB4P y la variante de DHAD L2V4. El plásmido pRS413::BiADH-kivD (SEQ ID NO: 13) es un vector lanzadera de levadura-*E. coli* basado en pRS413 (ATCC#87518). Contiene genes para la expresión de BiADH y kivD. Las posiciones de los rasgos relevantes de los genes en ambos plásmidos se enumeran en las Tablas 3 y 4. Los transformantes de los plásmidos se seleccionaron poniendo en placa en medio completo sintético que carecía de uracilo e histidina con 1% (v/v) de etanol como fuente de carbono. Las colonias fueron transferidas a placas frescas por parcheo. Después de dos días, las células de los parches se transfirieron a placas que contenían medio completo sintético (menos uracilo e histidina) con 2% (p/v) de glucosa como fuente de carbono. La cepa resultante se designó como PNY2310.

Tabla 3: Posiciones de nucleótidos de rasgos de genes de ruta en el plásmido pLH804-L2V4

Elemento	Descripción	Inicio	Fin	Hebra
Promotor	ILV5p	427	1.620	T
CDS	JB4P	1.628	2.659	T
Terminador	ILV5t	2.685	3.307	T
Terminador	FBAt	3.320	3.632	B
CDS	ILVD-L2V4	3.641	5.356	B
Promotor	TEF1(M7)p	5.366	5.766	B

Tabla 4: Posiciones de nucleótidos de rasgos de genes de ruta en el plásmido pRS413_BiADH-kivD

Elemento	Descripción	Inicio	Fin	Hebra
Promotor	FBA1p	2.293	2.893	T
CDS	kivD_Lg(y)	2.902	4.548	T
Terminador	TDH3t	4.560	5.139	T
Promotor	PDC1p	5.983	6.852	T
CDS	adhBiy	6.853	7.896	T
Terminador	ADH1t	7.905	8.220	T

Creación de CPN97 a partir de PNY2145

Para reemplazar la GPD1 endógena de *Saccharomyces cerevisiae* con gpsA de *E. coli*, se diseñaron cebadores para amplificar el marco de lectura abierta de gpsA de *E. coli* para insertar la ubicación cromosómica de la GPD1 endógena manteniendo la región corriente arriba del codón de inicio de ATG y el codón de parada de GPD1 de *Saccharomyces cerevisiae* endógena. Se usó PCR solapante para obtener un producto de PCR que contenía 50 pares de bases corriente arriba de la GPD1 de *Saccharomyces cerevisiae* para recombinación, el gen gpsA de *E. coli*, una caja loxP-

- URA3-loxP y 50 pares de bases corriente abajo de la GPD1 de *Saccharomyces cerevisiae* para recombinación en PNY2145. El ORF de *gpaS* de *E. coli* (producto 1 de PCR) se amplificó utilizando ADN cromosómico BL21 de *E. coli* como plantilla con los cebadores F1 (SEQ ID NO: 234) y R1 (SEQ ID NO: 235). La caja loxP-URA3-loxP (producto 2 de PCR) se amplificó utilizando pLA59 (SEQ ID NO: 27) como plantilla usando los cebadores F2 (SEQ ID NO: 236) y R2 (SEQ ID NO: 237). El producto de PCR (producto 3 de PCR) que contenía 50 pares de bases corriente arriba de la GPD1 de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen *gpaS* de *E. coli*, una caja loxP-URA3-loxP, y 50 pares de bases corriente abajo de la GPD1 de *Saccharomyces cerevisiae* se amplificó utilizando los productos de PCR 1 y 2 como plantillas y los cebadores F1 (SEQ ID NO: 234) y R2 (SEQ ID NO: 237). Todas las reacciones PCR se realizaron usando la enzima Herculanase (Agilent; Santa Clara, CA) según las condiciones del fabricante.
- El producto 3 de PCR se recuperó por purificación y se transformó en PNY2145 usando un kit de transformación de levadura (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Se seleccionaron colonias en medio sintético de levadura que contenía 1% de etanol pero sin uracilo. Medio sintético de levadura: 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Becton Dickinson; East Rutherford, NJ), 1,85 g/l de reducción Kaiser His-Ura (Formedium; Norfolk, UK). Se añadieron histidina o uracilo a 76 mg/l cuando se necesitó.
- Para reciclar el marcador URA3, se seleccionó una colonia y se transformó con el plásmido pJT254 (SEQ ID NO: 183) que contenía recombinasa CRE bajo el promotor GAL1, y se puso en placa en medio sintético de levadura que contenía 1% de etanol y sin histidina. Se seleccionó una colonia y se cultivó durante una noche en medio YPE (20 g/l de peptona, 10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de etanol) y se volvió a hacer un cultivo en rayas en placas de YPE (20 g/l de peptona, 10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de etanol, 15 g/l de agar). Se seleccionaron colonias y se cultivaron en parches en placas de medio sintético de levadura que contenían 1% de etanol y sin uracilo, 1% de etanol y sin histidina, y placas de YPE. Se seleccionó una colonia incapaz de crecer en las placas que carecían de uracilo e histidina y se cribó en cuanto a la retirada del marcador y la inserción de *gpaS* de *E. coli* por PCR. La colonia se designó como CPN82.
- Para producir una cepa con una ruta de producción de isobutanol, la CPN82 se transformó con pLH804::L2V4 (SEQ ID NO: 12) y pRS413::BiADH-kivD (SEQ ID NO: 13) descritos anteriormente. La transformación se puso en placa en medio sintético de levadura que carecía de uracilo e histidina y con 1% de etanol, y se seleccionaron tres colonias y se volvieron a cultivar en rayas en medio sintético de levadura que carecía de histidina y uracilo con 3 g/l de glucosa, 3 g/l de etanol. Las colonias se ensayaron en cuanto a producción de isobutanol, y se seleccionó una colonia y se designó como CPN97.
- Creación de cepas variantes M1, M3 y M8 de GPD1 optimizadas por codones a partir de la integración de PNY2145 de variantes de GPD1 optimizadas por codones
- A fin de ensayar mutantes de GPD1 en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* huésped, se intercambió la GPD1 nativa con una versión optimizada por codones de GPD1 sintetizada por ADN 2.0 usando utilización de codones de *S. cerevisiae*.
- Preparación de la caja de integración
- La caja de intercambio de genes se preparó clonando 2 fragmentos (corriente arriba de la región de homología corriente arriba de GPD1 y fragmento de GPD1 de levadura optimizada por codones) en el vector pBP3518 (SEQ ID NO: 9) que contenía el gen marcador de URA3 junto con el promotor y el terminador, y la región de homología corriente abajo de GPD clonada corriente abajo del gen marcador URA3.
- El Fragmento 1 para la caja de integración se amplificó usando Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs; Ipswich, MA), los cebadores oBP1329 (SEQ ID NO: 1) y oBP1333 (SEQ ID NO: 2) y ADN genómico de PNY2145 como plantilla preparado usando el kit YeaStar TM Genomic DNA (Zymo Research). El Fragmento 2 se amplificó usando los cebadores oBP1334 (SEQ ID NO: 3) y oBP1335 (SEQ ID NO: 4) y GPD1 de levadura sintética optimizada por codones o variantes de GPD1 apropiadas como plantillas. El cebador oBP1333 (SEQ ID NO: 2) tiene una cola 5' con homología a la región 5' del Fragmento 2 (GPD1 sintética optimizada por codones), y el cebador oBP1334 (SEQ ID NO: 3) tiene una cola 5' con homología al extremo 3' del Fragmento 1 (región corriente arriba de GPD). Los dos fragmentos se combinaron usando PCR de solapación usando el cebador oBP1329 (SEQ ID NO: 1) y oBP1335 (SEQ ID NO: 4). Este fragmento combinado se clonó en sitios *Ascl* y *PmeI* en el vector pBP3518 (SEQ ID NO: 9) y el vector resultante, denominado pBP3518GPD* (SEQ ID NO: 10) fue transformado en células competentes AgilentXL1Blue (Agilent Technologies, USA).
- Transformación de la caja de integración en PNY2145
- Se aisló el plásmido oBP3518GPD* (SEQ ID NO: 10) usando el kit QIAprep Spin miniprep (Qiagen, GmbH) y se restringió usando las enzimas de restricción *SacI* y *PacI* (New England Biolabs Inc. Ipswich, MA). Los fragmentos de 4,2 kb resultantes (que contenían la caja de integración entera, la región de homología corriente arriba de GPD, GPD opt. por codones, gen marcador URA3 y región de GPD corriente abajo) fue transformada en PNY2145 usando el kit Frozen EZ Yeast Transformation II (Zymo Research). La mezcla de transformación se puso en placa en medio completo sintético que carecía de uracilo con 0,5% de etanol a 30°C durante 48 horas. Para la confirmación del sitio de integración, los transformantes se cribaron usando dos juegos de cebadores, oBP1342 (SEQ ID NO: 6) y oBP1344

(SEQ ID NO:7) y oBP1341 (SEQ ID NO:5) y oBP1345 (SEQ ID NO:8) para la confirmación de la integración en ambos extremos. Los cebadores oBP1342 (SEQ ID NO:6) y oBP1345 (SEQ ID NO:8) se diseñaron a partir de una región fuera de la caja para confirmar la integración en el sitio correcto.

Retirada del marcador URA3

- 5 Los transformantes confirmados (cepa PNY2145 GPD1Δ::CO GPD1 URA3) fueron transformados con pRS423::P_{GAL1}-cre usando un kit Frozen-EZ Yeast Transformation II™ (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) y poniendo en placa en medio completo sintético que carecía de histidina y uracilo suplementado con 0,5% de etanol, y se incubó a 30°C durante 48 horas. Los transformantes se cultivaron en medio completo sintético que carecía de histidina con 0,5% de etanol durante una noche y se pusieron en placa en medio completo sintético con 0,5% de etanol y 0,1% de 5FOA para el marcador URA3. La retirada del marcador se confirmó por PCR de colonias usando los cebadores oBP1341 (SEQ ID NO:5) y oBP1345 (SEQ ID NO:8).

Transformación de plásmido de ruta

- 15 La cepa PNY2145 GPD1Δ::CO GPD1 fue transformada después con el plásmido pLMH11-JM44 (SEQ ID NO:240) usando el kit Frozen-EZ Yeast Transformation II™ (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) y se puso en placa en medio completo sintético sin uracilo con 0,5% de etanol. Las cepas resultantes se designaron como M, M3 (F73A), y M8 (F73G/F129G).

Creación de cepas EC1, E3 y E8 de GPD1 de levadura optimizadas por codones de *E. coli* a partir de la integración de PNY2145 de codón de GPD1 de levadura optimizada para *E. coli*

- 20 A fin de ensayar los mutantes de GPD1 en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* huésped, se intercambió la GPD1 nativa con una versión optimizada por codones de *E. coli* de GPD1 sintetizada por ADN 2.0 usando utilización de codones de *E. coli*.

Preparación de la caja de integración

- 25 La caja de intercambio de genes se preparó clonando 2 fragmentos (corriente arriba de la región de homología corriente arriba de GPD1 y fragmento de GPD1 de levadura optimizada por codones) en el vector pBP3518 (SEQ ID NO: 9) que contenía el gen marcador de URA3 junto con el promotor y el terminador, y la región de homología corriente abajo de GPD clonada corriente abajo del gen marcador URA3.

- 30 El Fragmento 1 para la caja de integración se amplificó usando Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs; Ipswich, MA), los cebadores oBP1329 (SEQ ID NO: 1) y oBP1350 (SEQ ID NO: 241) y ADN genómico de PNY2145 como plantilla preparado usando el kit YeaStar™ Genomic DNA (Zymo Research). El Fragmento 2 se amplificó usando los cebadores oBP1351 (SEQ ID NO: 242) y oBP1352 (SEQ ID NO: 243) y gen de GPD1 optimizado por codones de *E. coli* y levadura y variantes sintéticas E3 y E8 como plantillas. El cebador oBP1350 (SEQ ID NO: 241) tiene una cola 5' con homología a la región 5' del Fragmento 2 (GPD1 sintética optimizada por codones), y el cebador oBP1351 (SEQ ID NO: 242) tiene una cola 5' con homología al extremo 3' del Fragmento 1 (región corriente arriba de GPD). Los dos fragmentos se combinaron usando PCR de solapación usando el cebador oBP1329 (SEQ ID NO:1) y oBP1352 (SEQ ID NO:243). Este fragmento combinado se clonó en sitios *AscI* y *PmeI* en el vector pBP3518 (SEQ ID NO:9) y el vector resultante, denominado pBP3518GPD1_EcOpt (SEQ ID NO:249) fue transformado en células competentes AgilentXL1Blue (Agilent Technologies, USA).

Transformación de la caja de integración en PNY2145

- 40 Se aisló el plásmido pBP3518GPD_1EcOpt (SEQ ID NO:249) usando el kit QIAprep Spin miniprep (Qiagen, GmbH) y se restringió usando las enzimas de restricción *SacI* y *PacI* (New England Biolabs Inc. Ipswich, MA). Los fragmentos de 4,2 kb resultantes (que contenían la caja de integración entera, la región de homología corriente arriba de GPD, GPD1 optimizada por codones de *E. coli*, el gen marcador URA3 y la región de GPD corriente abajo) fueron transformados en PNY2145 usando el kit Frozen EZ Yeast Transformation II (Zymo Research). La mezcla de transformación se puso en placa en medio completo sintético que carecía de uracilo con 0,5% de etanol a 30°C durante 48 horas. Para la confirmación del sitio de integración, los transformantes se cribaron usando dos juegos de cebadores, oBP1342 (SEQ ID NO:6) y oBP1352 (SEQ ID NO:243) y oBP1357 (SEQ ID NO:248) y oBP1345 (SEQ ID NO:8) para la confirmación de la integración en ambos extremos. Los cebadores oBP1342 (SEQ ID NO:6) y oBP1345 (SEQ ID NO:8) se diseñaron a partir de una región fuera de la caja para confirmar la integración en el sitio correcto.

Retirada del marcador URA3

- 50 Los transformantes confirmados (cepa PNY2145 GPD1Δ::EC CO GPD1 URA3) fueron transformados con pRS423::P_{GAL1}-cre usando el kit Frozen EZ Yeast Transformation II™ (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) y se pusieron en placa en medio completo sintético que carecía de histidina y uracilo suplementado con 0,5% de etanol, y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Los transformantes se cultivaron en medio completo sintético que carecía de histidina con 0,5% de etanol durante una noche y se pusieron en placa en medio completo sintético con 0,5% de etanol y 0,1% de 5FOA para el marcador URA3. La retirada del marcador se confirmó por PCR de colonias usando los

cebadores oBP1357 (SEQ ID NO:248) y oBP1345 (SEQ ID NO:8).

Transformación del plásmido de ruta

La cepa PNY2145 GPD1Δ::EC CO GPD1 fue transformada después con el plásmido pLMH11-JM44 (SEQ ID NO:240) usando el kit Frozen EZ Yeast Transformation II™ (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) y se puso en placa en medio completo sintético sin uracilo con 0,5% de etanol. Las cepas resultantes se designaron como EC1, E3 (F73A), y E8 (F73G/F129G).

Creación de cepas EC1, N, N3 y N8 de GPD1 de levadura nativa a partir de la integración de PNY2145 de variantes de CPD1 de levadura nativa

A fin de ensayar los mutantes de GPD1 de levadura nativa en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* huésped, se intercambió la GPD1 optimizada por codones de levadura con una versión nativa de levadura de GPD1 en la cepa PNY2145 GPD1Δ::EC CO GPD1.

Preparación de la caja de integración

La caja de intercambio de genes se preparó clonando 2 fragmentos (región de homología corriente arriba de GPD1 corriente arriba y fragmento de GPD1 nativo de levadura) en el vector pBP3518 (SEQ ID NO:9) que contenía el gen marcador URA3 junto con el promotor y el terminador y la región de homología corriente abajo de GPD clonada corriente abajo del gen marcador URA3.

El Fragmento 1 para la caja de integración fue amplificado usando Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs Inc.; Ipswich, MA), los cebadores oBP1329 (SEQ ID NO:1) y oBP1353 (SEQ ID NO:244) y ADN genómico de PNY2145 como plantilla preparado usando el kit YeaStar™ Genomic DNA (Zymo Research). El Fragmento 2 fue amplificado usando los cebadores oBP1354 (SEQ ID NO:245) y oBP1355 (SEQ ID NO:246) y ADN genómico de PNY2145 y variantes apropiadas como plantillas. El cebador oBP1353 (SEQ ID NO:244) tiene una cola 5' con homología a la región 5' del Fragmento 2 (GPD1 nativa de levadura) y el cebador oBP1354 (SEQ ID NO:245) tiene una cola 5' con homología al extremo 3' del Fragmento 1 (región corriente arriba de GPD). Los dos fragmentos se combinaron usando PCR de solapamiento usando el cebador oBP1329 (SEQ ID NO:1) y oBP1355 (SEQ ID NO: 246). Este fragmento combinado se clonó en los sitios *AscI* y *PmeI* en el vector pBP3518 (SEQ ID NO:9) y el vector resultante, denominado pBP3518GPD1_Nativo (SEQ ID NO:250) fue transformado en células competentes Agilent XL1Blue (Agilent Technologies, USA).

Transformación de la caja de integración en PNY2145

El plásmido pBP3518GPD1_Nativo (SEQ ID NO:250) fue aislado usando el kit QIAprep Spin miniprep (Qiagen, GmbH) y restringido usando las enzimas de restricción *SacI* y *PacI* (New England Biolabs Inc Ipswich, MA). Los fragmentos de 4,2 kb resultantes (que contenían la caja de integración entera, la región de homología corriente arriba de GPD1, GPD1 nativa de levadura, el gen marcador URA3 y la región de GPD corriente abajo) fueron transformados en PNY2145 GPD1Δ::CO GPD1 usando Frozen EZ Yeast Transformation II (Zymo Research). La mezcla de transformación se puso en placa en medio completo sintético que carecía de uracilo con 0,5% de etanol a 30°C durante 48 horas. Para la confirmación del sitio de integración, los transformantes se cribaron usando dos juegos de cebadores, oBP1342 (SEQ ID NO:6) y oBP1355 (SEQ ID NO:246) y oBP1356 (SEQ ID NO:247) y oBP1345 (SEQ ID NO:8) para la confirmación de la integración en ambos extremos.

Retirada del marcador URA3

Los transformantes confirmados (cepa PNY2145 CO GPD1Δ::GPD Nativa URA3) fueron transformados con pRS423::P_{GAL1}-cre usando un kit Frozen EZ Yeast Transformation II™ (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) y se pusieron en placa en medio completo sintético que carecía de histidina y uracilo suplementado con 0,5% de etanol, y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Los transformantes se cultivaron en medio completo sintético que carecía de histidina con 0,5% de etanol durante una noche y se pusieron en placa en medio completo sintético con 0,5% de etanol y 0,1% de 5FOA para el marcador URA3. La retirada del marcador se confirmó por PCR de colonias usando los cebadores oBP1356 (SEQ ID NO:247) y oBP1345 (SEQ ID NO:8).

Transformación de los plásmido de ruta

La cepa PNY2145 CO GPD1Δ::GPD Nativa GPD1 fue transformada después con el plásmido pLMH11-JM44 (SEQ ID NO:240) usando el kit Frozen EZ Yeast Transformation II™ (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) y se puso en placa en medio completo sintético sin uracilo con 0,5% de etanol. Las cepas resultantes se designaron como N, N3 (F73A), y N8 (F73G/F129G).

Integración de variantes de GPD1

Se prepararon cajas de integración para variantes de GPD1 de la misma manera que la descrita anteriormente para intercambio de GPD1 optimizada por codones, excepto que la plantilla usada para amplificar el fragmento 2 para cada variante de GPD1 fue la secuencia de codificación correspondiente con la mutación enumerada en la Tabla 5.

Tabla 5: Variantes de GPD con las mutaciones correspondientes

Variante de GPD	Mutación	Cepa
GPD2	F129G	
GPD3	F73A	E3, M3, N3
GPD4	F73G	
GPD7	F73A129G	
GPD8	F73G129G	E8, M8, N8
E3 y E8 son variantes de GPD1 usando optimización por codones de <i>E. coli</i> ; M3 y M8 son variantes de GPD1 usando optimización por codones de <i>S. cerevisiae</i> ; y N3 y N8 son variantes de GPD1 con utilización de codones de <i>S. cerevisiae</i> .		

Integración de GPDs heterólogas

- 5 Pueden prepararse cajas de integración para GPDs heterólogas de la misma manera que la descrita anteriormente para GPD1 optimizada por codones, excepto que un experto en la técnica rediseñaría los cebadores en base a la GPD1 heteróloga a ser insertada para obtener un ensamblaje apropiado de la caja de integración.

Ejemplo 1: Enzimas variantes de GPD1

En este ejemplo, se crearon versiones variantes de GPD1 de *Saccharomyces* y se ensayaron por expresión en *E. coli* seguido de ensayos enzimáticos en el extracto celular bruto.

Mutagénesis de GPD1

- 10 La mutagénesis de GPD1 de levadura fue dirigida por el deseo de aumentar la K_M para NADH sin tener un impacto sobre otros parámetros cinéticos de la enzima. La estrategia para la mutagénesis se basó en las estructuras cristalinas de alta resolución de la GPD1 humana (Ou et al, 2005, J.Mol.Biol. 357:858-869), que permitieron la determinación de los aminoácidos dentro de la distancia de contacto de NAD en el sitio de unión del cofactor. Analizando los residuos de aminoácidos y el tipo de contacto hecho, fue posible limitar el número de cambios de aminoácidos para dar como
- 15 resultado un aumento en el valor de K_M para NADH. La Tabla 6 muestra los resultados de este análisis, donde se han enumerado los residuos de aminoácidos dentro de 5 Angstroms del NAD unido, y se interpretó el papel en la unión del NAD. Debido a su papel en la estabilización por apilamiento π del NAD unido, se puso un foco inicial en la mutagénesis de posiciones homólogas al phe41 y phe97 de GPD1 humana truncada (SEQ ID NO:84) (phe73 y phe129 de GPD1 de levadura).

- 20 Tabla 6. Residuos de aminoácidos dentro de 5 Angstroms (Å) de NAD unido en la estructura cristalina humana, y dianas de mutagénesis potenciales para aumentar el valor de K_M para NADH.

Residuo (GPD1 humana número)	GPD de levadura número (Residuo si dif.)	Nº de contactos con NAD	Tipo de interacción	Papel posible	Residuos alt. equivalentes	Aumento de K_M con	Fundamento
Ser(11)	42	3					
Asn(13)	44	18	Polar	Enlaces H con NAD		A, C, G, I, L, M, S, V	Un residuo no polar no voluminoso puede reducir la atracción a NAD

Residuo (GPD1 humana número)	GPD de levadura número (Residuo si dif.)	Nº de contactos con NAD	Tipo de interacción	Papel posible	Residuos alt. equivalentes	Aumento de K_M con	Fundamento
Trp(14)	45	66	apilamiento π	Posiblemente estabiliza el anillo de pirimidina para transferencia de electrones estable	Phe, Tyr	A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V	Un residuo no anular que no crea demasiado choque de van der Waal y es no negativo puede aumentar K_M para NAD pero desestabiliza la transferencia de electrones retirando la fijación por apilamiento π . También puede alterar K_{cat} .
Trp(39)	71	6					
Phe(41)	73	64	apilamiento π	Estabiliza después de la unión	Tyr, Trp, Arg, Lys debido al catión- π	G, A, R, K	Residuos pequeños pueden aumentar la entropía de la adenina. Residuos grandes pueden hacer difícil que entren. Residuos positivos largos cierran la puerta con otro anillo debido al catión- π .
Glu(43)	75	2					
Tyr(63)	95	39		Estabilización del agua			
Val(92)	124 (Gln)	6					
Pro(94)	126	25					

Residuo (GPD1 humana número)	GPD de levadura número (Residuo si dif.)	Nº de contactos con NAD	Tipo de interacción	Papel posible	Residuos alt. equivalentes	Aumento de K_M con	Fundamento
Phe(97)	129	64	apilamiento π	Estabiliza después de la unión	Tyr, Trp, Arg, Lys debido al catión- π	G, A, R, K	Residuos pequeños pueden aumentar la entropía de la adenina. Residuos grandes pueden hacer difícil que entren. Residuos positivos largos cierran la puerta con otro anillo debido al catión- π .
Ile(119)	151 (leu)	5					
Lys(120)	152	20	Polar	Enlaces H con DHAP y lo estabiliza			Revertir o retirar la polaridad puede aumentar K_M para NAD, pero puede alterar K_{cat} o K_M para DHAP
Asn(151)	183	3					
Ile(152)	184	2					
Ala(153)	185	4					
Asn(205)	246	1		Ayuda posiblemente en la transferencia de electrones			Puede alterar K_{cat} o K_M para DHAP
Arg(269)	310	33		Estabiliza la transferencia de electrones. Asimismo puede crear atracción por difosfato de NAD			Cambiar a un residuo no positivo puede hacer al difosfato de NAD inestable, pero puede alterar K_{cat} o K_M para DHAP
Gln(295)	336	14					

Residuo (GPD1 humana número)	GPD de levadura número (Residuo si dif.)	Nº de contactos con NAD	Tipo de interacción	Papel posible	Residuos alt. equivalentes	Aumento de K_M con	Fundamento
Lys(296)	337 (Ser)	17		Enlaces de H con NAD		A, C, D, E, G, I, L, M, N, Q, S, V	Impiden la formación de enlaces h, revierten la polaridad y reducen la atracción por NAD
Gln(298)	339	14		Enlaces H y estabiliza residuos alrededor de NAD		A, C, G, I, L, M, S, V	Un residuo no polar no voluminoso puede reducir la atracción a NAD

Cepas y medios

Se obtuvo *Escherichia coli* TOP10 de Life Technologies Corp. (Cat. # C404003, Grand Island, NY). El plásmido de expresión pBAD fue descrito previamente (patente de EE.UU. Nº 7.910.342). Se obtuvo el gen de GPD1 de levadura sintético, optimizado para expresión de levadura, de DNA 2.0 (Menlo Park, CA). Se cultivaron las células a 37°C en caldo LB de Miller (Cat. # 46-050-CM, Mediatech, Inc., Herndon, VA) con 0,02% de L-(+)-arabinosa (Cat. # A3256, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) y 100 µg/ml de ampicilina (Cat. # A1066, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO). Las células se pusieron en placas de agar LB con 100 µg/ml de ampicilina (Cat. #L1004, Teknova, Hollister, CA).

Construcción de variantes de GPD1

Se introdujeron mutaciones en 4 posiciones de aminoácidos diferentes, según la Tabla 7. La mutagénesis se realizó usando un kit QuikChange Lightning (Cat. #210519, Agilent Technologies, La Jolla, CA), según las instrucciones del fabricante. Los cebadores de la mutagénesis se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis MO. Las reacciones fueron termocicladas en un Gen Amp 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Norwalk, CT). Las *Escherichia coli* TOP10 fueron transformadas con 1 µl del producto de reacción de QuikChange según las instrucciones del fabricante, y los transformantes se seleccionaron en placas de agar LB con 100 µg/ml de ampicilina. Se obtuvieron secuencias de ADN para aislamientos múltiples de cada transformación a fin de identificar aquellos con las mutaciones deseadas.

Se construyeron mutantes dobles de la misma manera, excepto que la plantilla en la reacción de mutagénesis ya contenía una de las mutaciones, y se usaron los cebadores apropiados para introducir la segunda mutación.

Tabla 7: Variantes de GPD1 y cebadores usados en su construcción

Posición	SEQ ID NO:	SEQ ID NO: del cebador directo	SEQ ID NO: del cebador inverso
Asn44		20	
N44A	212	21	54
N44C	213	22	55
N44G	214	23	56
N44I	215	24	57
N44L	216	25	58
N44M	217	26	59
N44S	218	27	60
N44V	219	28	61
Trp45		29	

Posición	SEQ ID NO:	SEQ ID NO: del cebador directo	SEQ ID NO: del cebador inverso
W45A	220	30	62
W45C	221	31	63
W45G	222	32	64
W45H	223	33	65
W45I	224	34	66
W45K	225	35	67
W45L	226	36	68
W45M	227	37	69
W45N	228	38	70
W45Q	229	39	71
W45R	230	40	72
W45S	231	41	73
W45T	232	42	74
W45V	233	43	75
Phe73		44	
F73G	196	45	76
F73A	197	46	77
F73R	198	47	78
F73K	199	48	79
Phel29		49	
F129G	200	50	80
F129A	201	51	81
F129R	202	52	82
F129K	203	53	83

Ensayo de GPD1

Se prepararon extractos celulares de las fracciones solubles a partir de 5 ml de cultivo por batido con bolas 2 x 10 segundos en MOPS 100 mM, pH 6,8, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM en una Mini-Bead-Beater (Cat. #3110BX, Biospec Products, Bartlesville, OK). La concentración de proteínas en el extracto celular se determinó por el ensayo de BCA de Pierce (Cat. #23224 y 23228, Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL).

Los ensayos se realizaron en un volumen de 100 µl que contenía MOPS 100 mM, pH 6,8, EDTA 1 mM, glucosa-6-fosfato 1 mM, 3 mU/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Cat. #G8404, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO), fosfato de dihidroxiacetona 1 mM (Cat. #D7137, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO), concentraciones variadas de NADH, y concentraciones variadas de extracto celular. Las reacciones fueron terminadas por dilución de 4 veces en ácido fórmico al 0,1% (Suprapur, #1167-1, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) en agua (Omnisolv, #WX0001-1, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). La producción de glicerol-3-fosfato se midió por LC/MS.

Método LC/MS

Se inyectaron 2 µl de cada muestra en un Waters Acuity UPLC/SQD System, usando una columna HSS T3 (2,1 x 100 mm, 1,8 µm, #186003539, Waters, Milford, MA) a una temperatura de 30°C. Las fases móviles de UPLC consistieron en 0,1% de ácido fórmico en agua (Móvil A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (Omnisolv, #AX0156-1, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) (Móvil B) con un caudal constante de 0,3 ml/min. El gradiente consistió en un periodo de 1 minuto inicial a 99% de A, seguido de un gradiente lineal de 0,5 minutos que acababa en 75% de B, y después un gradiente lineal de 0,5 minutos de vuelta a 99% de A, antes de inyectar la siguiente muestra. El análisis MS se realizó

por ionización negativa por electropulverización a un voltaje de cono de 30 V y $m/z = 171$. El tiempo de retención y las intensidades de los picos se determinaron usando el programa informático MassLynx4.1 (Waters, Milford, MA). Se analizó un patrón externo (glicerol-3-fosfato, Cat. #G7886, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) de la misma manera que la usada para la cuantificación.

5 Análisis de variantes de GPD1.

La actividad de las variantes de GPD1 se cribó inicialmente midiendo la velocidad de formación inicial de glicerol 3 fosfato (G3P) a dos concentraciones de NADH (30 y 300 μM). Esto sirve como medida que indica la K_M de las variantes para NADH: para una K_M mucho menor que 30 μM , la relación sería 1,0, para una K_M mucho más alta que 300 μM la relación sería 10. Los resultados para los mutantes sencillos individuales se muestran en la Tabla 8.

10 Tabla 8: Actividad de variantes de GPD1 medida por velocidad de formación de G3P inicial

Variante	Relación de actividad
129R	78,0
129K	73,1
129G	67,8
129A	65,9
44G	2,4
44M	2,4
44S	2,3
45G	2,2
44V	2,2
73A	2,0
44A	1,8
73G	1,8
44C	1,8
44L	1,8
44I	1,7
45C	1,7
73R	1,5
45M	1,4
45A	1,4
45H	1,3
73K	1,2
45I	1,0
45S	1,0
45V	1,0
45T	0,9
45K	0,8
45L	0,7
45N	0,6
45Q	0,6
45R	0,6
GPD1 wt	1,3 +/- 0,3

Puede interpretarse que estos datos indican que cualquier variante con una relación mayor que 1,6 (valor medio de tres medidas de control más desviación estándar) tiene una K_M para NADH más alta que la GPD1 de tipo salvaje. Se crearon mutantes dobles de los mutantes sencillos individuales de K_M alta como se describió anteriormente. El análisis a escala completa de los valores de K_M para NADH para una selección de los mutantes dobles y sencillos se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Constantes de Michaelis (K_M) para NADH de variantes de GPD1

Variante	Vmax (U/ml)	K_M (μ M)
GPD1 WT_y	9	13
F129A	14	234
F129G	21	200
F129K	14	136
F129R	11	76
F73A	11	101
F73G	9	42
N44A	6	14
N44C	3	5
N44G	29	26
N44L	1	8
N44M	9	8
N44S	6	51
N44V	3	3
F129A	33	199
F129R	32	70
F73A129G (SEQ ID NO:204)	30	605
F73A129A (SEQ ID NO:205)	12	595
F73A129R (SEQ ID NO:206)	14	734
F73A129K (SEQ ID NO:207)	9	2.989
F73G129G (SEQ ID NO:208)	29	515
F73G129A (SEQ ID NO:209)	15	554
F73G129R (SEQ ID NO:210)	7	1.364
F73G129K (SEQ ID NO:211)	6	1.671

Estos datos indican que las mutaciones de aminoácidos correspondientes a los residuos 44, 45, 73 y 129 (solos o en combinación) de la GPD de *S. cerevisiae* puede aumentar el K_M de la GPD para NADH. Como se muestra en la Figura 2, los aminoácidos 73 y 129 de la GPD de *S. cerevisiae* corresponden a los aminoácidos 41 y 97 de la GPD humana, respectivamente.

Ejemplo 2: Enzimas GPD heterólogas con K_M más alto para NADH que la GPD de la GPD de *S. cerevisiae*

En este ejemplo, se identificaron enzimas glicero-3-fosfato deshidrogenasas alternativas con constantes de Michaelis (K_M) para NADH que son más altas que la GPD1 de levadura.

Una estrategia para identificar enzimas con K_M para NADH es usar valores publicados en la bibliografía para las enzimas que han sido identificadas previamente. La Tabla 10 enumera publicaciones donde la K_M para NADH es más alta que la reportada para la GPD1 de *Saccharomyces*.

Tabla 10: K_M para NADH publicadas para GPDs

K_M para NADH (mM)	Fuente	Referencia
0,023	GPD1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Albertyn et al. 1992, FEBS Lett. 308:130
0,024	<i>Leishmania mexicana</i>	Marche et al, 2000, Mol Biochem Parasitol. 106:83-91
0,032	<i>Jaculus orientalis</i>	Berrada et al, 2002 Mol Cell Biochem. 231: 117-27
0,0589	GPDH1 de <i>Dunaliella viridis</i>	He et al, 2009, Plant Mol Biol. 71:193-205
0,0592	GPDH2 de <i>Dunaliella viridis</i>	He et al, 2009, Plant Mol Biol. 71:193-205
0,078	<i>Drosophila melanogaster</i>	Niesel et al. 1982, Methods Enzymol. 89, 296-301

La enzima en la referencia de *Drosophila melanogaster* citada anteriormente identificó como “GPDH1” como proveniente del músculo de la mosca *Drosophila*. Sin embargo, la referencia es anterior a la información de secuencia acerca del gen que codifica la enzima. Posteriormente, se identificó la secuencia para esta enzima (gi: 22945708) como glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, isoforma C de la secuencia genómica de *Drosophila* (Carmon & Macintyre, 2010, Journal of Heredity 101: 225-234). Usando las técnicas bosquejadas en el Ejemplo 1, se expresó esta enzima en *E. coli*, y se midió el valor de K_M en paralelo con, y bajo las mismas condiciones usadas para medir la GPD1 de *Saccharomyces* expresada en *E. coli*. En un experimento, la K_M para NADH se midió como 5 μ M para ambas enzimas, es decir, no significativamente diferentes.

Una estrategia alternativa para identificar GPDs existentes en la naturaleza con una K_M para NADH alta es evaluar los miembros de las GPDs definidos por la nomenclatura de la comisión de enzimas EC 1.1.1.94. Aunque algunas de estas enzimas usan tanto NADH como NADPH igualmente bien (p.ej., Edgar & Bell, 1980, J Biol Chem 255: 3492-34-97), se han caracterizado otras como que tienen una preferencia por NADPH (Fronhlich et al, 2010, J Bacteriol 192: 4281-4288; Watanabe et al, 2008, Yeast 25:107-116; Sakasegawa et al, 2004, Protein Science 13: 1361-1371; Ruitjer et al, 2004, Microbiology 150: 1095-1101). Es posible que esta preferencia pueda ser manifiesta como una K_M para NADH alta (en comparación con la K_M para NADPH de la misma enzima). Usando las técnicas bosquejadas en el Ejemplo 1, se prepararon genes sintéticos en el vector de expresión pBad para las siguientes enzimas GPD: (a) *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304 (gi|11497621:c775889-774882) (SEQ ID NO:14); (b) gen CvGPD1 de *Candida versatilis* para glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (gi|157060214|dbj|AB296385.1) (SEQ ID NO:15); y (c) cromosoma BuV67-CWPP de *Rickettsia prowazekii* (gi|383499256:539930-540880) (SEQ ID NO:16).

Como en el Ejemplo 1, estas proteínas se expresaron en *E. coli*, y se usaron extractos celulares brutos para medir los valores de K_M para NADH. La GPD de *Candida versatilis* no dio una actividad mensurable significativa. La enzima de *Archaeoglobus fulgidus* tuvo una actividad mensurable con una K_M = 7 μ M para NADPH y 5 μ M para NADH y la enzima de *Rickettsia prowazekii* tuvo una actividad mensurable con una K_M = 4 μ M para NADPH y 664 μ M para NADH.

La K_M de la enzima de *Rickettsia prowazekii* para NADH fue más alta que la K_M para *Saccharomyces*. A fin de evaluar adicionalmente qué aspecto de la enzima podría estar contribuyendo a esta afinidad por NADH disminuida, la secuencia de la enzima de *Rickettsia* se comparó con la estructura cristalina de la enzima humana con NAD⁺ en el sitio de unión. Un rasgo notable del complejo enzima humana:NAD es el apilamiento pi de phe41 y phe97 intercalados alrededor del anillo de adenina del NAD⁺ (pdb: 1X0X; Ou et al, 2006 J Mol Biol 357: 858-869). El apilamiento pi es una estructura muy estable, y la alineación de secuencias revela que las posiciones homólogas se conservan en la secuencia de la GPD1 de levadura (phe73, phe129). Sin embargo, en *Rickettsia*, las posiciones homólogas en una alineación son arg35 y ala85 (véase la Figura 2). Se esperaría que estos aminoácidos desestabilizaran la unión de NADH, conduciendo así a una K_M para NADH aumentada. Esto se confirmó por mutagénesis en estas posiciones en el Ejemplo 1.

Como confirmación adicional del papel de estas posiciones de aminoácidos en aumentar la K_M para NADH, dos de las secuencias de GPD más estrechamente relacionadas fuera del género *Rickettsia* se identificaron por búsqueda BLAST de la base de datos NCBI. Dos de las secuencias más estrechamente relacionadas son de *Beggiatoa alba* (valor BLAST E = 2e-51, 37% de identidad de secuencias; SEQ ID NO:17) y *Kangiella koreensis* (valor BLAST E = 2e-50, 37% de identidad de secuencias; SEQ ID NO:18). Estas proteínas se sintetizaron y ensayaron como se describió anteriormente.

Aunque el nivel de expresión en *E. coli* para estas enzimas fue bajo, los valores medidos con la enzima de *Beggiatoa* fueron K_M = 6 μ M para NADPH y 101 μ M para NADH, mientras que los valores de la enzima de *Kangiella* fueron K_M = 1 μ M para NADPH y 2.018 μ M para NADH. Los aminoácidos en posiciones homólogas a las dos fenilalaninas que forman el apilamiento pi en la enzima humana son lys85 y gly86 en la enzima de *Beggiatoa*, y arg35 y ala86 en la enzima de *Kangiella* (véase la Figura 2).

Estos resultados confirman que ciertas GPDs de otros organismos tienen una K_M para NADH más alta, y también apoyan además que la K_M para NADH puede ser elevada diseñando enzimas GPD, por ejemplo, por modificación de aminoácidos implicados en el par de fenilalaninas de apilamiento pi.

Ejemplo 3: Producción de isobutanol y glicerol para cepas de levadura que comprenden variantes de la enzima GPD1.

- 5 En este ejemplo, las cepas de levadura con enzimas GPD1 variantes producidas y descritas anteriormente se ensayaron en cuanto a la producción de isobutanol y glicerol.

10 Cepas de GPD y variantes de GPD de PNY2145 con plásmido de ruta de isobutanol se pusieron en placas de agar completo sintético [IX base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (Difco), IX aminoácidos eliminados sin uracilo (Clone-Tech) que contenía 2% de agar (Difco), 0,2% de etanol] y se incubaron durante 72 horas en incubador 300C (New Brunswick).

Las células se cultivaron en parches en medio completo sintético [IX base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (Difco), IX aminoácidos eliminados sin uracilo (Clone-Tech) que contenía 2% de agar (Difco), 1% de glucosa (Sigma), 0,2% de etanol] y se incubaron durante 72 horas en incubador a 30°C (New Brunswick). Se adaptaron las células por cultivo en placa repetitivo cada tres días en el mismo medio durante 30 días.

- 15 Los parches de las células adaptadas se inocularon en 10 ml de medio líquido completo sintético [IX base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (Difco), IX aminoácidos eliminados sin uracilo (Clone-Tech) que contenía 2% de agar (Difco), 1% de glucosa (Sigma), 0,2% de etanol] como cultivos primarios en matraces de 125 ml (BD) y se incubaron a 30°C durante 24 horas en un agitador incubador (New Brunswick) a 250 rpm. Se inocularon cultivos secundarios a partir de los cultivos primarios en el mismo medio con una OD inicial de 0,5 y se dejaron crecer durante otras 24 horas.
- 20 Después de 24 horas se inocularon cultivos terciarios en el mismo medio a partir de los cultivos secundarios con una OD inicial de 0,5 y se dejaron crecer durante otras 24 horas. Después estas células se usaron para estudios de evaluación de variantes de GPD.

25 Las células se recogieron por centrifugación a 3.600 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga (Eppendorf) y se suspendieron en medio de producción (IX base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (Difco), IX aminoácidos eliminados sin uracilo (Clone-Tech), 35 g/l de glucosa (Sigma), 2 g/l de etanol, MES 100 mM (Sigma), IX peptona (Difco), IX extracto de levadura (Difco), HCL 1 M (Sigma) a pH 5,2) y una OD inicial de 2 en 15 ml de tubos falcon. Después se incubaron los cultivos a 30°C en un agitador incubador (New Brunswick) a 225 rpm durante 20 horas. Las muestras se recogieron en 20 horas y se analizaron por HPLC (Agilent Life Sciences) (Figura 3).

Preparación de muestras

- 30 Se recogieron los cultivos al final de la producción en 20 horas, y cada gránulo de células se resuspendió en 100 mM de MOPS pH 6,8 que contiene IX inhibidor de proteasa (Roche). La lisis se consiguió sometiendo las células a batido por bolas (Mini-Beadbeater-16, Biospec) durante 5 ciclos de 30 segundos cada uno con un intervalo de 2 min entre cada ciclo. La muestra lisada se sometió a centrifugación a 13.000 rpm durante 30 min en centrífuga a 40°C. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a otro tubo. La estimación de proteínas se hizo usando el reactivo de Bradford (Cat. #500-0205, Bio-Rad). El ensayo GPD se hizo inmediatamente sobre muestras frescas sin ninguna etapa de congelación-fusión.
- 35

Condición del ensayo

- 40 Se realizaron ensayos de glicerol-3-fosfato (GPD) usando un espectrofotómetro Cary 100 UV-Vis en un volumen de 1 ml que contenía MOPS 100 mM (Sigma) pH 6,8, EDTA 1 mM, glucosa-6-fosfato 1 mM, 3 mU/μl de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Cat. #G8404, Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO), fosfato de dihidroxiacetona 1 mM (Cat. #D51269, Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO), NADH 0,3 mM, y concentraciones variadas de extracto celular. La velocidad de la reacción se calculó tomando la pendiente del primer 1 min para la disminución en la concentración de NADH a 340 nm. El coeficiente de extracción del NADH se tomó como 6,22 mM⁻¹cm⁻¹. Para las variantes N8_1, E8_1 y M8_1 (es decir, aquellas con el mutante doble F73G/F129G) la concentración del NADH aumentó hasta 0,45 mM. Este es el
- 45 nivel de no saturación del NADH para estas variantes.

Análisis de regresión de los resultados

- Los datos usados en esta sección se proporcionan en la Tabla 11, e incluyen medidas de los productos metabólicos y las medidas in vitro de GPD como se describió anteriormente. Para representar las diferencias en la actividad de GPD medida que surge de la medida en cantidades de subsaturación de NADH, la actividad total a V_{max} se calculó resolviendo la ecuación de Michaelis-Menton de sustrato único para V_{max} , usando GPD (U/mg) para la tasa y el valor de K_M determinado en la Tabla 9.
- 50

Tabla 11: Medida in vitro de productos metabólicos y actividad específica de GPD en diversas cepas isobutanógenas de control y variantes que albergan sustitución diferente en la secuencia de GPD heteróloga/nativa.

Cepa	Cons. Glucosa (g/l)	Gly (g/l)	EtOH (g/l)	iBuOH (g/l)	Rendimiento (g/g)	relación iBuOH/Gly	GPD (U/mg)	K _M de GPD (μM)	V _{max} de GPD (U/mg)
EC_1	21,52	1,55	0,4	4,14	0,19	2,67	0,0014	11	0,0015
E3_1	18,82	1,91	0,13	3,63	0,19	1,90	0,0018	101	0,0024
E8_1	12,16	0,75	0,13	3,11	0,26	4,15	0,0003	554	0,0007
M3_1	23,81	2,44	0,35	4,36	0,18	1,79	0,0053	101	0,0071
M8_1	22,91	2,89	0,2	4,64	0,20	1,61	0,0035	554	0,0078
N3_1	22,32	3,4	0,49	3,3	0,15	0,97	0,0097	101	0,0130
N8_1	13,95	2,1	0,19	2,16	0,15	1,03	0,0084	554	0,0187
2145	30,68	3,43	0,2	5,46	0,18	1,59	0,0025	11	0,0026

Inicialmente, se observó que la integración tanto de GPDs inalteradas como de variantes siguiendo los métodos descritos anteriormente condujo a cantidades variadas de actividad GPD, analizadas en el extracto celular de levadura después de la producción de isobutanol. La actividad específica de la GPD podría variar en tanto como 10 veces. La relación isobutanol/glicerol también exhibió una correlación inversa con el nivel de actividad GPD detectada, como se muestra en la Figura 4. Como se muestra en la figura, el valor R² para la regresión lineal de esta relación fue 60,1%, pero el valor R-Sq_(pred) validado cruzado, que indica la capacidad de los datos de la actividad GPD de predecir valores desconocidos de la relación isobutanol/glicerol, fue solo 25,04%. Este resultado indicó que aunque había una correlación, la actividad GPD en solitario no era un buen predictor de esta relación.

Este factor hizo difícil detectar cambios en la contribución de las variantes de GPD de K_M alta a la producción de glicerol e isobutanol, ya que el efecto beneficioso de la K_M para NADH aumentada fue enmascarado por los niveles de actividad impredecibles. A fin de entender adicionalmente estos efectos, se aplicó un análisis de regresión lineal múltiple a los datos en la Tabla 11 para determinar si la contribución de las propiedades de los variantes podría ser cuantificada más claramente. Se sometieron parámetros moderados a rondas múltiples de regresión lineal usando Minitab (Minitab W16.2.1, Minitab Inc., State College, PA), retirando manualmente el parámetro contribuyente con el valor P mayor hasta que los valores P de los coeficientes restantes estuvieron todos por debajo de 0,05. Esto produjo una ecuación de regresión con un valor de R-sq(pred) máximo, que indica la capacidad del modelo de predecir el valor de nuevas observaciones. Dos de las medidas metabólicas en la Tabla 11 dieron modelos con parámetros contribuyentes independientes que podrían interpretarse fisiológicamente.

El título de isobutanol fue modelado usando los siguientes parámetros de la Tabla 11: glucosa consumida, etanol, glicerol, rendimiento, K_M de GPD y V_{max} de GPD. Eliminar los parámetros menos significativos dio un modelo de regresión con 3 parámetros (predictores): glucosa consumida, K_M de GPD y V_{max} de GPD (mostrados en la Figura 5 y la Tabla 12). El valor R-Sq para este modelo es 98,6%. El valor R-Sq_(pred) para este modelo es 94,32%, indicando que esta ecuación de regresión proporciona un alto grado de valor predictivo. Interpretar el modelo de regresión fisiológicamente sugiere que el título de isobutanol es predicho por contribuciones positivas de la glucosa consumida y los valores K_M de GPD, y una contribución negativa del valor V_{max} de GPD. Por tanto, a cualquier cantidad de glucosa consumido, una K_M de GPD más alta dará como resultado un aumento en el título de isobutanol. De manera similar, los aumentos en el nivel de la actividad medida de la enzima GPD (como valor V_{max}) darán como resultado una disminución en el título de isobutanol.

Tabla 12: Modelo de regresión para el título de isobutanol (g/l).

Predictor	Coefficiente	Coefficiente SE	T	P	VIF
Constante	0,3316	0,3499	0,95	0,397	
Glucosa consumida (g/l)	0,17741	0,01382	12,83	0,000	1,804
K _M de GPD (μM)	0,0013789	0,0003309	4,17	0,014	1,977
V _{max} de GPD (U/mg)	-75,81	10,10	-7,50	0,002	1,146

El modelo de regresión permitió una estimación de la magnitud de estos efectos. A un nivel de consumo de glucosa de 30 g/l, y V_{max} de GPD de 0,0026 U/mg, aumentar la K_M de 11 μM (tipo salvaje) hasta 550 μM dio como resultado un aumento de 14% en el título de isobutanol. Sin embargo, a un nivel de consumo de glucosa de 30 g/l, K_M a 11 μM y un aumento en el nivel de GPD de 0,0015 U/mg a 0,019 U/mg (el cambio máximo en actividad de la Tabla 11) dio

como resultado una disminución de 25% en el título de isobutanol. Este modelo de regresión demostró por lo tanto que disminuir la afinidad de la GPD por NADH (K_M aumentada), aumentó el título de isobutanol en las muestras mostradas aquí.

El rendimiento de isobutanol (gramos de isobutanol/gramos de glucosa consumida) fue moderado de manera similar usando los siguientes parámetros de la Tabla 12: glucosa consumida, etanol, glicerol, isobutanol, K_M de GPD y V_{max} de GPD. La eliminación de los parámetros menos significativos dio un modelo de regresión usando 2 parámetros, K_M de GPD y V_{max} de GPD (Véase la Figura 6 y la Tabla 13). Este modelo de regresión tuvo un valor R-Sq de 93,9%. Este modelo de regresión predijo el rendimiento con el valor R-Sq_(pred) de 76,3%, y notablemente es dependiente únicamente del nivel de actividad y la K_M de la enzima GPD. De manera similar al modelo de regresión para el título de isobutanol, la V_{max} de GPD tiene una contribución negativa al rendimiento. En este modelo de regresión, aumentar la K_M de GPD de 11 μ M (tipo salvaje) hasta 550 μ M, al nivel de actividad de GPD más bajo observado de 0,0015 U/mg, dio como resultado una mejora del rendimiento de 28%. En el nivel de actividad de GPD más alto observado aquí (0,019 U/mg) la mejora del rendimiento fue 78%.

Tabla 13: Modelo de regresión para el rendimiento (g/g).

Predictor	Coefficiente	Coefficiente SE	T	P	VIF
Constante	0,199176	0,005908	33,71	0,000	
K_M de GPD (μ M)	0,00009410	0,00001597	5,89	0,002	1,144
V_{max} de GPD (U/mg)	-5,2197	0,6404	-8,15	0,000	1,144

Ejemplo 4: Profético

En este ejemplo, los integrantes de la levadura GPD1 heterólogos descritos anteriormente se ensayan en cuanto a la producción de isobutanol y glicerol.

Medios de cultivo y procedimiento

Se usan dos tipos de medios durante el procedimiento de cultivo de las cepas de levadura: un medio de precultivo aeróbico y medio de cultivo anaeróbico. Todos los productos químicos se obtienen de Sigma a menos que se indique otra cosa (St. Louis, MO).

Medio de precultivo aeróbico (SE-Ura-His): 6,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (Difco, 291940, Sparks, MD), 1,4 g/l de suplemento de medio de eliminación sintético de levadura sin histidina, leucina, triptófano y uracilo, 0,2% de etanol, 0,2% de glucosa, 0,01% p/v de leucina y 0,002% p/v de triptófano.

Medio de cultivo anaeróbico (SEG-Ura-His): MES 50 mM (pH 5,5, 6,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (Difco, 291940, Sparks, MD), 1,4 g/l de suplemento de medio de eliminación sintético de levadura sin histidina, leucina, triptófano y uracilo, 0,1% de etanol, 3% de glucosa, 0,01% de leucina, 0,002% de triptófano, 30 mg/l de ácido nicotínico, 30 mg/l de tiamina y 10 mg/l de ergosterol constituido en disolución de Tween/etanol 50/50 v/v.

Las células cultivadas en parches se inoculan en 25 ml de medio SEG-Ura-His con 0,2% de glucosa y 0,2% de etanol, y se cultivan en condiciones progresivamente limitadas en oxígeno con la tapa cerrada durante aproximadamente 48 horas a 30°C con agitación, hasta que se alcanza un valor de OD₆₀₀ diana de aproximadamente 1,5 a 2. Los valores OD₆₀₀ se registran. Las células se agrupan en gránulos por medio de centrifugación y el sobrenadante se descarta. Los gránulos de células se transfieren a una Coy Anaerobic Bag (Grass Lake, MI) donde los gránulos se resuspenden en 1,0 ml de medio de crecimiento anaeróbico (SEG-Ura-His). Los gránulos de células resuspendidos se usan para inocular 30 ml de medio SEG-Ura-His en botellas de suero de 50 ml (Wheaton, 223748, Millville, NJ) hasta un valor de OD₆₀₀ diana inicial de 0,2. Todos los medios anaeróbicos, viales de suero, tapones y cierres se dejan desgasificar en la bolsa anaeróbica durante al menos 24 horas antes de la inoculación. Las botellas de suero se taponan, se cierran y se transfieren fuera de la bolsa anaeróbica y se cultivan a 30°C con agitación a 240 rpm. Los cultivos anaeróbicos se cultivan durante 24 o 72 horas con un valor de OD₆₀₀ diana de al menos 1,2. Las etapas de cultivo anaeróbico adicionales usaron las células de la etapa de cultivo anaeróbico anterior como inoculante. Se evaluaron tres transformantes para cada variante.

Análisis por HPLC de cepas de GPD1 de levadura variantes y heterólogas

Se toman muestras para análisis por HPLC y para obtener valores de OD₆₀₀ al final del periodo de crecimiento anaeróbico. El análisis por HPLC se realiza usando una unidad de separaciones Waters 2695, detector de matriz de diodos 2996, y detector de índice de refracción 2414 (Waters, Milford, MA) con una precolumna Shodex Sugar SH-G y columna de separaciones Shodex Sugar SH1011 (Shodex, JM Science, Grand Island, NY). Los compuestos son separados por elución isocrática en ácido sulfúrico 0,01 N con un caudal de 0,5 ml/min. Los cromatogramas se analizan usando el programa informático Waters Empower Pro.

Se determinan los rendimientos molares para glicerol, isobutanol y la relación isobutanol/glicerol. Se calculan las

medias y desviaciones estándar a partir de análisis por triplicado para cada GPD variante y heteróloga. Se emplea el test t de Student para determinar si la diferencia en los valores es estadísticamente significativa de los valores de control de GPD1 optimizada por codones.

Ejemplo 5: Efecto de *gpsA* sobre la producción de isobutanol

- 5 Se cultivaron las cepas CPN97 y PNY2310 en medio sintético de levadura que contenía MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) 100 mM, 3 g/l de glucosa y 3 g/l de etanol y que carecía de histidina y uracilo. Se seleccionó una colonia de cada cepa y se inoculó en 10 ml de medio sintético de levadura que contenía 10 g/l de glucosa y MES 100 mM sin histidina y uracilo y se incubó durante una noche a 30°C a 200 rpm. Después de la incubación durante una noche, las células se resuspendieron hasta una $OD_{600} = 0,4$ en 10 ml de medio sintético de levadura que contenía 20 g/l de glucosa y MES 100 mM sin histidina y uracilo y se incubaron durante 4 horas a 30°C y 200 rpm. Después se recogieron las células y se resuspendieron hasta una $OD_{600} = 0,2$ en 10 ml de medio sintético de levadura que contenía 20 g/l de glucosa y MES 100 mM sin histidina y uracilo en un vial de suero de 20 ml (Wheaton; Millville, NJ), se tapó con un tapón de butilcaucho y se selló. Los viales se pusieron en un incubador a 30°C, se hicieron girar a 200 rpm, y se incubaron durante 28 y 42,5 horas. Se prepararon dos viales para cada cepa ensayada.
- 15 Después de 28 y 42,5 horas, se abrió la tapa de uno de los viales, se midió la OD_{600} y se analizó el caldo por HPLC. El análisis por HPLC se realizó en un sistema Agilent Series 1100 HPLC que contenía un detector de índice de refracción usando una columna de exclusión Bio-Rad Aminex HPX-87H de 300 mm x 7,8 mm (BioRad; Hercules, CA) incubada a 50°C y equipada con una recarga BioRad-Microguard Cation H de 30 mm x 4,6 mm. Las muestras se ejecutaron a un caudal de 0,6 ml/min en tampón de ejecución ácido sulfúrico 0,01 N. A partir del análisis por HPLC; se observó que el rendimiento de isobutanol (Figura 7) y la relación isobutanol/glicerol (Figura 8) aumentaron en CPN97 en comparación con PNY2310, y el consumo de glucosa disminuyó (Figura 9) en CPN97 en comparación con PNY2310. Aunque se cultivan en condiciones aeróbicas, las densidades ópticas (ODs) en función del tiempo fueron similares.

Ejemplo 6: Generación de *gpsA* resistente a la retroalimentación

25 Profético

El alelo *gpsA* fue amplificado usando ADN cromosómico de *E. coli* MG1655 y los cebadores P_{trc}-*gpsA* NcoIF (SEQ ID NO:238) y P_{trc}-*gpsA* PstI R (SEQ ID NO:239). El alelo *gpsA* se clonó en pTrcHis2B digerido por NcoI/PstI (Invitrogen; Carlsbad, CA) usando el kit de clonación y ensamblaje sin costuras GeneArt (Life Technologies, Carlsbad, CA), para formar pCPN124.

- 30 pCPN124 se somete a mutagénesis propensa a errores usando el kit GeneP_{mor}II Random Mutagenesis de Agilent (Santa Clara, CA). Los plásmidos que se obtienen son transformados en la cepa BB26-36 (Bell, J. Bact. 117:1065-1076 (1974)). La cepa BB26-36 contiene una mutación en el gen *plsB*. Adicionalmente, la cepa no tiene la auxotrofia a glicerol-3-fosfato de la cepa parental BB26, debido a la pérdida de inhibición de glicerol cinasa (GlpK) por fructosa-1,6-difosfato (*fru*-1,6-diP), con lo que BB26-36 puede producir glicerol-3-fosfato y crecer en medio mínimo M9 más glicerol 3 g/l y glucosa 3 g/l (M9 contiene 12,8 g de fosfato de sodio heptahidrato, 3 g de fosfato de potasio monobásico, 0,5 g de cloruro de sodio, 1 g de cloruro de amonio, 0,24 g de sulfato de magnesio, y 11,1 g de cloruro de calcio, por litro).

- 40 La reacción de transformación se pone en placas en medio M9 que contiene 5 g/l de glucosa y 50 mg/l de carbenicilina. Los plásmidos se extraen de las colonias que crecen en estas placas, y se secuencia el *gpsA*. Se determinó la actividad de GpsA de la proteína mutada y se mide la K_i para glicerol-3-fosfato. Las proteínas con K_i aumentada en comparación con la proteína de tipo salvaje se usan después para reemplazar a GPD1 en el cromosoma de la levadura y se mide la producción de isobutanol y glicerol.

Listado de secuencias

- <110> Butamax Advanced Biofuels LLC
- 45 <120> Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa para la producción de butanol
- <130> CL5707WOPCT
- <150> 61/782.651
- <151> 14-03-2013
- <150> 61/934.096
- 50 <151> 31-01-2014
- <160> 250
- <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> oBP1329
 <400> 1
 aattggcgcg ccgtgtagac gtagtataac agtatatc 38
 10 <210> 2
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP1333
 15 <400> 2
 atctgtcagc agcagcggac atctttatat tatcaatatt tgtgtttg 48
 <210> 3
 <211> 50
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP1334
 <400> 3
 aaacacaaat attgataata taaagatgtc cgctgctgct gacagattga 50
 25 <210> 4
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> oBP1335
 <400> 4
 ttaagtttaa acttagtctt cgtgtaagtc taattc 36
 <210> 5
 <211> 25
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP1341
 <400> 5
 40 gacctataaa ccacctgtgc tgggtg 25
 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> oBP1342
 <400> 6

	agcccgaaag agttatcggt actcc	25
	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oBP1344	
	<400> 7	
	aatatcaacg tcttgacac t	21
10	<210> 8	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> oBP1345	
	<400> 8	
	cacatctgaa atcatcgtaa ggaac	25
	<210> 9	
	<211> 5036	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> pBP3518	
	<400> 9	
	tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
25	cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120

ES 2 735 024 T3

ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcggggc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaagg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	cgagctcggt	acccggggat	420
ccggcgcgcc	gtttaaactc	atgtaattag	ttatgtcacg	cttacattca	cgccctcctc	480
ccacatccgc	tctaaccgaa	aaggaaggag	ttagacaacc	tgaagtctag	gtccctattt	540
atTTTTTTta	atagttatgt	tagtattaag	aacgttatTT	atatttcaaa	TTTTTctttt	600
TTTTctgtac	aaacgcgtgt	acgcatgtaa	cattatactg	aaaaccttgc	ttgagaaggt	660
TTTgggacgc	tcgaaggctt	taatttgcg	ggccggccgc	attgcggatt	acgtattcta	720
atgttcagta	ccgttcgtat	aatgtatgct	atacgaagtt	atgcagattg	tactgagagt	780
gcaccatacc	acTTTTcaa	ttcatcattt	TTTTTTtatt	TTTTTTTTtg	atttcggttt	840
ccttgaaatt	TTTTtgattc	ggtaatctcc	gaacagaagg	aagaacgaag	gaaggagcac	900
agacttagat	tggtatatat	acgcatatgt	agtgttgaag	aaacatgaaa	ttgccagta	960
ttcttaaccc	aactgcacag	aacaaaaacc	tgcaggaaac	gaagataaat	catgtcgaaa	1020
gctacatata	aggaacgtgc	tgctactcat	cctagtcctg	ttgctgccaa	gctatttaat	1080
atcatgcacg	aaaagcaaac	aaacttggtg	gcttcattgg	atgttcgtac	caccaaggaa	1140
ttactggagt	tagttgaagc	attaggtccc	aaaatttggt	tactaaaaac	acatgtggat	1200
atcttgactg	atttttccat	ggagggcaca	gttaagccgc	taaaggcatt	atccgccaa	1260
tacaattttt	tactcttcga	agacagaaaa	tttgctgaca	ttggtaatac	agtcaaattg	1320
cagtactctg	cgggtgtata	cagaatagca	gaatgggcag	acattacgaa	tgcacacggt	1380
gtggtggggc	caggtattgt	tagcggtttg	aagcaggcgg	cagaagaagt	aacaaaggaa	1440
cctagaggcc	ttttgatggt	agcagaattg	tcatgcaagg	gctccctatc	tactggagaa	1500
tatactaagg	gtactgttga	cattgcgaag	agcgacaaag	attttgttat	cggctttatt	1560
gctcaaagag	acatgggtgg	aagagatgaa	ggttacgatt	ggttgattat	gacacccggt	1620
gtgggttttag	atgacaagg	agacgcattg	ggtcaacagt	atagaaccgt	ggatgatgtg	1680
gtctctacag	gatctgacat	tattattggt	ggaagaggac	tatttgcaaa	gggaagggat	1740
gctaaggtag	agggtgaacg	ttacagaaaa	gcaggctggg	aagcatatTT	gagaagatgc	1800
ggccagcaaa	actaaaaaac	tgtattataa	gtaaatgcat	gtatactaaa	ctcaciaaatt	1860
agagcttcaa	tttaattata	tcagttatta	ccctatgcgg	tgtgaaatac	cgcacagatg	1920
cgtaaggaga	aaataccgca	tcaggaaatt	gtaagcggtta	atattttggt	aaaattcgcg	1980

ES 2 735 024 T3

ttaaattttt	gttaaatacag	ctcatttttt	aaccaatagg	ccgaaatcgg	caaaatccct	2040
tataaatcaa	agaatagac	cgagataggg	ttgagtgttg	ttccagtttg	gaacaagagt	2100
ccactattaa	agaacgtgga	ctccaacgtc	aaagggcgaa	aaaccgtcta	tcagggcgat	2160
ggcccactac	gtgaaccatc	accctaataca	agataacttc	gtataatgta	tgctatacga	2220
acggtaccag	tgatgatata	acgagtttagc	caaggtggcg	gccgcattta	ttggagaaaag	2280
ataacatatc	atactttccc	ccactttttt	cgaggctctt	ctatatcata	ttcataaatt	2340
agcattatgt	cattttctcat	aactacttta	tcacgttaga	aattacttat	tattattaaa	2400
ttaatacaaa	atttagtaac	caaataaata	taaataaata	tgcatattta	aattttaaaa	2460
aaaaatccta	tagagcaaaa	ggattctcca	ttataatatg	agctatacac	ctcttacgca	2520
ttttttgagg	gtggttacaa	caccactcat	tcagaggctg	tcggcacagt	tgcttccagc	2580
atctggcgtc	cgtatgtatg	ggtgtatttt	aaataataaa	caaagtgcc	caccttcacc	2640
aattatgtct	ttaagaaatg	gacaagttcc	aaagagcttg	cccaaggctc	gacaaggatg	2700
tacttttagaa	tatctatatt	caagtacgtg	gcgcgcatat	gtttgagtgt	gcacacaata	2760
aaggttaatt	aatctagagt	cgacctgcag	gcatgcaagc	ttggcgtaat	catggtcata	2820
gctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	2880
cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaata	agttagctaa	ctcacattaa	ttgcgttgcg	2940
ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcggcca	3000
acgcgcgggg	agaggcggtt	tgcgatttgg	gcgctcttcc	gcttccctgc	tcactgactc	3060
gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgccgagagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatagc	3120
gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaaag	gccagcaaaa	3180
ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	3240
cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aacccgacag	gactataaag	3300
ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	3360
taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcggtg	gcgctttctc	atagctcacg	3420
ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgacgaacc	3480
ccccgttcag	cccgaaccgt	gcgccttatc	cgtaactat	cgtcttgagt	ccaacccggt	3540
aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	3600
tgtaggcggt	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	3660
agtatttggt	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	3720
ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	3780
tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	3840
tcagtggaaac	gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	agattatcaa	aaaggatctt	3900

ES 2 735 024 T3

cacctagatc	cttttaaatt	aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	3960
aacttggtct	gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaggca	cctatctcag	cgatctgtct	4020
atttcgttca	tccatagttg	cctgactccc	cgtcgtgtag	ataactacga	tacgggaggg	4080
cttaccatct	ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	4140
tttatcagca	ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	4200
atccgcctcc	atccagtcta	ttaattgttg	ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	4260
taatagtttg	cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	gtggtgtcac	gctcgtcggt	4320
tggtatggct	tcattcagct	cgggttccca	acgatcaagg	cgagttacat	gatcccccat	4380
gttgtgcaaa	aaagcggtta	gtccttcgg	tcctccgatc	gttgtcagaa	gtaagttggc	4440
cgcagtgtta	tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	tctcttactg	tcatgccatc	4500
cgtaagatgc	ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	4560
gcggcgaccg	agttgctctt	gcccggcgtc	aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	4620
aactttaaaa	gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	4680
accgctgttg	agatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	4740
ttttactttc	accagcgttt	ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaatg	ccgcaaaaaa	4800
gggaataaag	gcgacacgga	aatgttgaat	actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	4860
aagcatttat	cagggttatt	gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	4920
taaacaaata	ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	tctaagaaac	4980
cattattatc	atgacattaa	cctataaaaa	taggcgtatc	acgaggccct	ttcgtc	5036

<210> 10
 <211> 7063
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> pBP3518GPD*

<400> 10

tgcgcggttt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacgggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcggggc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaagg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	cgagctcggt	acccggggat	420

cggcgcgccc gtgtagacgt agtataacag tatactctgac acgcacgtga tgaccacgta	480
atcgcatcgc ccctcacatc tcacctctca ccgctgactc agcttcacta aaaaggaaaa	540
tatatactct ttcccaggca aggtgacagc ggtccccgtc tcctccacaa aggcctctcc	600
tggggtttga gcaagtctaa gtttacgtag cataaaaatt ctcggtattgc gtcaaataat	660
aaaaaaagta actccacttc tacttctaca tcggaaaaac attccattca catatcgtct	720
ttggcctatc ttgttttgtc cttggtagat caggtcagta caaacgcaac acgaaagaac	780
aaaaaaagaa gaaaacagaa ggccaagaca gggatcaatga gactgttgtc ctccctactgt	840
ccctatgtct ctggccgatc acgcgccatt gtccctcaga aacaaatcaa acaccacac	900
cccgggcacc caaagtcccc acccacacca ccaatacgtg aacggggcgc cccctgcagg	960
ccctcctgcg cgcggcctcc cgccttgctt ctctccctc ccttttcttt ttccagtttt	1020
ccctattttg tccctttttc cgcacaacaa gtatcagaat gggttcatca aatctatcca	1080
acctaattcg cacgtagact ggcttggtat tggcagtttc gcagttatat atatactacc	1140
atgagtgaat ctgttacgtt accttaaatt ctttctccct ttaattttct tttatcttac	1200
tctcctacat aagacatcaa gaaacaattg tatattgtac aaaaaaaaa tccacaaaca	1260
caaatattga taatataaag atgtccgctg ctgctgacag attgaacttg acatctggtc	1320
acttgaacgc tggtagaaag agatcatcct cctctgtctc tttgaaggct gccgaaaagc	1380
cattcaaggc caccgttatc ggttctggta actggggtag caccattgcc aaggctcgtc	1440
ccgaaaactg caagggttac ccagaagttt ttgctccaat cgttcaaattg tgggtttttg	1500
aagaggaaat taacggtgaa aagttgactg aaattatcaa cactagacac caaaacgtga	1560
agtacttgcc cggattacc ttgccagaca atttggttgc caatccagac ttgatcgata	1620
gtgtcaagga cgttgatatt atcggttttta acatccaca ccaattccta ccacgtattt	1680
gttctcaatt gaagggtcat gtcgattctc acgttagagc tatctcctgc ttgaagggtt	1740
tcgaagttgg tgctaagggt gttcaattgt taccctctta catcactgaa gagctaggta	1800
tccaatgtgg tgctttgtct ggtgctaaca tcgctaccga agtcgctcaa gagcactggt	1860
ctgaaaccac tgcgcgttac catatcccaa aggactttag aggtgaagggt aaagacgttg	1920
accacaaggc cctaaaggct ttgttccaca gaccatactt tcacgtttct gtcacgaag	1980
atgtcgccgg tatctctatc tgtggcgctt taaagaacgt cgtcgccctg ggttgtgggt	2040
ttgttgaagg attgggttgg ggtaacaacg cctctgctgc tatccaacgt gtcggtttgg	2100
gtgaaatcat tagatttgggt caaatgtttt tccctgaatc cagagaggaa acctactacc	2160
aagagtctgc cgggtgttgc gacctataa ccacctgtgc tggtggtaga aacgttaagg	2220
ttgccagatt gatggctact tccggtgaagg acgcttggga atgtgaaaag gaattgttga	2280
acggtcaatc cgctcaagggt ttgattactt gtaaggaagt tcacgaatgg ttggaaactt	2340

ES 2 735 024 T3

gtggcagcgt tgaagat tttt ccattattcg aagctgtcta ccaaatcgtc tacaataact	2400
accctatgaa aaacttgcca gatatgatcg aggaattaga cttacacgag gactaagttt	2460
aaactcatgt aattagttat gtcacgctta cattcacgcc ctctctccac atccgctcta	2520
accgaaaagg aaggagttag acaacctgaa gtctaggtcc ctatttattt tttttaatag	2580
ttatgttagt attaagaacg ttattttatat ttcaaatttt tctttttttt ctgtacaaac	2640
gcgtgtacgc atgtaacatt atactgaaaa ccttgcttga gaaggttttg ggacgctcga	2700
aggctttaat ttgcggggcc ggccgcattg cggattacgt attctaattgt tcagtaccgt	2760
tcgtataatg tatgctatac gaagtattgc agattgtact gagagtgcac cataccacct	2820
tttcaattca tcat tttttt tttattcttt tttttgattt cggtttcctt gaaatttttt	2880
tgattcggta atctccgaac agaaggaaga acgaaggaag gagcacagac ttagattgggt	2940
atatatacgc atatgtagt ttgaagaaac atgaaattgc ccagtattct taaccaact	3000
gcacagaaca aaaacctgca ggaaacgaag ataaatcatg tcgaaagcta catataagga	3060
acgtgctgct actcatccta gtcctgttgc tgccaagcta tttaatatca tgcaacgaaaa	3120
gcaaacaaac ttgtgtgctt cattggatgt tcgtaccacc aaggaattac tggagttagt	3180
tgaagcatta ggtcccaaaa tttgtttact aaaaacacat gtggatatct tgactgattt	3240
ttccatggag ggcacagtta agccgctaaa ggcattatcc gccaaagtaca attttttact	3300
cttogaagac agaaaatttg ctgacattgg taatacagtc aaattgcagt actctgcggg	3360
tgtatacaga atagcagaat gggcagacat tacgaatgca cacggtgtgg tgggccagg	3420
tattgttagc ggtttgaagc aggcggcaga agaagtaaca aaggaacctt gaggcctttt	3480
gatgttagca gaattgtcat gcaagggctc cctatctact ggagaatata ctaagggtag	3540
tgttgacatt gcgaagagcg acaaagattt tgttatcggc tttattgctc aaagagacat	3600
gggtggaaga gatgaaggtt acgattgggt gattatgaca cccggtgtgg gtttagatga	3660
caagggagac gcattgggtc aacagtatag aaccgtggat gatgtggtct ctacaggatc	3720
tgacattatt attgttgaa gaggactatt tgcaaaggga agggatgcta aggtagaggg	3780
tgaacgttac agaaaagcag gctgggaagc atatttgaga agatgcggcc agcaaaaacta	3840
aaaaactgta ttataagtaa atgcatgtat actaaactca caaattagag cttcaattta	3900
attatatcag ttattaccct atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat	3960
accgcatcag gaaattgtaa gcgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta	4020
aatcagctca ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga	4080
atagaccgag atagggttga gtgttgttcc agtttggaac aagagtccac tattaagaa	4140
cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga	4200

ES 2 735 024 T3

accatcaccc	taatcaagat	aacttcgtat	aatgtatgct	atacgaacgg	taccagtgat	4260
gatacaacga	gtagccaag	gtggcgccg	catttatgg	agaaagataa	catatcatat	4320
tttccccac	tttttcgag	gctcttctat	atcatattca	taaattagca	ttatgtcatt	4380
tctcataact	actttatcac	gtagaaatt	acttattatt	attaaattaa	tacaaaattt	4440
agtaaccaa	taaatataa	taaatatgca	tatttaaatt	ttaaaaaaaa	aatcctatag	4500
agcaaaagga	ttctccatta	taatatgagc	tatacacctc	ttacgcattt	tttgaggggtg	4560
gttacaacac	cactcattca	gaggctgtcg	gcacagttgc	ttccagcatc	tggcgtccgt	4620
atgtatgggt	gtatttttaa	taataaaca	agtgccacac	cttcaccaat	tatgtcttta	4680
agaaatggac	aagttccaaa	gagcttgccc	aaggctcgac	aaggatgtac	tttagaatat	4740
ctatattcaa	gtacgtggcg	cgcatatgtt	tgagtgtgca	cacaataaag	gttaattaat	4800
ctagagtcga	cctgcaggca	tgcaagcttg	gcgtaatcat	ggcatagct	gtttcctgtg	4860
tgaaattgtt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	cgggaagcat	aaagtgtaaa	4920
gcctgggggtg	cctaagtgtg	gagctaactc	acattaattg	cggtgcgctc	actgccgct	4980
ttccagtcgg	gaaacctgtc	gtgccagctg	cattaatgaa	tggccaacg	cgcggggaga	5040
ggcggtttgc	gtattggcg	ctcttcgct	tcctcgctca	ctgactcgct	gcgctcgctc	5100
gttcggctgc	ggcgagcgg	atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	5160
tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	5220
aaaaaggccg	cggtgtggc	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	5280
aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgttt	5340
ccccctggaa	gctccctcgt	ggctctcct	gttccgaccc	tgcgcttac	cggatacctg	5400
tccgcctttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	5460
agttcggtgt	aggtcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	5520
gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	acccggttaag	acacgactta	5580
tgcgactgg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cgaggtatgt	aggcgggtgt	5640
acagagttct	tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atttggtatc	5700
tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	5760
caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	5820
aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	tctacggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	5880
aactcacgtt	aagggatttt	ggctcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	5940
ttaaattaa	aatgaagttt	taaatcaatc	taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	6000
agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	atctcagcga	tctgtctatt	tcgttcaccc	6060
atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	gggagggcct	accatctggc	6120

ES 2 735 024 T3

```

cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca cgctcacccg ctccagatth atcagcaata 6180
aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtgggtcctg caactttatc cgcctccatc 6240
cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg 6300
aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca 6360
ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa 6420
gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggttatca 6480
ctcatgggta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt 6540
tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt 6600
tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 6660
ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga 6720
tccagttcga tgtaaccac tctgtgaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 6780
agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataaggcg 6840
acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 6900
ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 6960
gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg 7020
acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtc 7063

```

<210> 11
 <211> 7555
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> p423:Gallp-CRE-ADHt

<400> 11

```

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accataaatt cccgttttaa gagcttggtg agcgttagga gtcactgcc ggtatcgttt 240
gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt cccgcaattt tctttttcta 300
ttactcttgg cctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa tgattttcat 360
tttttttttt cccctagcgg atgactcttt ttttttctta gcgattggca ttatcacata 420
atgaattata cattatataa agtaatgtga tttcttcgaa gaatatacta aaaaatgagc 480
aggcaagata aacgaaggca aagatgacag agcagaaagc cctagtaaag cgtattacaa 540
atgaaaccaa gattcagatt gcgatctctt taaagggtgg tcccctagcg atagagcact 600

```

cgatcttccc agaaaaagag gcagaagcag tagcagaaca ggccacacaa tgcgaagtga	660
ttaacgtcca cacaggtata gggtttctgg accatatgat acatgctctg gccaaagcatt	720
ccggctggtc gctaatacgtt gagtgcattg gtgacttaca catagacgac catcacacca	780
ctgaagactg cgggattgct ctccgtcaag cttttaaaga ggcctactg gcgcgtggag	840
taaaaagggt tggatcagga tttgcgcctt tggatgaggc actttccaga gcggtggtag	900
atctttcgaa caggccgtac gcagttgtcg aacttggttt gcaaaggag aaagtaggag	960
atctctcttg cgagatgatc ccgcattttc ttgaaagctt tgcagaggct agcagaatta	1020
ccctccacgt tgattgtctg cgaggcaaga atgatcatca ccgtagttag agtgcggttca	1080
aggctcttgc ggttgccata agagaagcca cctcgcccaa tggtagcaac gatgttccct	1140
ccaccaaagg tgttcttatg tagtgacacc gattatttaa agctgcagca tacgatatat	1200
atacatgtgt atatatgtat acctatgaat gtcagtaagt atgtatacga acagtatgat	1260
actgaagatg acaaggtaat gcatcattct atacgtgtca ttctgaacga ggcgcgcttt	1320
ccttttttct ttttgctttt tctttttttt tctcttgaac tcgacggatc tatgcggtgt	1380
gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggaaattgta aacgttaata	1440
ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg	1500
aaatcgga aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtggtgttc	1560
cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa	1620
ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt	1680
cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc cttaaaggag ccccgattt agagcttgac	1740
ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta	1800
gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg	1860
cgccgctaca gggcgctgc cgccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc	1920
gatcggtgcg ggccctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc	1980
gattaagttg ggtaacgcc gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg	2040
agcgcgcgta atacgactca ctataggcg aattgggtac cgggcccccc ctcgaggtcg	2100
acggtatcga taagcttgat tagaagccgc cgagcggcg acagccctcc gacggaagac	2160
tctcctccgt gcgtcctcgt cttcacccgt cgcgcttcctg aaacgcagat gtgcctcgcg	2220
cgcactgct ccgaacaata aagattctac aatactagct tttatggtta tgaagaggaa	2280
aaattggcag taacctggcc ccacaaacct tcaaattaac gaatcaaatt aacaaccata	2340
ggatgataat gcgattagtt ttttagcctt atttctgggg taattaatca gcgaagcgat	2400
gatttttgat ctattaacag atatataaat ggaaaagctg cataaccact ttaactaata	2460
ctttcaacat tttcagtttg tattacttct tattcaaatg tcataaaagt atcaacaaaa	2520

ES 2 735 024 T3

aattgttaat atacctctat actttaacgt caaggagaaa aatgtccaat ttactgcccg	2580
tacaccaaaa ttgcctgca ttaccggtcg atgcaacgag tgatgagggt cgcaagaacc	2640
tgatggacat gttcagggat cgccaggcgt tttctgagca tacctggaaa atgcttctgt	2700
ccgtttgccg gtcgtgggcg gcatggtgca agttgaataa ccggaaatgg tttcccgcat	2760
aacctgaaga tgttcgcgat tatcttctat atcttcaggc gcgcggtctg gcagtaaaaa	2820
ctatccagca acatttgggc cagctaaaca tgcttcacgt tcggtccggg ctgccacgac	2880
caagtgcag caatgctgtt tcaactggtta tgcggcggat ccgaaaagaa aacgttgatg	2940
ccggtgaacg tgcaaaacag gctctagcgt tcgaacgcac tgatttcgac cagggttcgtt	3000
cactcatgga aaatagcgat cgctgccagg atatacgtaa tctggcattt ctggggattg	3060
cttataacac cctgttacgt atagccgaaa ttgccaggat cagggttaaa gatatctcac	3120
gtactgacgg tgggagaatg ttaatccata ttggcagaac gaaaacgctg gttagcaccg	3180
cagggtgtaga gaaggcactt agcctggggg taactaaact ggtcgagcga tggatttccg	3240
tctctggtgt agctgatgat ccgaataact acctgttttg ccgggtcaga aaaaatggtg	3300
ttgccgcgcc atctgccacc agccagctat caactcgcgc cctggaaggg atttttgaag	3360
caactcatcg attgatttac ggcgctaagg atgactctgg tcagagatac ctggcctggt	3420
ctggacacag tgcccgtgtc ggagccgcgc gagatatggc ccgcgctgga gtttcaatac	3480
cggagatcat gcaagctggt ggctggacca atgtaaatat tgcatgaac tatatccgta	3540
acctggatag tgaaacaggg gcaatggtgc gcctgctgga agatggcgat taggagtaag	3600
cgaatttctt atgatttatg atttttatta ttaaataagt tataaaaaaa ataagtgtat	3660
acaaatttta aagtgactct taggttttaa aacgaaaatt ctatttcttg agtaactctt	3720
tcctgtaggt cagggttgctt tctcaggat agcatgaggt cgctcttatt gaccacacct	3780
ctaccggcat gccgagcaaa tgcttgcaaa tcgctcccca tttcacccaa ttgtagatat	3840
gctaactcca gcaatgagtt gatgaatctc ggtgtgtatt ttatgtcctc agaggacaac	3900
acctgtggtg ttctagagcg gccgccaccg cgggtggagct ccagcttttg ttccctttag	3960
tgagggttaa ttgcgcgctt ggcgtaataca tgggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt	4020
tatccgctca caattccaca caacatagga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg	4080
gcctaatagag tgaggtaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg	4140
ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcgccaac gcgcggggag aggcgggttg	4200
cgtattgggc gctcttcgcg ttctcgcgc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg	4260
cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat	4320
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc	4380

ES 2 735 024 T3

gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacao	aaatcgacgc	4440
tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccacagga	ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	4500
agctccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	cggataacct	gtccgccttt	4560
ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	cagttcgggtg	4620
taggtcggtc	gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	cgttcagcc	cgaccgctgc	4680
gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtcc	aacccggtaa	gacacgactt	atcgccactg	4740
gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggcgggtgc	tacagagttc	4800
ttgaagtgg	ggcctaacta	cggctacact	agaaggacag	tatttggtat	ctgcgctctg	4860
ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	4920
gctggtagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	4980
caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaacga	aaactcacgt	5040
taagggatth	tggatcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	tttaaattaa	5100
aatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggtctga	cagttaccaa	5160
tgttaataca	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcatc	catagttgcc	5220
tgactccccg	tctgttagat	aactacgata	cgggagggct	taccatctgg	ccccagtgtc	5280
gcaatgatac	cgcgagaccc	acgtcacccg	gctccagatt	tatcagcaat	aaaccagcca	5340
gccggaaggg	ccgagcgcag	aagtggctct	gcaactttat	cgcctccat	ccagtctatt	5400
aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tccaggtta	atagtttgcg	caacgttggt	5460
gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tctcgtttg	gtatggcttc	attcagctcc	5520
ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tccccatgt	tgtgcaaaaa	agcggtagc	5580
tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	aagttggccg	cagtgttatc	actcatgggt	5640
atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	atgccatccg	taagatgctt	ttctgtgact	5700
ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	ggcgaccgag	ttgctcttgc	5760
cggcgctcaa	tacgggataa	taccgcgcca	catagcagaa	ctttaaaagt	gctcatcatt	5820
ggaaaacgtt	cttcggggcg	aaaactctca	aggatcttac	cgtgttgag	atccagttcg	5880
atgtaacca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	ttactttcac	cagcgtttct	5940
gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	gaataagggc	gacacggaaa	6000
tgttgaatac	tcataactct	cctttttcaa	tattattgaa	gcatttatca	gggttattgt	6060
ctcatgagcg	gatacatatt	tgaatgtatt	tagaaaaata	aacaaatagg	ggttccgcgc	6120
acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgaacga	agcatctgtg	cttcattttg	tagaacaaaa	6180
atgcaacgcg	agagcgctaa	tttttcaaac	aaagaatctg	agctgcattt	ttacagaaca	6240
gaaatgcaac	gcgaaagcgc	tattttacca	acgaagaatc	tgtgcttcat	ttttgtaaaa	6300

ES 2 735 024 T3

caaaaatgca acgcgagagc gctaattttt caaacaaga atctgagctg cattttttaca 6360
gaacagaaat gcaacgcgag agcgctatatt taccaacaaa gaatctatac ttcttttttg 6420
ttctacaaaa atgcatcccg agagcgctat ttttctaaca aagcatctta gattactttt 6480
tttctccttt gtgcgctcta taatgcagtc tcttgataac tttttgcaact gtaggtccgt 6540
taaggttaga agaaggctac tttggtgtct attttctctt ccataaaaaa agcctgactc 6600
cacttccgcg gtttactgat tactagcgaa gctgcgggtg cattttttca agataaaggc 6660
atccccgatt atattctata ccgatgtgga ttgcgcatac tttgtgaaca gaaagtgata 6720
gcggtgatga ttcttcattg gtcagaaaat tatgaacggg ttcttctatt ttgtctctat 6780
atactacgta taggaaatgt ttacattttc gtattgtttt cgattcactc tatgaatagt 6840
tcttactaca atttttttgt ctaaagagta atactagaga taaacataaa aaatgtagag 6900
gtcgagttta gatgcaagtt caaggagcga aagggtggatg ggtaggttat atagggatat 6960
agcacagaga tatatagcaa agagatactt ttgagcaatg tttgtggaag cggatattcgc 7020
aatatttttag tagctcgta cagtccggtg cgtttttggg tttttgaaag tgcgtcttca 7080
gagcgctttt ggttttcaaa agcgctctga agttcctata ctttctagag aataggaact 7140
tcggaatagg aacttcaaag cgtttccgaa aacgagcgct tccgaaaatg caacgcgagc 7200
tgcgcacata cagctcactg ttcacgtcgc acctatatct gcgtgttgcc tgtatatata 7260
tatacatgag aagaacggca tagtgcggtt ttatgcttaa atgcgtactt atatgcgtct 7320
atztatgtag gatgaaagg agtctagtag ctctgtgat attatcccat tccatgcggg 7380
gtatcgtagt cttccttcag cactaccctt tagctgttct atatgctgcc actcctcaat 7440
tggattagtc tcatccttca atgctatcat ttcctttgat attggatcat ctaagaaacc 7500
attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtc 7555

<210> 12
<211> 12298
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> pLH804::L2V4

<400> 12

tccattacc gacatttggg cgctatacgt gcatatgttc atgtatgtat ctgtatttaa 60
aacacttttg tattattttt cctcatatat gtgtataggt ttatacggat gatttaatta 120
ttacttcacc accctttatt tcaggctgat atcttagcct tgttactaga ttaatcatgt 180
aattagttat gtcacgctta cattcacgcc ctccccccac atccgctcta accgaaaagg 240
aaggagttag acaacctgaa gtctaggtcc ctatttattt ttttatagtt atgttagtat 300

taagaacggtt atttatatattt caaatTTTTtC ttttttttct gtacagacgc gtgtacgcat	360
gtaacatttat actgaaaacc ttgcttgaga aggttttggg acgctcgaag gctttaattt	420
gcgggCGGCC gcacctggta aaacctctag tggagtagta gatgtaatca atgaagcgga	480
agccaaaaga ccagagtaga ggcctataga agaaactgcg ataccttttg tgatggctaa	540
acaaacagac atcttttttat atgttttttac ttctgtatat cgtgaagtag taagtataa	600
gcgaatttg ctaagaacgt tgtaagtga caagggacct cttttgcctt tcaaaaaagg	660
attaaatgga gttaatcatt gagatttagt tttcgttaga ttctgtatcc ctaaataact	720
cccttaccCG acgggaaggc acaaaagact tgaataatag caaacggcca gtagccaaga	780
ccaaataata ctagagttaa ctgatggtct taaacaggca ttacgtggtg aactccaaga	840
ccaatataca aaatatcgat aagttattct tgcccaccaa ttaaggagc ctacatcagg	900
acagtagtac cattcctcag agaagaggta tacataacaa gaaaatcgcg tgaacacctt	960
atataactta gcccgttatt gagctaaaaa accttgcaaa atttcctatg aataagaata	1020
cttcagacgt gataaaaatt tactttctaa ctcttctcac gctgccccta tctgttcttc	1080
cgctctaccg tgagaaataa agcatcgagt acggcagttc gctgtcactg aactaaaaca	1140
ataaggctag ttcgaatgat gaacttgctt gctgtcaaac ttctgagttg ccgctgatgt	1200
gacactgtga caataaatTC aaaccggtta tagcggcttc ctccggtacc ggttctgcc	1260
cctccaatag agctcagtag gagtcagaac ctctgcggtg gctgtcagtg actcatccgc	1320
gtttcgtaag ttgtgcgcgt gcacatttcg cccgttcccg ctcatcttgc agcaggcgga	1380
aattttcatc acgctgtagg acgcaaaaaa aaaataatta atcgtacaag aatcttgga	1440
aaaaaattga aaaattttgt ataaaaggga tgacctaaact tgactcaatg gcttttacac	1500
ccagtatttt ccctttcctt gtttgttaca attatagaag caagacaaa acatatagac	1560
aacctattcc taggagttat attttttttac cctaccagca atataagtaa aaaactgttt	1620
aaacagtatg gaagaatgta agatggctaa gatttactac caagaagact gtaacttgtc	1680
cttgttggat ggtaagacta tcgccgttat cggttacggt tctcaaggtc acgctcatgc	1740
cctgaatgct aaggaatccg gttgtaacgt tatcattggt ttatacgaag gtgcggagga	1800
gtggaaaaga gctgaagaac aaggtttcga agtctacacc gctgctgaag ctgctaagaa	1860
ggctgacatc attatgatct tgatcccaga tgaaaagcag gctaccatgt acaaaaacga	1920
catcgaacca aacttggaag ccggtaacat gttgatgttc gtcacgggt tcaacatcca	1980
tttcggttgt attgttccac caaaggacgt tgatgtcact atgatcgctc caaagggtcc	2040
aggtcacacc gttagatccg aatacgaaga aggtaaagggt gtcccatgct tggttgctgt	2100
cgaacaagac gctactggca aggctttgga tatggctttg gcctacgctt tagccatcgg	2160
tggtgctaga gccggtgtct tggaaactac cttcagaacc gaaactgaaa ccgacttggt	2220

ES 2 735 024 T3

cggtgaacaa gctgttttat gtggtggtgt ctgcgctttg atgcaggccg gttttgaaac	2280
cttggttgaa gccggttacg acccaagaaa cgcttacttc gaatgtatcc acgaaatgaa	2340
gttgatcggt gacttgatct accaatctgg tttctccggt atgcgttact ctatctccaa	2400
cactgctgaa tacggtgact acattaccgg tccaaagatc attactgaag ataccaagaa	2460
ggctatgaag aagattttgt ctgacattca agatggtacc tttgccagg acttcttgggt	2520
tgacatgtct gatgctggtt cccagggtcca cttcaaggct atgagaaagt tggcctccga	2580
acaccagct gaagttgtcg gtgaagaaat tagatccttg tactcctgggt ccgacgaaga	2640
caagttgatt aacaactgag gccctgcagg ccagaggaaa ataatatcaa gtgctggaaa	2700
ctttttctct tggaattttt gcaacatcaa gtcatagtca attgaattga cccaatttca	2760
catttaagat tttttttttt tcatccgaca tacatctgta cactaggaag ccctgttttt	2820
ctgaagcagc ttcaaataata tatatttttt acatatttat tatgattcaa tgaacaatct	2880
aattaaatcg aaaacaagaa ccgaaacgag aataaataat ttatttagat ggtgacaagt	2940
gtataagtcc tcatcgggac agctacgatt tctcttttcgg ttttggtga gctactggtt	3000
gctgtgacgc agcggcatta gcgcggcggt atgagctacc ctctggcct gaaagatggc	3060
gggaataaag cggaactaaa aattactgac tgagccatat tgaggtcaat ttgtcaactc	3120
gtcaagtcac gtttgggtga cgccccctt ccaacgaatc gtatatata acatgcgcgc	3180
gcttcctata tacacatata catatatata tatatatata tgtgtgcgtg tatgtgtaca	3240
cctgtattta atttccttac tcgcggggtt ttcttttttc tcaattcttg gcttcctctt	3300
tctcgagcgg accggatcct cgcgaactcc aaaatgagct atcaaaaacg atagatcgat	3360
taggatgact ttgaaatgac tccgcagtg actggccgtt aatttcaagc gtgagtaaaa	3420
tagtgcatga caaaagatga gctaggcttt tgtaaaaata tcttacgttg taaaatttta	3480
gaaatcatta tttccttcat atcattttgt cattgacctt cagaagaaaa gagccgacca	3540
ataatataaa taaataaata aaaataatat tccattattt ctaaacagat tcaatactca	3600
ttaaaaaact atatcaatta atttgaatta acttaattaa ttattttttg ccagtttctt	3660
caggcttcca aaagtctgtt acggctcccc tagaagcaga cgaaacgatg tgagcatatt	3720
taccaaggat accgcgtgaa tagagcgggtg gcaattcaat ggtctcttga cgatgtttta	3780
actcttcac ggagatatca aagtgttaatt ccttagtgct ttggtcaata gtgactatgt	3840
ctcctgtttg caggtaggcg attggaccgc catcttgtgc ttcaggagcg atatgacca	3900
cgacaagacc ataagtacca cctgagaagc ggccatctgt cagaagggca actttttcac	3960
cttgcccttt accaacaatc attgatgaaa gggaaagcat ttcaggcata ccaggaccgc	4020
cctttggtcc taaaaacgt acgacaacaa catcaccatc aacaatatca tcattcaaga	4080

ES 2 735 024 T3

cagcttcaat	ggcttcttct	tcagaattaa	agaccttagc	aggaccgaca	tgacgacgca	4140
cttttacacc	agaaactttg	gcaacggcac	cgtctggagc	caagttacca	tggagaataa	4200
tgaccggacc	atcttcacgt	ttaggatttt	caagcggcat	aataaccttt	tgaccagggtg	4260
ttaaatcatc	aaaagccttc	aaattttcag	cgactgtttt	gccagtacaa	gtgatacggc	4320
caccatgaag	gaagccatth	ttaaggagat	atttcataac	tgctgggtacc	cctccgacct	4380
tgtaaaggct	ttggaatata	tattgaccag	aagggtttcaa	atcagccaaa	tgaggaaactt	4440
tttcttgga	agtattgaaa	tcatcaagtg	tcaattccac	attagcagca	tgggcaatag	4500
ctaagagggtg	aagggttgag	ttggttgaac	ctcccagagc	catagttaca	gtaatagcat	4560
cttcaaaagc	ttcacgcgtt	aaaatgtcag	aagggttttaa	gccattttcg	agcattttga	4620
caacagcgcg	accagcttct	tcaatatctg	ctttcttttc	tgccgattca	gccgggtgag	4680
aagatgaacc	cggaaggcta	agtcccaaaa	cttcaatagc	tgctcgccatt	gtgttagcag	4740
tatacatacc	accgcagcct	ccaggaccgg	gacaagcatt	acattccaaa	gctttaactt	4800
cttctttgg	catatcgccg	tggttccaat	ggccgacacc	ttcaaagaca	gagactaaat	4860
cgatatcttt	gccgtctaaa	ttaccagggtg	caattgttcc	gccgtaagca	aaaatggctg	4920
ggatatccat	gttagccata	gcgataacag	aaccgggcat	gtttttatca	caaccgcaa	4980
tggtacaaa	agcatccgca	ttatgacctc	ccatgggtgc	ttcaatagaa	tctgcaataa	5040
tatcacgaga	tgtcaaggag	aaacgcattc	cttgggttcc	catggcgatt	ccatcagaaa	5100
ccgtgattgt	tccgaactga	actggccaag	caccagcttc	cttaacaccg	actttggcta	5160
gtttaccaa	gtcatgtaag	tggtatattac	aagggtgtgt	ttcagcccaa	gttgaaatga	5220
caccgacgat	aggtttttca	aagtcttcac	cttgcatacc	agttgcacgc	aacatagcac	5280
gattagggtga	tttaaccatt	gaatcgtaaa	cagaactacg	atttcttaag	tctttaagag	5340
tttttttgtc	agtcatactc	acgtgaaact	tagattagat	tgctatgctt	tctttccaat	5400
gagcaagaag	taaaaaaagt	tgtaatagaa	caggaaaaat	gaagctgaaa	cttgagaaat	5460
tgaagaccgt	ttgttaactc	aaatatcaat	gggaggtcgt	cgaaagagaa	caaaatcgaa	5520
aaaaaagttt	tcaagagaaa	gaaacgtgat	aaaaattttt	attgccttct	ccgacgaaga	5580
aaaagggacg	aggcgtctc	tttttccttt	tccaaacctt	tagtacgggt	aattaacggc	5640
accctagagg	aaggaggagg	gggaatttag	tatgctgtgc	ttgggtgttt	tgaagtggta	5700
cggcgggtgcg	cggagtccga	gaaaatctgg	aagagtaaaa	aaggagtaga	gacattttga	5760
agctatgccg	gcagatctat	ttaaatggcg	cgccgacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	5820
atgtgcgcgg	aacccttatt	tgtttatttt	tctaaatata	ttcaaataatg	tatccgctca	5880
tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	5940
aacatttccg	tgctgcctct	attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttcct	gtttttgctc	6000

accagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtggggtt	6060
acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacggtt	6120
ttccaatgat gagcactttt aaagtctctg tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg	6180
ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact	6240
caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtcg	6300
ccataacat gatgataac actgcgccca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga	6360
aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg	6420
aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa	6480
tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac	6540
aattaataga ctggatggag gcgataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc	6600
cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca	6660
ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga	6720
gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gatagggtgcc tctactgatta	6780
agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc	6840
atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc	6900
cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatcctt	6960
cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac	7020
cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct	7080
tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact	7140
tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg	7200
ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata	7260
aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga	7320
cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag	7380
ggagaaaggc ggacaggatc ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg	7440
agcttccagg gggaaacgcc tggatctttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac	7500
ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca	7560
acggggcctt ttacaggctc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg	7620
cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc	7680
gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa	7740
tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt	7800
ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt	7860

aggcacccca	ggctttacac	tttatgcttc	cggctcgtat	gttgtgtgga	attgtgagcg	7920
gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	accatgatta	cgccaagctt	tttctttcca	7980
atTTTTTTTT	tttcgtcatt	ataaaaatca	ttacgaccga	gattccccgg	taataactga	8040
tataattaaa	ttgaagctct	aatttgtgag	tttagtatac	atgcatttac	ttataataca	8100
gtTTTTtagt	tttgcgtggc	gcattcttct	aaatatgctt	cccagcctgc	ttttctgtaa	8160
cgttcaccct	ctaccttagc	atcccttccc	tttgcaaata	gtcctcttcc	aacaataata	8220
atgtcagatc	ctgtagagac	cacatcatcc	acggttctat	actgttgacc	caatgcgtct	8280
cccttgcat	ctaaaccac	accgggtgtc	ataatcaacc	aatcgtaacc	ttcatctctt	8340
ccacccatgt	ctctttgagc	aataaagccg	ataacaaaat	ctttgtcgct	cttcgcaatg	8400
tcaacagtac	ccttagtata	ttctccagta	gatagggagc	ccttgcatga	caattctgct	8460
aacatcaaaa	ggcctctagg	ttcctttgtt	acttcttctg	cgcctgctt	caaaccgcta	8520
acaatacctg	ggcccaccac	accgtgtgca	ttcgtaatgt	ctgcccattc	tgctattctg	8580
tatacacccg	cagagtactg	caatttgact	gtattaccaa	tgtcagcaaa	ttttctgtct	8640
tcgaagagta	aaaaattgta	cttggcggat	aatgccttta	gcggttaac	tgtgccctcc	8700
atggaaaaat	cagtcaagat	atccacatgt	gtttttagta	aacaaatTTT	gggacctaat	8760
gottcaacta	actccagtaa	ttccttgggtg	gtacgaacat	ccaatgaagc	acacaagttt	8820
gtttgctttt	cgtgcatgat	attaaatagc	ttggcagcaa	caggactagg	atgagtagca	8880
gcacgttcct	tatatgtagc	tttcgacatg	atttatcttc	gtttcctgca	ggtttttgtt	8940
ctgtgcagtt	gggttaagaa	tactgggcaa	tttcatgttt	cttcaacact	acatatgcgt	9000
atatatacca	atctaagtct	gtgctccttc	cttcgttctt	ccttctgttc	ggagattacc	9060
gaatcaaaaa	aatttcaagg	aaaccgaaat	caaaaaaaag	aataaaaaaa	aaatgatgaa	9120
ttgaaaagct	tgcatgcctg	caggtcgact	ctagtatact	cgtctactg	tacgatacac	9180
ttccgctcag	gtccttgtcc	tttaacgagg	ccttaccact	cttttgttac	tctattgatc	9240
cagctcagca	aaggcagtgt	gatctaagat	tctatcttcg	cgatgtagta	aaactagcta	9300
gaccgagaaa	gagactagaa	atgcaaaagg	cacttctaca	atggctgcca	tcattattat	9360
ccgatgtgac	gctgcatTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	9420
TTTTTTTTgt	acaaatatca	taaaaaaaga	gaatctTTTT	aagcaaggat	tttcttaact	9480
tcttcggcga	cagcatcacc	gacttcgggtg	gtactgttgg	aaccacctaa	atcaccagtt	9540
ctgatacctg	catccaaaac	ctttttaact	gcattctcaa	tggctttacc	ttcttcaggc	9600
aagttcaatg	acaatttcaa	catcattgca	gcagacaaga	tagtggcgat	agggttgacc	9660
ttattctttg	gcaaactctg	agcggaacca	tggcatgggt	cgtacaaacc	aatgcgggtg	9720
ttcttgtctg	gcaaagaggg	caaggacgca	gatggcaaca	aaccaagga	gcctgggata	9780

acggaggctt catcgagat gatataacca aacatgttgc tgggtgattat aataccattt	9840
aggtggggtt ggttcttaac taggatcatg gcggcagaat caatcaattg atgttgaact	9900
ttcaatgtag ggaattcgtt cttgatggtt tcctccacag tttttctcca taatcttgaa	9960
gaggccaaaa cattagcttt atccaaggac caaataggca atggtggctc atgttgtagg	10020
gccatgaaag cggccattct tgtgattctt tgcacttctg gaacggtgta ttgttacta	10080
tcccaagcga caccatcacc atcgtcttcc tttctcttac caaagtaa atctccact	10140
aattctctaa caacaacgaa gtcagtacct ttagcaaatt gtggcttgat tggagataag	10200
tctaaaagag agtcggatgc aaagttacat ggtcttaagt tggcgtacaa ttgaagttct	10260
ttacggattt ttagtaaac ttgttcagggt ctaacactac cggtaaccca tttaggacca	10320
cccacagcac ctaacaaaac ggcatacgcc ttcttgagg cttccagcgc ctcatctgga	10380
agtggaacac ctgtagcatc gatagcagca ccaccaatta aatgattttc gaaatcgaac	10440
ttgacattgg aacgaacatc agaaatagct ttaagaacct taatggcttc ggctgtgatt	10500
tcttgaccaa cgtggtcacc tggcaaacg acgatcttct taggggcaga cattacaatg	10560
gtatatcctt gaaatatata taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa atgcagcttc	10620
tcaatgatat tcgaatacgc tttgaggaga tacagcctaa tatccgacaa actgttttac	10680
agatttacga tcgtacttgt taccatcat tgaattttga acatccgaac ctgggagttt	10740
tccctgaaac agatagtata tttgaacctg tataataata tatagtctag cgctttacgg	10800
aagacaatgt atgtatttcg gttcctggag aaactattgc atctattgca taggtaatct	10860
tgcacgtcgc atccccggtt cttttctgc gtttccatct tgcacttcaa tagcatatct	10920
ttgttaacga agcatctgtg cttcattttg tagaacaaaa atgcaacgag agagcgctaa	10980
tttttcaaac aaagaatctg agctgcattt ttacagaaca gaaatgcaac gcgaaagcgc	11040
tattttacca acgaagaatc tgtgcttcat ttttgtaaaa caaaaatgca acgcgagagc	11100
gctaattttt caaacaaaga atctgagctg catttttaca gaacagaaat gcaacgcgag	11160
agcgctattt taccaacaaa gaatctatac ttcttttttg ttctacaaaa atgcatcccg	11220
agagcgctat ttttctaaca aagcatctta gattactttt tttctccttt gtgcgctcta	11280
taatgcagtc tcttgataac tttttgcact gtaggtccgt taaggttaga agaaggctac	11340
tttggtgtct attttctctt ccataaaaa agcctgactc cacttccgcg gtttactgat	11400
tactagcgaa gctgcgggtg cattttttca agataaaggc atccccgatt atattctata	11460
cogatgtgga ttgcgcatac tttgtgaaca gaaagtata gcgttgatga ttcttcattg	11520
gtcagaaaat tatgaacggt ttcttctatt ttgtctctat atactacgta taggaaatgt	11580
ttacattttc gtattgtttt cgattcactc tatgaatagt tcttactaca atttttttgt	11640

ES 2 735 024 T3

ctaaagagta atactagaga taaacataaa aaatgtagag gtcgagttta gatgcaagtt	11700
caaggagcga aaggtggatg ggtaggttat atagggatat agcacagaga tatatagcaa	11760
agagatactt ttgagcaatg tttgtggaag cggatattcgc aatatttttag tagctcgtta	11820
cagtccggtg cgtttttggg tttttgaaag tgcgtcttca gagcgctttt ggttttcaaa	11880
agcgctctga agttcctata ctttctagag aataggaact tcggaatagg aacttcaaag	11940
cgtttccgaa aacgagcgct tccgaaaatg caacgcgagc tgcgcacata cagctcactg	12000
ttcacgtcgc acctatatct gcgtgttgcc tgtatatata tatacatgag aagaacggca	12060
tagtgcggtg ttatgcttaa atgcgtactt atatgcgtct atttatgtag gatgaaaggt	12120
agtctagtag ctctgtgat attatcccat tccatgcggg gtatcgtatg cttccttcag	12180
cactaccctt tagctgttct atatgctgcc actcctcaat tggattagtc tcatccttca	12240
atgctatcat ttcctttgat attggatcat atgcatagta ccgagaaact agaggatc	12298

<210> 13
 <211> 11013
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> pRS413::BiADH-KivD Lg(y)
 <400> 13

tgcgcgcttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgcggtg	120
ttggcggttg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accataaatt cccgttttaa gagcttgggtg agcgctagga gtcactgcca ggtatcgttt	240
gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt cccgcaattt tctttttcta	300
ttactcttgg cctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa tgattttcat	360
tttttttttt cccctagcgg atgactcttt ttttttctta gcgattggca ttatcacata	420
atgaattata cattatataa agtaatgtga tttcttcgaa gaatatacta aaaaatgagc	480
aggcaagata aacgaaggca aagatgacag agcagaaagc cctagtaaag cgtattacaa	540
atgaaaccaa gattcagatt gcgatctctt taaaggggtg tcccctagcg atagagcact	600
cgatcttccc agaaaaagag gcagaagcag tagcagaaca ggccacacaa tcgcaagtga	660
ttaacgtcca cacaggata gggtttctgg accatatgat acatgctctg gccaaagcatt	720
ccggctggtc gctaatacgtt gagtgcattg gtgacttaca catagacgac catcacacca	780
ctgaagactg cgggattgct ctcggtcaag ctttttaaaga ggccctactg gcgcgtggag	840
taaaaagggtt tggatcagga tttgcgcctt tggatgagggc actttccaga gcgggtggtag	900
atcttttcgaa caggccgtac gcagttgtcg aacttggttt gcaaaggag aaagtaggag	960

ES 2 735 024 T3

atctctcttg	cgagatgatc	cgcatttttc	ttgaaagctt	tgacagaggct	agcagaatta	1020
ccctccacgt	tgattgtctg	cgaggcaaga	atgatcatca	ccgtagttag	agtgcgttca	1080
aggctcttgc	ggttgccata	agagaagcca	cctcgcccaa	tggtaccaac	gatgttccct	1140
ccaccaaagg	tgttcttatg	tagtgacacc	gattatttaa	agctgcagca	tacgatatat	1200
atacatgtgt	atatatgtat	acctatgaat	gtcagtaagt	atgtatacga	acagtatgat	1260
actgaagatg	acaaggtaat	gcattcattct	atacgtgtca	ttctgaacga	ggcgcgcttt	1320
ccttttttct	ttttgctttt	tctttttttt	tctcttgaac	tcgacggatc	tatgcggtgt	1380
gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaaa	taccgcatca	ggaaattgta	aacgttaata	1440
ttttgttaaa	attcgcgtta	aatttttgtt	aatcagctc	attttttaac	caataggccg	1500
aaatcgga	aatcccttat	aatcaaaaag	aatagaccga	gataggggtg	agtgttggtc	1560
cagtttgga	caagagtcca	ctattaaaga	acgtggactc	caacgtcaaa	gggcgaaaaa	1620
ccgtctatca	gggcgatggc	ccactacgtg	aaccatcacc	ctaatacagt	tttttggggt	1680
cgaggtgccg	taaagcacta	aatcggaacc	ctaaaggag	cccccgattt	agagcttgac	1740
ggggaaagcc	ggcgaacgtg	gcgagaaaag	aagggaagaa	agcgaagga	gcgggcgcta	1800
gggcgctggc	aagtgtagcg	gtcacgctgc	gcgtaaccac	cacacccgcc	gcgcttaatg	1860
cgcgcgtaca	gggcgcgtcg	cgccattcgc	cattcaggct	gcgcaactgt	tggaagggc	1920
gatcgggtcg	ggcctcttcg	ctattacgcc	agctggcgaa	agggggatgt	gctgcaaggc	1980
gattaagttg	ggtaacgcca	gggttttccc	agtcacgacg	ttgtaaaacg	acggccagtg	2040
agcgcgcgta	atacgactca	ctataggggc	aattgggtac	cgggcccccc	ctgtacgcat	2100
gtaacattat	actgaaaacc	ttgcttgaga	aggttttggg	acgctcgaag	gctttaattt	2160
cctgcaggaa	ttaccgtcgc	tcgtgatttg	tttgcaaaaa	gaacaaaact	gaaaaaaccc	2220
agacacgctc	gacttcctgt	cttcctattg	attgcagctt	ccaatttcgt	cacacaacaa	2280
ggtcctgtcg	acgcctactt	ggcttcacat	acgttgcata	cgtcgatata	gataataatg	2340
ataatgacag	caggattatc	gtaatacgtg	atagttgaaa	atctcaaaaa	tgtgtgggtc	2400
attacgtaaa	taatgatagg	aatgggattc	ttctattttt	cctttttcca	ttctagcagc	2460
cgtcgggaaa	acgtggcatc	ctctcttttc	ggctcaattg	gagtcacgct	gccgtgagca	2520
tcctctcttt	ccatatctaa	caactgagca	cgtaaccaat	ggaaaagcat	gagcttagcg	2580
ttgctccaaa	aaagtattgg	atgggttaata	ccatttgtct	gttctcttct	gactttgact	2640
cctcaaaaaa	aaaaaatcta	caatcaacag	atcgcttcaa	ttacgccctc	acaaaaactt	2700
ttttccttct	tcttcgcca	cgttaaattt	tatccctcat	gttgtctaac	ggatttctgc	2760
acttgattta	ttataaaaag	acaaagacat	aatacttctc	tatcaatttc	agttattgtt	2820

cttccttgcg	ttattcttct	gttcttcttt	ttcttttgtc	atatataacc	ataaccaagt	2880
aatacatatt	caagtttaaa	catgtatacc	gtaggacagt	acttggtaga	tagactagaa	2940
gagattggta	tcgataaggt	tttcggtgtg	ccaggggatt	acaatttgac	ttttctagat	3000
tacattcaaa	atcacgaagg	actttcctgg	caaggaata	ctaatagaact	aaacgcagca	3060
tatgcagcag	atggctacgc	ccgtgaaaga	ggcgtatcag	ctcttggttac	tacattcgga	3120
gtgggtgaac	tgtcagccat	taacggaaca	gctggtagtt	ttgcagaaca	agtcctgtc	3180
atccacatcg	tgggttctcc	aactatgaat	gtgcaatcca	acaaaaagct	ggttcacat	3240
tccttaggaa	tgggtaactt	tcataacttt	agtgaatgg	ctaaggaagt	cactgccgct	3300
acaaccatgc	ttactgaaga	gaatgcagct	tcagagatcg	acagagtatt	agaaacagcc	3360
ttgttgghaa	agaggccagt	atacatcaat	cttccaattg	atatagctca	taaagcaata	3420
gttaaacctg	caaaagcact	acaaacagag	aatcatctg	gtgagagaga	ggcacaactt	3480
gcagaaatca	tactatcaca	cttagaaaag	gccgctcaac	ctatcgtaat	cgcggtcat	3540
gagatcgccc	gtttccagat	aagagaaaga	tttgaaaact	ggataaacca	aacaaagttg	3600
ccagtaacca	atttggcata	tggcaaaggc	tctttcaatg	aagagaacga	acatttcatt	3660
ggtacctatt	accagctttt	ttctgacaaa	aacgttctgg	attacgttga	caatagtgc	3720
ttcgtttttac	attttggtgg	gaaaatcatt	gacaattcta	cctcctcatt	ttctcaaggc	3780
tttaagactg	aaaacacttt	aaccgctgca	aatgacatca	ttatgctgcc	agatgggtct	3840
acttactctg	ggatttctct	taacggtctt	ttggcagagc	tggaaaaact	aaactttact	3900
tttgctgata	ctgctgctaa	acaagctgaa	ttagctgttt	tcgaaccaca	ggccgaaaca	3960
ccactaaagc	aagacagatt	tcaccaagct	gttatgaact	ttttgcaagc	tgatgatgtg	4020
ttgggtcactg	agcaggggac	atcatctttc	ggtttgatgt	tggcacctct	gaaaaaggt	4080
atgaatttga	tcagtcaaac	attatggggc	tccataggat	acacattacc	tgctatgatt	4140
ggttcacaaa	ttgctgcccc	agaaaggaga	cacattctat	ccatcgggtga	tggatctttt	4200
caactgacag	cacaggaaat	gtccaccatc	ttcagagaga	aattgacacc	agtgatattc	4260
attatcaata	acgatggcta	tacagtcgaa	agagccatcc	atggagagga	tgagagttac	4320
aatgatatac	caacttgga	cttgcaatta	gttgctgaaa	catttggtgg	tgatgccgaa	4380
actgtcgaca	ctcacaacgt	tttcacagaa	acagacttcg	ctaatacttt	agctgctatc	4440
gatgctactc	ctcaaaaagc	acatgtcgtt	gaagttcata	tggaaacaaat	ggatatgccca	4500
gaatcattga	gacagattgg	cttagcctta	tctaagcaaa	actcttaacc	tgacgggccg	4560
tgaatttact	ttaaatcttg	catttaaata	aattttcttt	ttatagcttt	atgacttagt	4620
ttcaatttat	atactatttt	aatgacattt	tcgattcatt	gattgaaagc	tttgtgtttt	4680
ttcttgatgc	gctattgcat	tgttcttgtc	tttttcgcca	catgtaatat	ctgtagtaga	4740

tacctgatac attgtggatg ctgagtgaag ttttagttaa taatggaggc gctcttaata	4800
atattgggga tattggcttt tttttttaa gtttacaaat gaattttttc cgccaggata	4860
acgattctga agttactctt agcggttcta tcggtacagc catcaaatca tgcctataaa	4920
tcatgcctat atttgcgtgc agtcagtatc atctacatga aaaaaactcc cgcaatttct	4980
tatagaatac gttgaaaatt aaatgtacgc gccaaagataa gataacatat atctagatgc	5040
agtaatatat acagattccc gcggacgtgg gaaggaaaaa attagataac aaaatctgag	5100
tgatatggaa attccgctgt atagctcata tctttcccta cctggtaaaa cctctagtgg	5160
agtagtagat gtaatcaatg aagcgggaagc caaaagacca gagtagaggc ctatagaaga	5220
aactgcgata ctttttgtga tggctaaaca aacagacatc tttttatatg tttttacttc	5280
tgtatatcgt gaagtagtaa gtgataagcg aatttggcta agaacggtgt aagtgaacaa	5340
gggacctctt ttgcctttca aaaaaggatt aaatggagtt aatcattgag atttagtttt	5400
cgtagatttc tgtatcccta aataactccc ttaccgcagc ggaaggcaca aaagacttga	5460
ataatagcaa acggccagta gccaaagacca aataatacta gagttaactg atggtcttaa	5520
acaggcatta cgtggtgaac tccaagacca atatacaaaa tatcgataag ttattcttgc	5580
ccaccaattt aaggagccta catcaggaca gtagtaccat tcctcagaga agaggatatac	5640
ataacaagaa aatcgctga acaccttata taacttagcc cgttattgag ctaaaaaacc	5700
ttgcaaaatt tcctatgaat aagaatactt cagacgtgat aaaaatttac tttctaactc	5760
ttctcacgct gccctatct gttcttccgc tctaccgtga gaaataaagc atcgagtacg	5820
gcagttcgct gtcactgaac taaaacaata aggctagttc gaatgatgaa cttgcttgct	5880
gtcaaaacttc tgagttgccg ctgatgtgac actgtgacaa taaattcaaa ccggttatag	5940
cggctctctc cggtagcgtt tctgccacct ccaatagagc tcccgccagc cgaaatgcat	6000
gcaagtaacc tattcaaagt aatatctcat acatgtttca tgagggtaac aacatgcgac	6060
tgggtgagca tatgttccgc tgatgtgatg tgcaagataa acaagcaagg cagaaactaa	6120
cttcttcttc atgtaataaa cacacccgc gtttatttac ctatctctaa acttcaacac	6180
cttatatcat aactaatatt tcttgagata agcacactgc acccatacct tccttaaaaa	6240
cgtagcttcc agtttttggg ggttccggct tccttcccga ttccgcccgc taaacgcata	6300
tttttggtgc ctggtggcat ttgcaaatg cataacctat gcatttaaaa gattatgtat	6360
gctcttctga cttttcgtgt gatgaggctc gtggaaaaaa tgaataattt atgaatttga	6420
gaacaatttt gtgttgttac ggtattttac tatggaataa tcaatcaatt gaggatttta	6480
tgcaaatatc gtttgaatat ttttccgacc ctttgagtac ttttcttcat aattgcataa	6540
tattgtccgc tgcccctttt tctgttagac ggtgtcttga tctacttgct atcgttcaac	6600

accaccttat	tttctaacta	tttttttttt	agctcatttg	aatcagctta	tggatgatggc	6660
acattttttgc	ataaacctag	ctgtcctcgt	tgaacatagg	aaaaaaaaat	atataaacia	6720
ggctctttca	ctctccttgc	aatcagattt	gggtttgttc	cctttatttt	catattttctt	6780
gtcatattcc	tttctcaatt	attattttct	actcataacc	tcacgcaaaa	taacacagtc	6840
aaatcaatca	aatgaaagc	attagtgtat	agggggcccag	gccagaagtt	ggtggaagag	6900
agacagaagc	cagagcttaa	ggaacctggt	gacgctatag	tgaaggtaac	aaagactaca	6960
atttgccgaa	ccgatctaca	cattcttaaa	ggtgacgttg	cgacttgtaa	acccggtcgt	7020
gtattagggc	atgaaggagt	gggggttatt	gaatcagtcg	gatctggggt	tactgctttc	7080
caaccaggcg	atagagtttt	gatatcatgt	atatcgagtt	gcggaaagtg	ctcattttgt	7140
agaagaggaa	tgttcagtca	ctgtacgacc	gggggttgga	ttctgggcaa	cgaaattgat	7200
ggtaccaag	cagagtacgt	aagagtacca	catgctgaca	catcccttta	tcgtattccg	7260
gcagggtcgg	atgaaggagg	cttagtcatg	ttatcagata	ttctaccaac	gggttttgag	7320
tgcggagtc	taaaccgcaa	agtcgcacct	ggttcttcgg	tggctatagt	aggtgctggt	7380
cccgttggtt	tggccgcctt	actgacagca	caattctact	cccagctga	aatcataatg	7440
atcgatcttg	atgataacag	gctgggatta	gccaaacaat	ttggtgccac	cagaacagta	7500
aactccacgg	gtggtaacgc	cgcagccgaa	gtgaaagctc	ttactgaagg	cttaggtggt	7560
gatactgcga	ttgaagcagt	tgggatacct	gctacatttg	aattgtgtca	gaatatcgta	7620
gctcccgggtg	gaactatcgc	taatgtcggc	gttcacggta	gcaaagttga	tttgcattct	7680
gaaagtttat	ggtcccataa	tgtcacgatt	actacaagggt	tggttgacac	ggctaccacc	7740
ccgatgttac	tgaaaactgt	tcaaagtcac	aagctagatc	catctagatt	gataacacat	7800
agattcagcc	tggaccagat	cttggacgca	tatgaaactt	ttggccaagc	tgcgtctact	7860
caagcactaa	aagtcattcat	ttcgatggag	gcttgattaa	ttaagagtaa	gcgaatttct	7920
tatgatttat	gattttttatt	attaaataag	ttataaaaaa	aataagtgtg	tacaaatttt	7980
aaagtgactc	ttaggtttta	aaacgaaaat	tcttattctt	gagtaactct	ttcctgtagg	8040
tcagggttgct	ttctcaggta	tagcatgagg	tcgctcttat	tgaccacacc	tctaccggca	8100
tgccgagcaa	atgcctgcaa	atcgctcccc	atttcaccca	attgtagata	tgctaactcc	8160
agcaatgagt	tgatgaatct	cgggtgtgtat	tttatgtcct	cagaggacaa	cacctgtggt	8220
gagctccagc	ttttgttccc	tttagtgagg	gttaattgog	cgcttggcgt	aatcatggtc	8280
atagctgttt	cctgtgtgaa	attgttatcc	gctcacaatt	ccacacaaca	taggagccgg	8340
aagcataaag	tgtaaagcct	gggggtgccta	atgagtgagg	taactcacat	taattgcgtt	8400
gcgctcactg	cccgttttcc	agtcgggaaa	cctgtcgtgc	cagctgcatt	aatgaatcgg	8460
ccaacgcgcg	gggagaggcg	gtttgcgtat	tgggcgctct	tccgcttcct	cgctcaactga	8520

ctcgctgcgc	tcggtcgttc	ggctgcggcg	agcggtatca	gctcactcaa	aggcggtaat	8580
acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	8640
aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcggt	gctggcggtt	ttccataggc	tcgccccccc	8700
tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaaccgga	caggactata	8760
aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	8820
gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	ttcggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	8880
acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	cgttcgctcc	aagctgggct	gtgtgcacga	8940
acccccggt	cagcccgacc	gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	9000
ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	agccactggg	aacaggatta	gcagagcgag	9060
gtatgtaggc	gggtctacag	agttcttgaa	gtgggtggcct	aactacggct	acactagaag	9120
gacagtatct	ggtatctgcg	ctctgctgaa	gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	9180
ctcttgatcc	ggcaaacaaa	ccaccgctgg	tagcggtggt	ttttttgttt	gcaagcagca	9240
gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	agatcctttg	atcttttcta	cggggtctga	9300
cgctcagtg	aacgaaaact	cacgttaagg	gattttggtc	atgagattat	caaaaaggat	9360
cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	9420
gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	9480
tctatttctg	tcatccatag	ttgcctgact	ccccgctcgt	tagataacta	cgatacggga	9540
gggcttacca	tctggcccca	gtgctgcaat	gataccgcga	gacccacgct	caccggctcc	9600
agatttatca	gcaataaacc	agccagccgg	aagggccgag	cgcagaagtg	gtcctgcaac	9660
tttatccgcc	tccatccagt	ctattaattg	ttgccgggaa	gctagagtaa	gtagttcgcc	9720
agttaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	tgctacaggc	atcgtggtgt	cacgctcgtc	9780
gtttggtatg	gcttcattca	gctccggttc	ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	9840
catgttgtgc	aaaaaagcgg	ttagctcctt	cggtcctccg	atcgttgtca	gaagtaagtt	9900
ggccgcagtg	ttatcactca	tggttatggc	agcactgcat	aattctctta	ctgtcatgcc	9960
atccgtaaga	tgcttttctg	tgactgggtga	gtactcaacc	aagtcattct	gagaatagtg	10020
tatgcggcga	ccgagttgct	cttgcccggc	gtcaatacgg	gataataccg	cgccacatag	10080
cagaacttta	aaagtgtctca	tcattggaaa	acgttcttcg	gggcgaaaac	tctcaaggat	10140
cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	accactcgt	gcacccaact	gatcttcagc	10200
atcttttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	agcaaaaaca	ggaaggcaaa	atgccgcaaa	10260
aaagggaata	agggcgacac	ggaaatgttg	aatactcata	ctcttccttt	ttcaatatta	10320
ttgaagcatt	tatcagggtt	attgtctcat	gagcggatac	atatttgaat	gtatttagaa	10380

aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg ggtccttttc 10440
atcacgtgct ataaaaataa ttataattta aatttttttaa tataaatata taaattaaaa 10500
atagaaagta aaaaaagaaa ttaaagaaaa aatagttttt gttttccgaa gatgtaaaag 10560
actctagggg gatcgccaac aaatactacc ttttatcttg ctcttcctgc tctcaggtat 10620
taatgccgaa ttgtttcatc ttgtctgtgt agaagaccac acacgaaaat cctgtgattt 10680
tacattttac ttatcgtaa tcgaatgtat atctatttaa tctgcttttc ttgtctaata 10740
aatatatatg taaagtacgc tttttgttga aattttttta acctttgttt attttttttt 10800
cttcattccg taactcttct accttcttta tttactttct aaaatccaaa taaaaaacat 10860
aaaaataaat aaacacagag taaattccca aattattcca tcattaaaag atacgaggcg 10920
cgtgtaagtt acaggcaagc gatccgtcct aagaaaccat tattatcatg acattaacct 10980
ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtc 11013

<210> 14
<211> 1008
<212> ADN
5 <213> Archaeoglobus fulgidus

<400> 14
atgattgttt cgatactggg agcgggtgca atgggctcag ccctctccgt cccgctcgta 60
gataacggca acgaagtgag aatctggggg accgagttcg atacggagat tttaaaatca 120
atctcagccg gcagagagca tccaaggctt ggtgtaaagc tcaatggcgt ggaaattttc 180
tggccagagc agcttgaaaa atgtttggag aatgcagagg ttgtacttct ggggtgttagc 240
acggatggcg tgctgcccgt aatgagcaga attctcccgt atctcaagga ccagtacatc 300
gtactcatct ctaaagggct gattgatttt gataacagtg ttctgacggg tcccgaagct 360
gtatggaggt taaagcacga tttgagggaa aggactgtgg cgataaccgg gcccgctatt 420
gcaagagagg tggcgaaacg catgcccaca accgttgttt tcagcagccc atccgaaagc 480
tcggccaata aatgaaaga aatctttgag acagagtact ttggcgttga agtaacaaca 540
gacataattg gcacggaaat aacctccgcc ctcaaaaacg tttattccat agccattgca 600
tggataaggg gctacgagag cagaaaaaac gttgagatga gcaatgcaa gggagtgatt 660
gcaacgagag ccataaacga gatggcagag ctgatagaga ttctcggagg ggatagagag 720
accgcctttg gcctttccgg atttggagac ctcatcgcaa ccttcagggg aggaaggaac 780
gggatgctgg gagagctgct tggaaagggg cttagcatcg atgaggcgat ggaggagctt 840
gagaggagag gagttggtgt ggttgagggc taaaaacgg cagagaaagc atacaggctg 900
tccagcaaaa taaatgcaga caaaaagctg ctcgacagca tctacagagt cctttatgaa 960
ggactgaagg ttgaggaagt gctgtttgaa ctcgctacat ttaaataa 1008

<210> 15
<211> 1137
10 <212> ADN

<213> Candida versatilis

<400> 15

atgcctactc ctcaagagag actcgcctcag ttgcgtggaa atgaagacgc gccagcgtcg	60
gtagcatcga aatataacaa aagattccgt gtaggtgtca ttggttctgg taactgggggt	120
acggcagtcg cgaagattgt cgccgaaaac tgcctggaaa agccatatct gtttcaccgt	180
gatgtgaaga tgtgggttcg tgaggaagag gtctctgaca tgaagctgac ggacatcatt	240
aattcctacc atgagaacgt gaagtacctg ccggaggtaa ctctgccgtt taatctgttt	300
gctgagccag acattcgcaa ggttgctgat ggtgcagacc tgctggttat caatctgccc	360
caccagttct tggggctctgt atgcgaccag atgaagggca tcgacttctc taagtccctca	420
gccattttctt gtctaaagggt tatcaatgta tctgcagatg gtgtggagct tcttcatgat	480
gtcgtggaaa agaagcttgg cttgcattgc ggtgtcctga gtggtgcgaa tattgcgtcc	540
gaggtggccc gtgaacgttg gtctgagacc accattgcct tcccattgcc ttcgtggtac	600
cagcaggggtg atgctgatga taatctgata aaggagttgt tctacaggcc ctatttccat	660
gttcaagtat cggatgatgt gtgtggtgcg tcaattagcg gtgcacttaa gaacgtggtc	720
gctcttggcg caggtcttgt tgagggcgca ggctgggggtg ataatgcaa ggctgctgtc	780
atgcgtcgtg gcttgctcga agtgattatg ttccggcaacg ttttcttccc aggttaagtgc	840
cgcccagaga ccttcaccac tgaatcggca ggtgtggccg atttgatcac ctcgtgtgct	900
ggtggacgta acgtcaaggt tggacgtgca tttgctcgta caggaaagcc acttgaggtc	960
atcgagaagg agctcctaaa tggccagtca gcccagggtg ttattaccgg acgtgaggtg	1020
atggagcttc taacggcaac caagaaggag gacgagttcc ctctgcttgg tgctattttac	1080
gatattgtgc ataacaagtt gcacatctca aatctgccag agcggatcgc agactaa	1137

<210> 16

<211> 951

<212> ADN

<213> Rickettsia prowazekii

<400> 16

atgaacaaat ttaagaatat tgcagtttat ggaggaggta gtttcggcac tagtcttgct	60
tcttttagtag cacgaaactg taataatggt actttatttt tacgtgacga gataatttta	120
aaagaaattt tatataaaaa aactaacgca caatacttag gtgatattga attacctact	180
aatttgcaag ctactacaaa cttaagtgtg atcaaggatt ttgaattaat tattattgca	240
gtgccatctt atgcttttga tgattcaata aaattattga aaacgtacgg catctctaaa	300
gagcatacta ttctagtagc gacaaaaggc ttggctgata atcctactga attattttct	360

5

ES 2 735 024 T3

gatagactta acacttttatt acccgataat cctataggat ttttatctgg tccaaatcta 420
gcaaaggaac ttgctaataaa tttgcctgct tccgcaagta ttgcaagttt agatatagat 480
atcgcaaata aaatagctta taacttcagt tcaaaaactt tttcaacaaa tacgaccata 540
gatattgtaa cgttacaaat tgctggagct ttaaaaaata tttttgctat taaaagtgga 600
attgatttag caagagagca gggagcaaat tcaagagcaa cgcttatagt aggggcctta 660
aaagaaatta ctactttatc taaggttcctt ggaggtatgc aaaaaaattc tgatatttta 720
cttgaagcag gagtattagg cgatttagta cttacttggt actctttagg ttcgcgtaat 780
acaaaatttg gttatgaatt tgaaattagt agggataaaa agaaattttt atgcgaatat 840
aaagaattag tagaaggacg agaagcatta aaattagttt tggatctaata aaaaaaatat 900
aatttacaca tgcctatagt tgctgaagta gcttcactca ttttaatttg a 951

<210> 17
<211> 1008
<212> ADN
5 <213> Beggiatoa alba

<400> 17
atgttatcgc cgtccgcctt attagtctta ggggcagggc catggggcac tgcactggct 60
cttgcgcttg cccgtcgaca ataccctatt tacctttggg gtaaagaccc tgcgcagtgt 120
catactttac aaatacaacg ttgtaatcaa cgatttttgc cgaatgcggt ttttcccgat 180
aatttatacg ccattacgga cttcgtaacc ctcatgccga ttgtggaaga cattattatt 240
gtcgttccta gccatggctt ccgcgaaacc ttaaaaaaaaa taaagcccta cattacaaaa 300
aatcatcggt tatgctgggc aacaaaaggc ttggaatatc aaacaggggt gcttttacac 360
gaagtagcgc gtgcagaatt aggcgataac atccctctcg cggttttgtc aggtccttca 420
tttgccggtg aagtcgctgc cgccttaccg acagcgggtc cgattgccgc acaagacatc 480
gaaaacgctc atcatgtcgc ccaattatct catcaagcct cattccgtgc ttataaccagt 540
aatgacatgg tccgggtaca aattgggggc gcgggttaaaa atgtcattgc cattgctgca 600
ggtatcgagc atggttttaa aatgggagca aatacccgtg ccgctttaat tacacgtgga 660
ctgagcgaaa ttgtacgttt aggcattgcc ctcggtggac aacgcgaaac ctttatgggt 720
ttagcaggct taggcgattt agtcctaact tgactgata accaatcccg caatcgacgc 780
tttggtacg cactcgcgca aggcattcagc ctagaagctg cacaagctca agttggacaa 840
gtggtcgaag gcatacatgc tgcaaccatc acccaccaac tcgccaaca gcacgggtgta 900
gaaatgccca tagtcaacca tgtcaaccaa gtattaacag gacaaagcac ccactagaa 960
gccgctcaag ccctgtagc ccgtgaaccc aagccagaaa tgctataa 1008

<210> 18
10 <211> 1005
<212> ADN
<213> Kangiella koreensis

<400> 18

atgtctgcac aactttcctt tgcggttctt ggggcagggt cttatggaac cgcattggca	60
gttttgcttg cccgtaatgg ccatagtgtt cagttatggg ctcgcaactc tcagcatggt	120
gttgaaatgc agcaggcaaa acagaatacg aaataccttc ctgatgtcgc tttccctgac	180
aatctatcag taaccgatca aattgatgta gctttaaagc atcatcctat tattcttgta	240
gcggtcccaa gtcatgcgtt tcgcgataca ctgtacctca tcaaacctct tgtaaaccac	300
gatagtaagc tagtatgggc gagcaaaggg ctcgatcccg atagtgggtga tttgttaggt	360
aatgtgctga aaaatatattt aggcgataat atgccacacg ccattttatc tgggccaact	420
ttcgccaagg aaatggctat tggtagcct accgctatca ctttagcagc taataatgac	480
gactttgctg agcaattagc tttggcttta cataatgagc gtttcagagt ctataccagt	540
gatgacatcg ttggtgttca agtcggtggg gcggttaaaa atgtagtagc tatcgggtgct	600
ggaattgctg acggactagg ttatggtgcg aacgcaagaa cagccttgat cactcggggg	660
ttggctgaaa tgactcgctt aggtgttgcc gcaggcgga agcaggaaac tttcaatgga	720
atggcaggca tgggcgattt ggtcttaacc tgtaccgata atcagtcgcg taataggcgt	780
tttggttttag ctttaggtaa aggtgctaata agagatgagg ctgagcatgc cattgggcag	840
gtagtagaag gtgttcgtaa tgccaaggaa gttaagatgc tggcggagcg actaggggtc	900
gaaatgccaa tcagcgatgc gatttatcgc ataatttatg aaggcgtcga cgcccgtcag	960
gccgcacatg aattattaac tcgagacctt aaatctgaag gttag	1005

<210> 19

<211> 1176

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GPD1 de levadura optimizada

<400> 19

atgtccgctg ctgctgacag attgaacttg acatctggtc acttgaacgc tggtagaaag	60
agatcatcct cctctgtctc tttgaagggt gccgaaaagc cattcaaggt caccgttatc	120
ggttctggta actggggtag caccattgcc aaggctcgctg ccgaaaactg caagggttac	180
ccagaagttt ttgctccaat cggtcaaagt tgggtttttg aagaggaaat taacgggtgaa	240
aagttgactg aaattatcaa cactagacac caaaacgtga agtacttgcc cggtattacc	300
ttgccagaca atttggttgc caatccagac ttgatcgata gtgtcaagga cgttgatatt	360
atcgttttta acatcccaca ccaattccta ccacgtattt gttctcaatt gaagggtcat	420

10

ES 2 735 024 T3

	gtcgattctc acgtagagc tatctcctgc ttgaagggtt tcgaagttgg tgctaagggt	480
	gttcaattgt taccctctta catcactgaa gagctaggta tccaatgtgg tgctttgtct	540
	gggtgctaaca tcgctaccga agtcgctcaa gagcactggc ctgaaaccac tgctcgcttac	600
	catatcccaa aggactttag aggtgaaggc aaagacgttg accacaaggc cctaaaggct	660
	ttgttccaca gaccatactt tcacgtttct gtcacgaag atgtcgccgg tatctctatc	720
	tgtggcgctt taaagaacgt cgtcgcttg ggttgtgggt ttgttgaagg attgggttg	780
	ggtaacaacg cctctgctgc tatccaacgt gtcggtttg gtgaaatcat tagatttggt	840
	caaatgtttt tccctgaatc cagagaggaa acctactacc aagagtctgc cgggtgtgct	900
	gacctataa ccacctgtgc tgggtgtaga aacgttaagg ttgccagatt gatggctact	960
	tccggtaagg acgcttgga atgtgaaaag gaattgttga acggtcaatc cgctcaaggc	1020
	ttgattactt gtaaggaagt tcacgaatgg ttggaaactt gtggcagcgt tgaagatttt	1080
	ccattattcg aagctgtcta ccaaatcgtc tacaataact accctatgaa aaacttgcca	1140
	gatatgatcg aggaattaga cttacacgag gactaa	1176
	<210> 20	
	<211> 38	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Asn44F	
	<400> 20	
	ccgttatcgg ttctggaac tgggtacca ccattgcc	38
10	<210> 21	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> N44AF	
	<400> 21	
	ccgttatcgg ttctggtgt tgggtacca ccattgcc	38
	<210> 22	
	<211> 38	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> N44CF	
	<400> 22	
25	ccgttatcgg ttctggtgt tgggtacca ccattgcc	38
	<210> 23	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	

	<223>	N44GF	
	<400>	23	
	ccggtatcgg ttctggtggt tggggtacca ccattgcc		38
5	<210>	24	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	N44IF	
10	<400>	24	
	ccggtatcgg ttctggtatc tggggtacca ccattgcc		38
	<210>	25	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
15	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	N44LF	
	<400>	25	
	ccggtatcgg ttctggtcta tggggtacca ccattgcc		38
20	<210>	26	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
25	<223>	N44MF	
	<400>	26	
	ccggtatcgg ttctggtatg tggggtacca ccattgcc		38
	<210>	27	
	<211>	38	
30	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	N44SF	
	<400>	27	
35	ccggtatcgg ttctggttct tggggtacca ccattgcc		38
	<210>	28	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
40	<220>		
	<223>	N44VF	
	<400>	28	
	ccggtatcgg ttctggtgtt tggggtacca ccattgcc		38
45	<210>	29	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	

	<220>		
	<223>	Trp45F	
	<400>	29	
	ccgttatcgg ttctggaac tgggtacca ccattgcc		38
5	<210>	30	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
10	<223>	W45AF	
	<400>	30	
	ccgttatcgg ttctggaac gctgtacca ccattgcc		38
	<210>	31	
	<211>	38	
15	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	W45CF	
	<400>	31	
20	ccgttatcgg ttctggaac tgtgtacca ccattgcc		38
	<210>	32	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	W45GF	
	<400>	32	
	ccgttatcgg ttctggaac ggtgtacca ccattgcc		38
	<210>	33	
30	<211>	38	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	W45HF	
35	<400>	33	
	ccgttatcgg ttctggaac cacgtacca ccattgcc		38
	<210>	34	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
40	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	W45IF	
	<400>	34	
	ccgttatcgg ttctggaac atcgtacca ccattgcc		38
45	<210>	35	
	<211>	38	
	<212>	ADN	

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> W45RF
 <400> 35
 5 ccgttatcgg ttctggaac aagggtacca ccattgcc 38
 <210> 36
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> W45LF
 <400> 36
 ccgttatcgg ttctggaac ctaggtacca ccattgcc 38
 15 <210> 37
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> W45MF
 20 <400> 37
 ccgttatcgg ttctggaac atgggtacca ccattgcc 38
 <210> 38
 <211> 38
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> W45NF
 <400> 38
 ccgttatcgg ttctggaac aacgtacca ccattgcc 38
 30 <210> 39
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> W45QF
 <400> 39
 ccgttatcgg ttctggaac caaggtacca ccattgcc 38
 <210> 40
 <211> 38
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> W45RF
 <400> 40
 45 ccgttatcgg ttctggaac cgtgtacca ccattgcc 38
 <210> 41

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

 <220>
 5 <223> W45SF

 <400> 41

 ccggtatcgg ttctggtaac tctggtacca ccattgcc 38

 <210> 42
 <211> 38
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> W45TF

 <400> 42

 15 ccggtatcgg ttctggtaac accggtacca ccattgcc 38

 <210> 43
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> W45VF

 <400> 43

 ccggtatcgg ttctggtaac gttggtacca ccattgcc 38

 <210> 44
 25 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Phe73F

 30 <400> 44

 ccaatcggtc aaatgtgggt tttgaagag gaaattaacg gtg 43

 <210> 45
 <211> 43
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> F73GF

 <400> 45

 ccaatcggtc aaatgtgggt tgggaagag gaaattaacg gtg 43

 40 <210> 46
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> F73AF

 <400> 46

 ccaatcggtc aaatgtgggt tgctgaagag gaaattaacg gtg 43

<210> 47
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> F73RF
 <400> 47
 ccaatcggtc aaatgtgggt tcgtgaagag gaaattaacg gtg 43
 10 <210> 48
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F73KF
 15 <400> 48
 ccaatcggtc aaatgtgggt taaggaagag gaaattaacg gtg 43
 <210> 49
 <211> 43
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Phe129F
 <400> 49
 gttttaaca tcccacacca attcctacca cgtatttgtt ctc 43
 25 <210> 50
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> F129GF
 <400> 50
 gttttaaca tcccacacca aggtctacca cgtatttgtt ctc 43
 <210> 51
 <211> 43
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F129AF
 <400> 51
 40 gttttaaca tcccacacca agctctacca cgtatttgtt ctc 43
 <210> 52
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> F129RF
 <400> 52

	gttttaaca tcccacacca acgtctacca cgtattgtt ctc	43
	<210> 53	
	<211> 43	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> F129KF	
	<400> 53	
	gttttaaca tcccacacca aaagctacca cgtattgtt ctc	43
10	<210> 54	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> N44AR	
	<400> 54	
	ggcaatggtg gtacccaag caccagaacc gataacgg	38
	<210> 55	
	<211> 38	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> N44CR	
	<400> 55	
25	ggcaatggtg gtacccaac aaccagaacc gataacgg	38
	<210> 56	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> N44GR	
	<400> 56	
	ggcaatggtg gtacccaac caccagaacc gataacgg	38
	<210> 57	
35	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> N44IR	
40	<400> 57	
	ggcaatggtg gtacccaga taccagaacc gataacgg	38
	<210> 58	
	<211> 38	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> N44LR	

<400> 58
 ggcaatggtg gtacccata gaccagaacc gataacgg 38
 <210> 59
 <211> 38
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> N44MR
 <400> 59
 10 ggcaatggtg gtacccaca taccagaacc gataacgg 38
 <210> 60
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> N44SR
 <400> 60
 ggcaatggtg gtacccaag aaccagaacc gataacgg 38
 <210> 61
 20 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> N44VR
 25 <400> 61
 ggcaatggtg gtacccaaa caccagaacc gataacgg 38
 <210> 62
 <211> 38
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> W45AR
 <400> 62
 ggcaatggtg gtaccagcg taccagaacc gataacgg 38
 35 <210> 63
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> W45CR
 <400> 63
 ggcaatggtg gtaccacagt taccagaacc gataacgg 38
 <210> 64
 <211> 38
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> W45GR
 <400> 64
 ggcaatggtg gtaccaccgt taccagaacc gataacgg 38
 5 <210> 65
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> W45HR
 10 <400> 65
 ggcaatggtg gtaccgtggt taccagaacc gataacgg 38
 <210> 66
 <211> 38
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> W45IR
 <400> 66
 ggcaatggtg gtaccgatgt taccagaacc gataacgg 38
 20 <210> 67
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> W45KR
 <400> 67
 ggcaatggtg gtaccctgt taccagaacc gataacgg 38
 <210> 68
 <211> 38
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> W45LR
 <400> 68
 35 ggcaatggtg gtacctaggt taccagaacc gataacgg 38
 <210> 69
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> W45MR
 <400> 69
 ggcaatggtg gtaccatgt taccagaacc gataacgg 38
 45 <210> 70
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> W45NR
 <400> 70
 ggcaatggtg gtaccgtgtg taccagaacc gataacgg 38
 5 <210> 71
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> W45QR
 <400> 71
 ggcaatggtg gtacctgtgt taccagaacc gataacgg 38
 <210> 72
 <211> 38
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> W45RR
 <400> 72
 20 ggcaatggtg gtaccacggt taccagaacc gataacgg 38
 <210> 73
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> W45SR
 <400> 73
 ggcaatggtg gtaccagagt taccagaacc gataacgg 38
 <210> 74
 30 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> W45TR
 35 <400> 74
 ggcaatggtg gtaccggtgt taccagaacc gataacgg 38
 <210> 75
 <211> 38
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> W45VR
 <400> 75
 ggcaatggtg gtaccaacgt taccagaacc gataacgg 38
 45 <210> 76
 <211> 43
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F73GR
 <400> 76
 5 caccgттаат ttctcttca ccaaccaca ttgaacgat tgg 43
 <210> 77
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> F73AR
 <400> 77
 caccgттаат ttctcttca gcaaccaca ttgaacgat tgg 43
 15 <210> 78
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F73RR
 20 <400> 78
 caccgттаат ttctcttca cgaaccaca ttgaacgat tgg 43
 <210> 79
 <211> 43
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F73KR
 <400> 79
 caccgттаат ttctcttcc ttaaccaca ttgaacgat tgg 43
 30 <210> 80
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> F129GR
 <400> 80
 gagaacaaat acgtgtaga ccttggtgtg ggatgttaa aac 43
 <210> 81
 <211> 43
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F129AR
 <400> 81
 45 gagaacaaat acgtgtaga gcttggtgtg ggatgttaa aac 43
 <210> 82

<211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> F129RR

 <400> 82

 gagaacaaat acgtggtaga cgttggtgtg ggatgttaa aac 43

 <210> 83
 <211> 43
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> F129KR

 <400> 83

 15 gagaacaaat acgtggtagc ttttggtgtg ggatgttaa aac 43

 <210> 84
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 84
 Met Ala Ser Lys Lys Val Cys Ile Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Ser
 1 5 10 15

 Ala Ile Ala Lys Ile Val Gly Gly Asn Ala Ala Gln Leu Ala Gln Phe
 20 25 30

 Asp Pro Arg Val Thr Met Trp Val Phe Glu Glu Asp Ile Gly Gly Lys
 35 40 45

 Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Gln His Glu Asn Val Lys Tyr Leu
 50 55 60

ES 2 735 024 T3

Pro Gly His Lys Leu Pro Pro Asn Val Val Ala Val Pro Asp Val Val
 65 70 75 80

Gln Ala Ala Glu Asp Ala Asp Ile Leu Ile Phe Val Val Pro His Gln
 85 90 95

Phe Ile Gly Lys Ile Cys Asp Gln Leu Lys Gly His Leu Lys Ala Asn
 100 105 110

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

Leu Lys Leu Ile Ser Glu Val Ile Gly Glu Arg Leu Gly Ile Pro Met
 130 135 140

Ser Val Leu Met Gly Ala Asn Ile Ala Ser Glu Val Ala Asp Glu Lys
 145 150 155 160

Phe Cys Glu Thr Thr Ile Gly Cys Lys Asp Pro Ala Gln Gly Gln Leu
 165 170 175

Leu Lys Glu Leu Met Gln Thr Pro Asn Phe Arg Ile Thr Val Val Gln
 180 185 190

Glu Val Asp Thr Val Glu Ile Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala
 195 200 205

Val Gly Ala Gly Phe Cys Asp Gly Leu Gly Phe Gly Asp Asn Thr Lys
 210 215 220

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

Leu Phe Cys Ser Gly Pro Val Ser Ser Ala Thr Phe Leu Glu Ser Cys
 245 250 255

Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Tyr Gly Gly Arg Asn Arg Lys
 260 265 270

Val Ala Glu Ala Phe Ala Arg Thr Gly Lys Ser Ile Glu Gln Leu Glu
 275 280 285

Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln Lys Leu Gln Gly Pro Glu Thr Ala Arg
 290 295 300

Glu Leu Tyr Ser Ile Leu Gln His Lys Gly Leu Val Asp Lys Phe Pro
 305 310 315 320

ES 2 735 024 T3

Leu Phe Met Ala Val Tyr Lys Val Cys Tyr Glu Gly Gln Pro Val Gly
325 330 335

Glu Phe Ile His Cys Leu Gln Asn His Pro Glu His Met
340 345

<210> 85

<211> 343

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> KG9G

<400> 85

Met Glu Glu Cys Lys Met Ala Lys Ile Tyr Tyr Gln Glu Asp Cys Asn
1 5 10 15

Leu Ser Leu Leu Asp Gly Lys Thr Ile Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser
20 25 30

Gln Gly His Ala His Ala Leu Asn Ala Lys Glu Ser Gly Cys Asn Val
35 40 45

Ile Ile Gly Leu Tyr Glu Gly Ala Lys Glu Trp Lys Arg Ala Glu Glu
50 55 60

Gln Gly Phe Glu Val Tyr Thr Ala Ala Glu Ala Ala Lys Lys Ala Asp
65 70 75 80

Ile Ile Met Ile Leu Ile Asn Asp Glu Lys Gln Ala Thr Met Tyr Lys
85 90 95

Asn Asp Ile Glu Pro Asn Leu Glu Ala Gly Asn Met Leu Met Phe Ala
100 105 110

His Gly Phe Asn Ile His Phe Gly Cys Ile Val Pro Pro Lys Asp Val
115 120 125

Asp Val Thr Met Ile Ala Pro Lys Gly Pro Gly His Thr Val Arg Ser
130 135 140

Glu Tyr Glu Glu Gly Lys Gly Val Pro Cys Leu Val Ala Val Glu Gln
145 150 155 160

Asp Ala Thr Gly Lys Ala Leu Asp Met Ala Leu Ala Tyr Ala Leu Ala
165 170 175

Ile Gly Gly Ala Arg Ala Gly Val Leu Glu Thr Thr Phe Arg Thr Glu
180 185 190

Thr Glu Thr Asp Leu Phe Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Val
195 200 205

Cys Ala Leu Met Gln Ala Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr
210 215 220

Asp Pro Arg Asn Ala Tyr Phe Glu Cys Ile His Glu Met Lys Leu Ile
225 230 235 240

Val Asp Leu Ile Tyr Gln Ser Gly Phe Ser Gly Met Arg Tyr Ser Ile
245 250 255

Ser Asn Thr Ala Glu Tyr Gly Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Lys Ile Ile
260 265 270

Thr Glu Asp Thr Lys Lys Ala Met Lys Lys Ile Leu Ser Asp Ile Gln
275 280 285

Asp Gly Thr Phe Ala Lys Asp Phe Leu Val Asp Met Ser Asp Ala Gly
290 295 300

Ser Gln Val His Phe Lys Ala Met Arg Lys Leu Ala Ser Glu His Pro
305 310 315 320

Ala Glu Val Val Gly Glu Glu Ile Arg Ser Leu Tyr Ser Trp Ser Asp
325 330 335

Glu Asp Lys Leu Ile Asn Asn
340

<210> 86

<211> 343

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> K9D3

<400> 86

Met Glu Glu Cys Lys Met Ala Lys Ile Tyr Tyr Gln Glu Asp Cys Asn
1 5 10 15

Leu Ser Leu Leu Asp Gly Lys Thr Ile Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser
20 25 30

Gln Gly His Ala His Ala Leu Asn Ala Lys Glu Ser Gly Cys Asn Val

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

Asp Gly Thr Phe Ala Lys Asp Phe Leu Val Asp Met Ser Asp Ala Gly
290 295 300

Ser Gln Val His Phe Lys Ala Met Arg Lys Leu Ala Ser Glu His Pro
305 310 315 320

Ala Glu Val Val Gly Glu Glu Ile Arg Ser Leu Tyr Ser Trp Ser Asp
325 330 335

Glu Asp Lys Leu Ile Asn Asn
340

<210> 87

<211> 343

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> K9JB4P

<400> 87

Met Glu Glu Cys Lys Met Ala Lys Ile Tyr Tyr Gln Glu Asp Cys Asn
1 5 10 15

Leu Ser Leu Leu Asp Gly Lys Thr Ile Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser
20 25 30

Gln Gly His Ala His Ala Leu Asn Ala Lys Glu Ser Gly Cys Asn Val
35 40 45

Ile Ile Gly Leu Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Trp Lys Arg Ala Glu Glu
50 55 60

Gln Gly Phe Glu Val Tyr Thr Ala Ala Glu Ala Ala Lys Lys Ala Asp
65 70 75 80

Ile Ile Met Ile Leu Ile Pro Asp Glu Lys Gln Ala Thr Met Tyr Lys
85 90 95

Asn Asp Ile Glu Pro Asn Leu Glu Ala Gly Asn Met Leu Met Phe Ala
100 105 110

His Gly Phe Asn Ile His Phe Gly Cys Ile Val Pro Pro Lys Asp Val
115 120 125

Asp Val Thr Met Ile Ala Pro Lys Gly Pro Gly His Thr Val Arg Ser
130 135 140

Glu Tyr Glu Glu Gly Lys Gly Val Pro Cys Leu Val Ala Val Glu Gln

ES 2 735 024 T3

145 150 155 160

Asp Ala Thr Gly Lys Ala Leu Asp Met Ala Leu Ala Tyr Ala Leu Ala
165 170 175

Ile Gly Gly Ala Arg Ala Gly Val Leu Glu Thr Thr Phe Arg Thr Glu
180 185 190

Thr Glu Thr Asp Leu Phe Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Val
195 200 205

Cys Ala Leu Met Gln Ala Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr
210 215 220

Asp Pro Arg Asn Ala Tyr Phe Glu Cys Ile His Glu Met Lys Leu Ile
225 230 235 240

Val Asp Leu Ile Tyr Gln Ser Gly Phe Ser Gly Met Arg Tyr Ser Ile
245 250 255

Ser Asn Thr Ala Glu Tyr Gly Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Lys Ile Ile
260 265 270

Thr Glu Asp Thr Lys Lys Ala Met Lys Lys Ile Leu Ser Asp Ile Gln
275 280 285

Asp Gly Thr Phe Ala Lys Asp Phe Leu Val Asp Met Ser Asp Ala Gly
290 295 300

Ser Gln Val His Phe Lys Ala Met Arg Lys Leu Ala Ser Glu His Pro
305 310 315 320

Ala Glu Val Val Gly Glu Glu Ile Arg Ser Leu Tyr Ser Trp Ser Asp
325 330 335

Glu Asp Lys Leu Ile Asn Asn
340

<210> 88

<211> 570

<212> PRT

5 <213> Lactococcus lactis

<400> 88

Met Glu Phe Lys Tyr Asn Gly Lys Val Glu Ser Ile Glu Leu Asn Lys
1 5 10 15

Tyr Ser Lys Thr Leu Thr Gln Asp Pro Thr Gln Pro Ala Thr Gln Ala

ES 2 735 024 T3

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

Ala	Ile	Thr	Ile	Val	Met	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Ala	Val	Leu	275	280	285
His	Ile	Ile	Ala	Met	Ala	Asn	Ala	Ile	Gly	Val	Glu	Ile	Thr	Gln	Asp	290	295	300
Asp	Phe	Gln	Arg	Ile	Ser	Asp	Val	Thr	Pro	Val	Leu	Gly	Asp	Phe	Lys	305	310	315
Pro	Ser	Gly	Lys	Tyr	Met	Met	Glu	Asp	Leu	His	Lys	Ile	Gly	Gly	Val	325	330	335
Pro	Ala	Val	Leu	Lys	Tyr	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Lys	Leu	His	Gly	Asp	340	345	350
Cys	Leu	Thr	Val	Thr	Gly	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Asn	Val	Glu	Thr	Ala	355	360	365
Leu	Asp	Leu	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Asp	Ile	Ile	Arg	Pro	Leu	Glu	Asn	370	375	380
Pro	Ile	Lys	Ala	Thr	Gly	His	Leu	Gln	Ile	Leu	Tyr	Gly	Asn	Leu	Ala	385	390	395
Glu	Gly	Gly	Ser	Val	Ala	Lys	Ile	Ser	Gly	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Phe	405	410	415
Lys	Gly	Thr	Ala	Arg	Val	Phe	Asp	Gly	Glu	Gln	His	Phe	Ile	Asp	Gly	420	425	430
Ile	Glu	Ser	Gly	Arg	Leu	His	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	435	440	445
Ile	Gly	Pro	Val	Gly	Gly	Pro	Gly	Met	Pro	Glu	Met	Leu	Lys	Pro	Thr	450	455	460
Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Ala	Gly	Leu	Gly	Lys	Ser	Cys	Ala	Leu	Ile	Thr	465	470	475
Asp	Gly	Arg	Phe	Ser	Gly	Gly	Thr	His	Gly	Phe	Val	Val	Gly	His	Ile	485	490	495
Val	Pro	Glu	Ala	Val	Glu	Gly	Gly	Leu	Ile	Gly	Leu	Val	Glu	Asp	Asp	500	505	510
Asp	Ile	Ile	Glu	Ile	Asp	Ala	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Ser	Leu	Lys	Val	515	520	525

Ala Asp Asp Glu Ile Ala Arg Arg Arg Ala Asn Tyr Gln Lys Pro Ala
530 535 540

Pro Lys Ala Thr Arg Gly Val Leu Ala Lys Phe Ala Lys Leu Thr Arg
545 550 555 560

Pro Ala Ser Glu Gly Cys Val Thr Asp Leu
565 570

<210> 89

<211> 571

<212> PRT

5 <213> Streptococcus mutans

<400> 89

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

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

Gly Met Gln Asp Glu Asp Phe Glu Lys Pro Ile Val Gly Val Ile Ser
35 40 45

Thr Trp Ala Glu Asn Thr Pro Cys Asn Ile His Leu His Asp Phe Gly
50 55 60

Lys Leu Ala Lys Val Gly Val Lys Glu Ala Gly Ala Trp Pro Val Gln
65 70 75 80

Phe Gly Thr Ile Thr Val Ser Asp Gly Ile Ala Met Gly Thr Gln Gly
85 90 95

Met Arg Phe Ser Leu Thr Ser Arg Asp Ile Ile Ala Asp Ser Ile Glu
100 105 110

Ala Ala Met Gly Gly His Asn Ala Asp Ala Phe Val Ala Ile Gly Gly
115 120 125

Cys Asp Lys Asn Met Pro Gly Ser Val Ile Ala Met Ala Asn Met Asp
130 135 140

Ile Pro Ala Ile Phe Ala Tyr Gly Gly Thr Ile Ala Pro Gly Asn Leu
145 150 155 160

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

ES 2 735 024 T3

Trp	Asn	His	Gly	Asp	Met	Thr	Lys	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Leu	Glu	Cys
			180					185					190		
Asn	Ala	Cys	Pro	Gly	Pro	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Met	Tyr	Thr	Ala	Asn
		195					200					205			
Thr	Met	Ala	Thr	Ala	Ile	Glu	Val	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser
	210					215					220				
Ser	Ser	His	Pro	Ala	Glu	Ser	Ala	Glu	Lys	Lys	Ala	Asp	Ile	Glu	Glu
225					230					235					240
Ala	Gly	Arg	Ala	Val	Val	Lys	Met	Leu	Glu	Met	Gly	Leu	Lys	Pro	Ser
				245					250					255	
Asp	Ile	Leu	Thr	Arg	Glu	Ala	Phe	Glu	Asp	Ala	Ile	Thr	Val	Thr	Met
			260					265					270		
Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Ser	Thr	Leu	His	Leu	Leu	Ala	Ile	Ala
		275					280					285			
His	Ala	Ala	Asn	Val	Glu	Leu	Thr	Leu	Asp	Asp	Phe	Asn	Thr	Phe	Gln
	290					295					300				
Glu	Lys	Val	Pro	His	Leu	Ala	Asp	Leu	Lys	Pro	Ser	Gly	Gln	Tyr	Val
305					310					315					320
Phe	Gln	Asp	Leu	Tyr	Lys	Val	Gly	Gly	Val	Pro	Ala	Val	Met	Lys	Tyr
				325					330					335	
Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Phe	Leu	His	Gly	Asp	Arg	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly
			340					345					350		
Lys	Thr	Val	Ala	Glu	Asn	Leu	Lys	Ala	Phe	Asp	Asp	Leu	Thr	Pro	Gly
		355					360					365			
Gln	Lys	Val	Ile	Met	Pro	Leu	Glu	Asn	Pro	Lys	Arg	Glu	Asp	Gly	Pro
	370					375					380				
Leu	Ile	Ile	Leu	His	Gly	Asn	Leu	Ala	Pro	Asp	Gly	Ala	Val	Ala	Lys
385					390					395					400
Val	Ser	Gly	Val	Lys	Val	Arg	Arg	His	Val	Gly	Pro	Ala	Lys	Val	Phe
				405					410					415	
Asn	Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Ile	Glu	Ala	Val	Leu	Asn	Asp	Asp	Ile	Val
			420					425					430		

ES 2 735 024 T3

Asp Gly Asp Val Val Val Val Arg Phe Val Gly Pro Lys Gly Gly Pro
435 440 445

Gly Met Pro Glu Met Leu Ser Leu Ser Ser Met Ile Val Gly Lys Gly
450 455 460

Gln Gly Glu Lys Val Ala Leu Leu Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly
465 470 475 480

Thr Tyr Gly Leu Val Val Gly His Ile Ala Pro Glu Ala Gln Asp Gly
485 490 495

Gly Pro Ile Ala Tyr Leu Gln Thr Gly Asp Ile Val Thr Ile Asp Gln
500 505 510

Asp Thr Lys Glu Leu His Phe Asp Ile Ser Asp Glu Glu Leu Lys His
515 520 525

Arg Gln Glu Thr Ile Glu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Arg Gly Ile Leu
530 535 540

Gly Lys Tyr Ala His Ile Val Ser Ser Ala Ser Arg Gly Ala Val Thr
545 550 555 560

Asp Phe Trp Lys Pro Glu Glu Thr Gly Lys Lys
565 570

<210> 90
<211> 548
<212> PRT
5 <213> Lactococcus lactis

<400> 90

Met Tyr Thr Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Arg Leu His Glu Leu Gly
1 5 10 15

Ile Glu Glu Ile Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu Gln Phe Leu
20 25 30

Asp Gln Ile Ile Ser His Lys Asp Met Lys Trp Val Gly Asn Ala Asn
35 40 45

Glu Leu Asn Ala Ser Tyr Met Ala Asp Gly Tyr Ala Arg Thr Lys Lys
50 55 60

Ala Ala Ala Phe Leu Thr Thr Phe Gly Val Gly Glu Leu Ser Ala Val
65 70 75 80

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

325	330	335
Gly Lys Tyr Ile Asp Lys Lys Gln Glu Asp Phe Val Pro Ser Asn Ala 340 345 350		
Leu Leu Ser Gln Asp Arg Leu Trp Gln Ala Val Glu Asn Leu Thr Gln 355 360 365		
Ser Asn Glu Thr Ile Val Ala Glu Gln Gly Thr Ser Phe Phe Gly Ala 370 375 380		
Ser Ser Ile Phe Leu Lys Ser Lys Ser His Phe Ile Gly Gln Pro Leu 385 390 395 400		
Trp Gly Ser Ile Gly Tyr Thr Phe Pro Ala Ala Leu Gly Ser Gln Ile 405 410 415		
Ala Asp Lys Glu Ser Arg His Leu Leu Phe Ile Gly Asp Gly Ser Leu 420 425 430		
Gln Leu Thr Val Gln Glu Leu Gly Leu Ala Ile Arg Glu Lys Ile Asn 435 440 445		
Pro Ile Cys Phe Ile Ile Asn Asn Asp Gly Tyr Thr Val Glu Arg Glu 450 455 460		
Ile His Gly Pro Asn Gln Ser Tyr Asn Asp Ile Pro Met Trp Asn Tyr 465 470 475 480		
Ser Lys Leu Pro Glu Ser Phe Gly Ala Thr Glu Asp Arg Val Val Ser 485 490 495		
Lys Ile Val Arg Thr Glu Asn Glu Phe Val Ser Val Met Lys Glu Ala 500 505 510		
Gln Ala Asp Pro Asn Arg Met Tyr Trp Ile Glu Leu Ile Leu Ala Lys 515 520 525		
Glu Gly Ala Pro Lys Val Leu Lys Lys Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu 530 535 540		

Gln Asn Lys Ser
545

<210> 91
 <211> 548
 <212> PRT
 <213> Listeria grayi

5

<400> 91

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

Thr His Asn Val Phe Thr Glu Thr Asp Phe Ala Asn Thr Leu Ala Ala
500 505 510

Ile Asp Ala Thr Pro Gln Lys Ala His Val Val Glu Val His Met Glu
515 520 525

Gln Met Asp Met Pro Glu Ser Leu Arg Gln Ile Gly Leu Ala Leu Ser
530 535 540

Lys Gln Asn Ser
545

<210> 92

<211> 348

<212> PRT

5 <213> Achromobacter xyloxiidans

<400> 92

Met Lys Ala Leu Val Tyr His Gly Asp His Lys Ile Ser Leu Glu Asp
1 5 10 15

Lys Pro Lys Pro Thr Leu Gln Lys Pro Thr Asp Val Val Val Arg Val
20 25 30

Leu Lys Thr Thr Ile Cys Gly Thr Asp Leu Gly Ile Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Asn Pro Glu Val Ala Asp Gly Arg Ile Leu Gly His Glu Gly Val Gly
50 55 60

Val Ile Glu Glu Val Gly Glu Ser Val Thr Gln Phe Lys Lys Gly Asp
65 70 75 80

Lys Val Leu Ile Ser Cys Val Thr Ser Cys Gly Ser Cys Asp Tyr Cys
85 90 95

Lys Lys Gln Leu Tyr Ser His Cys Arg Asp Gly Gly Trp Ile Leu Gly
100 105 110

Tyr Met Ile Asp Gly Val Gln Ala Glu Tyr Val Arg Ile Pro His Ala
115 120 125

Asp Asn Ser Leu Tyr Lys Ile Pro Gln Thr Ile Asp Asp Glu Ile Ala
130 135 140

Val Leu Leu Ser Asp Ile Leu Pro Thr Gly His Glu Ile Gly Val Gln
145 150 155 160

ES 2 735 024 T3

Tyr Gly Asn Val Gln Pro Gly Asp Ala Val Ala Ile Val Gly Ala Gly
165 170 175

Pro Val Gly Met Ser Val Leu Leu Thr Ala Gln Phe Tyr Ser Pro Ser
180 185 190

Thr Ile Ile Val Ile Asp Met Asp Glu Asn Arg Leu Gln Leu Ala Lys
195 200 205

Glu Leu Gly Ala Thr His Thr Ile Asn Ser Gly Thr Glu Asn Val Val
210 215 220

Glu Ala Val His Arg Ile Ala Ala Glu Gly Val Asp Val Ala Ile Glu
225 230 235 240

Ala Val Gly Ile Pro Ala Thr Trp Asp Ile Cys Gln Glu Ile Val Lys
245 250 255

Pro Gly Ala His Ile Ala Asn Val Gly Val His Gly Val Lys Val Asp
260 265 270

Phe Glu Ile Gln Lys Leu Trp Ile Lys Asn Leu Thr Ile Thr Thr Gly
275 280 285

Leu Val Asn Thr Asn Thr Thr Pro Met Leu Met Lys Val Ala Ser Thr
290 295 300

Asp Lys Leu Pro Leu Lys Lys Met Ile Thr His Arg Phe Glu Leu Ala
305 310 315 320

Glu Ile Glu His Ala Tyr Gln Val Phe Leu Asn Gly Ala Lys Glu Lys
325 330 335

Ala Met Lys Ile Ile Leu Ser Asn Ala Gly Ala Ala
340 345

<210> 93

<211> 375

<212> PRT

5 <213> Equus ferus caballus

<400> 93

Met Ser Thr Ala Gly Lys Val Ile Lys Cys Lys Ala Ala Val Leu Trp
1 5 10 15

Glu Glu Lys Lys Pro Phe Ser Ile Glu Glu Val Glu Val Ala Pro Pro
20 25 30

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

Val Ser Val Ile Val Gly Val Pro Pro Asp Ser Gln Asn Leu Ser Met
290 295 300

Asn Pro Met Leu Leu Leu Ser Gly Arg Thr Trp Lys Gly Ala Ile Phe
305 310 315 320

Gly Gly Phe Lys Ser Lys Asp Ser Val Pro Lys Leu Val Ala Asp Phe
325 330 335

Met Ala Lys Lys Phe Ala Leu Asp Pro Leu Ile Thr His Val Leu Pro
340 345 350

Phe Glu Lys Ile Asn Glu Gly Phe Asp Leu Leu Arg Ser Gly Glu Ser
355 360 365

Ile Arg Thr Ile Leu Thr Phe
370 375

<210> 94

<211> 347

<212> PRT

5 <213> Beijerinckia indica

<400> 94

Met Lys Ala Leu Val Tyr Arg Gly Pro Gly Gln Lys Leu Val Glu Glu
1 5 10 15

Arg Gln Lys Pro Glu Leu Lys Glu Pro Gly Asp Ala Ile Val Lys Val
20 25 30

Thr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Thr Asp Leu His Ile Leu Lys Gly Asp
35 40 45

Val Ala Thr Cys Lys Pro Gly Arg Val Leu Gly His Glu Gly Val Gly
50 55 60

Val Ile Glu Ser Val Gly Ser Gly Val Thr Ala Phe Gln Pro Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Leu Ile Ser Cys Ile Ser Ser Cys Gly Lys Cys Ser Phe Cys
85 90 95

Arg Arg Gly Met Phe Ser His Cys Thr Thr Gly Gly Trp Ile Leu Gly
100 105 110

Asn Glu Ile Asp Gly Thr Gln Ala Glu Tyr Val Arg Val Pro His Ala
115 120 125

ES 2 735 024 T3

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

<210> 95
 <211> 4519
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> pLA54
 <400> 95

caccttggct aactcgttgt atcatcactg gataacttcg tataatgtat gctatacgaa	60
gttatcgaac agagaaacta aatccacatt aattgagagt tctatctatt agaaaatgca	120
aactccaact aaatgggaaa acagataacc tcttttattt ttttttaatg tttgatattc	180
gagtcttttt cttttgttag gtttatattc atcatttcaa tgaataaaaag aagcttctta	240
ttttggttgc aaagaatgaa aaaaaaggat tttttcatac ttctaaagct tcaattataa	300
ccaaaaattt tataaatgaa gagaaaaaat ctagtagtat caagttaaac ttagaaaaac	360
tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt	420
tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca	480
agatcctggg atcgggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc	540
ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgcgcac tgaatccggt	600
gagaatggca aaagcttatg catctctttc cagacttggt caacaggcca gccattacgc	660
tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacccaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg	720
agacgaaata cgcgatcgcg gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg	780
cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttcta	840
acctggaatg ctgttttgcc ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta	900
cggataaaat gcttgatggg cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc	960
atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc	1020
gcatcgggct tcccatataa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgc attatcgca	1080
gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg cctcgaaacg	1140
tgagtctttt ccttaccat ctcgagtttt aatgttactt ctcttgagc tagggaacta	1200
taatgtaact caaaataaga ttaaacaac taaaataaaa agaagttata cagaaaaacc	1260
catataaacc agtactaatc cataataata atacacaaaa aaactatcaa ataaaaccag	1320
aaaacagatt gaatagaaaa attttttcga tctcctttta tattcaaaat tcgatatatg	1380
aaaaagggaa ctctcagaaa atcaccaaat caatttaatt agatttttct tttccttcta	1440
gcgttggaag gaaaaatttt tctttttttt tttagaaatg aaaaattttt gccgtaggaa	1500
tcaccgtata aaccctgtat aaacgctact ctgttcacct gtgtaggcta tgattgaccc	1560
agtgttcatt gttattgcga gagagcggga gaaaagaacc gatacaagag atccatgctg	1620
gtatagttgt ctgtccaaca ctttgatgaa cttgtaggac gatgatgtgt atttagacga	1680
gtacgtgtgt gactattaag tagttatgat agagaggttt gtacggtgtg ttctgtgtaa	1740
ttcgattgag aaaatggtta tgaatcccta gataacttcg tataatgtat gctatacgaa	1800

gttatctgaa cattagaata cgtaatccgc aatgcgggga tcctctagag tcgacctgca	1860
ggcatgcaag cttggcgtaa tcatgggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc	1920
tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata	1980
gagtgaagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc	2040
tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcgccc aacgcgcggg gagagggcgt ttgcgtattg	2100
ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag	2160
cggtatcagc tactcaaag gcggaatac gggtatccac agaatacagg gataacgcag	2220
gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc	2280
tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc	2340
agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataaccaggc gtttccccct ggaagctccc	2400
tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt	2460
cggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg	2520
ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc tgcgccttat	2580
ccggtacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag	2640
ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt	2700
ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc	2760
cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta	2820
gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag	2880
atcctttgat cttttctacg ggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga	2940
ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaataaaaaatgaa	3000
gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa	3060
tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc	3120
ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga	3180
taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa	3240
gggcccagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt	3300
gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg	3360
ctacaggcat cgtgggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc	3420
aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcggtt agctccttcg	3480
gtcctccgat cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag	3540
cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt	3600
actcaaccaa gtcattctga gaatagtga tgccggcgacc gagttgctct tgcccgcgct	3660

ES 2 735 024 T3

caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac 3720
gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac 3780
ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag 3840
caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa aggggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa 3900
tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga 3960
gcggtatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc 4020
cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa 4080
ataggcgtat cagcaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct 4140
gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac 4200
aagcccgtca gggcgcgta gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg 4260
catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg 4320
taaggagaaa ataccgcac aggcgccatt cgccattcag gctgcgcaac tgttggaag 4380
ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa 4440
ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt ccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca 4500
gtgaattcga gctcggtag 4519

<210> 96
<211> 80
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> BK505
<400> 96

ttccggtttc ttgaaattt ttttgattcg gtaatctccg agcagaagga gcattgcgga 60
ttacgtattc taatgttcag 80

10 <210> 97
<211> 81
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> BK506
<400> 97

gggtaataac tgatataatt aaattgaagc tctaatttgt gagtttagta caccttggt 60
aactcgttgt atcatcactg g 81

<210> 98
<211> 38
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LA468
<400> 98

gcctcgagtt ttaatgttac ttctctgca gtaggga 38

<210> 99
 <211> 31
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LA492

<400> 99

gctaaattcg agtgaaacac aggaagacca g 31

10 <210> 100
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> AK109-1

<400> 100

agtcacatca agatcgttta tgg 23

20 <210> 101
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AK109-2

<400> 101

25 gcacggaata tgggactact tcg 23

<210> 102
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> AK109-3

<400> 102

actccacttc aagtaagagt ttg 23

35 <210> 103
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oBP452

40 <400> 103

ttctcgacgt gggcctttt ctg 24

<210> 104
 <211> 49
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oBP453
 <400> 104
 tgcagctta aataatcggg gtcactact tgccttcgtt tatcttgcc 49
 <210> 105
 5 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP454
 10 <400> 105
 gagcaggcaa gataaacgaa ggcaaagtag tgacaccgat tatttaaag 49
 <210> 106
 <211> 49
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP455
 <400> 106
 tatggaccct gaaaccacag ccacattgta accaccacga cgggtgttg 49
 20 <210> 107
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> oBP457
 <400> 107
 tttagcaaca accgtcgtgg tgggtacaat gtggctgtgg ttccagggt 49
 <210> 108
 <211> 49
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP457
 <400> 108
 35 ccagaaaccc tatacctgtg tggacgtaag gccatgaagc ttttcttt 49
 <210> 109
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> oBP458
 <400> 109
 attggaaga aaaagcttca tggccttacg tccacacagg tatagggtt 49
 <210> 110
 45 <211> 22

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP459
 5 <400> 110
 cataagaaca ccttggtgg ag 22
 <210> 111
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP460
 <400> 111
 aggattatca ttcataagtt tc 22
 15 <210> 112
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> LA135
 <400> 112
 ctggcagca acaggactag 20
 <210> 113
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP461
 <400> 113
 30 ttcttgagc tgggacatgt ttg 23
 <210> 114
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> LA92
 <400> 114
 gagaagatgc ggccagcaaa ac 22
 <210> 115
 40 <211> 4242
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> pLA59
 45 <400> 115

ES 2 735 024 T3

aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat	60
gttcttttct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc	120
tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcggg	180
agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcggttg ccgattcatt aatgcagctg	240
gcacgacagg tttcccgaact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta	300
gctcactcat taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt cgggctcgta tgttggtgtg	360
aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct	420
tgcatgcctg caggtcgact ctagaggatc cgcaatgcgg atccgcattg cggattacgt	480
attctaattgt tcagtaccgt tcgtataatg tatgctatac gaagttatgc agattgtact	540
gagagtgcac cataccacct tttcaattca tcattttttt tttattcttt tttttgattt	600
cggtttcctt gaaatttttt tgattcggta atctccgaac agaaggaaga acgaaggaag	660
gagcacagac ttagattggg atatatacgc atatgtagtg ttgaagaaac atgaaattgc	720
ccagtattct taaccctaact gcacagaaca aaaacctgca ggaaacgaag ataaatcatg	780
tcgaaagcta catataagga acgtgctgct actcatccta gtctgtttgc tgccaagcta	840
tttaatatca tgcacgaaaa gcaaacaac ttgtgtgctt cattggatgt tcgtaccacc	900
aaggaattac tggagttagt tgaagcatta ggtcccaaaa tttgtttact aaaaacacat	960
gtggatatct tgactgattt ttccatggag ggcacagtta agccgctaaa ggcattatcc	1020
gccaagtaca attttttact cttcgaagac agaaaatttg ctgacattgg taatacagtc	1080
aaattgcagt actctgcggg tgtatacaga atagcagaat gggcagacat tacgaatgca	1140
cacggtgtgg tgggcccagg tattgttagc ggtttgaagc aggcggcaga agaagtaaca	1200
aaggaaccta gaggcctttt gatgttagca gaattgtcat gcaagggctc cctatctact	1260
ggagaatata ctaagggtac tgttgacatt gcgaagagcg acaaagattt tgttatcggc	1320

tttattgctc aaagagacat gggtggaaga gatgaagggtt acgattgggtt gattatgaca	1380
cccgggtgtgg gtttagatga caagggagac gcattgggtc aacagtatag aaccgtggat	1440
gatgtgggtct ctacaggatc tgacattatt attgttggaaggaggactatt tgcaaagggga	1500
agggatgcta aggtagaggg tgaacgttac agaaaagcag gctgggaagc atatttgaga	1560
agatgcggcc agcaaaaacta aaaaactgta ttataagtaa atgcatgtat actaaactca	1620
caaattagag cttcaattta attatatcag ttattaccct atgcgggtgtg aaataaccgca	1680
cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gaaattgtaa acgttaatat tttgttaaaa	1740
ttcgcgtaa atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa	1800
atcccttata aatcaaaaaga atagaccgag atagggttga gtgttggtcc agtttggaac	1860
aagagtccac tattaagaa cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag	1920
ggcgatggcc cactacgtga accatcacc taatcaagat aacttcgtat aatgtatgct	1980
atacgaacgg taccagtgat gatacaacga gttagccaag gtgaattcac tggccgtcgt	2040
tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca	2100
tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggccgc accgatcgcc cttcccaaca	2160
gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgct gatgcggtat tttctcctta cgcctctgtg	2220
cggatattca caccgcatat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt	2280
aagccagccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc	2340
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc	2400
accgtcatca ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt	2460
taatgtcatg ataataatgg tttcttagac gtcagggtggc acttttcggg gaaatgtgcg	2520
cggaaaccct atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca	2580
ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt	2640
ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg ctcaccaga	2700
aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga	2760
actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat	2820
gatgagcact tttaaagtgc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgattg acgccgggca	2880
agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt	2940
cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac	3000
catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct	3060
aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcggt gggaaccgga	3120
gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac	3180

aacgttgcgc aaactattaa ctggcgaaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat 3240
agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg 3300
ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc 3360
actggggcca gatggttaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc 3420
aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg 3480
gtaactgtca gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcatTTTTa 3540
atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg 3600
tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga 3660
tcctTTTTtt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcgg 3720
ggtttgTTTT cggtatcaag agctaccaac tctTTTTccg aaggtaactg gcttcagcag 3780
agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa 3840
ctctgtagca ccgcctacat acctcgtctt gctaattcctg ttaccagtgg ctgctgccag 3900
tgggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca 3960
gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 4020
cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaaa 4080
ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggg cggaacagga gagcgacga gggagcttcc 4140
agggggaaac gcctgggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg 4200
tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggcg gagcctatgg aa 4242

<210> 116

<211> 80

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LA678

<400> 116

caacgttaac accgttttcg gtttgccagg tgacttcaac ttgtccttgt gcattgcgga 60

ttacgtattc taatgttcag 80

10 <210> 117

<211> 81

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> LA679

<400> 117

gtggagcatc gaagactggc aacatgattt caatcattct gatcttagag caccttggct 60

aactcgttgt atcatcactg g 81

<210> 118

<211> 23

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LA337
 5 <400> 118
 ctcatttgaa tcagcttatg gtg 23
 <210> 119
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LA692
 <400> 119
 ggaagtcatt gacaccatct tggc 24
 15 <210> 120
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> LA693
 <400> 120
 agaagctggg acagcagcgt tagc 24
 <210> 121
 <211> 7523
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> pLA34
 <400> 121
 ccagcttttg ttcccttttag tgagggttaa ttgcgcgcgtt ggcgtaatca tggatcatagc 60
 tgttttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatagga gccggaagca 120
 taaagtgtaa agcctggggg gcctaattgag tgaggtaact cacattaatt gcgttgcgct 180
 cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcgccaac 240
 gcgcgggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttcgc ttcctcgctc actgactcgc 300
 tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacgtt 360
 tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 420
 30 ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg 480

ES 2 735 024 T3

agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat	540
accaggcggtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta	600
ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct	660
gtaggtatct cagttcgggt taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc	720
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa	780
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	840
taggcgggtgc tacagagtgc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag	900
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	960
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta	1020
cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	1080
agtggaacga aaactcacgt taagggatct tgggtcatgag attatcaaaa aggatcttca	1140
cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat cttaaagtata tatgagtaaa	1200
cttggtctga cagttaccaa tgcttaatac gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat	1260
ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct	1320
taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt	1380
tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat	1440
ccgcctccat ccagtctatt aattggtgcc ggggaagctag agtaagtagt tgcgcagtta	1500
atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tctgcgtttg	1560
gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt	1620
tgtgcaaaaa agcggtagc tccttcgggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg	1680
cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg	1740
taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc	1800
ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa	1860
ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac	1920
cgtgtttgag atccagttcg atgtaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt	1980
ttactttcac cagcgtttct gggtagcaaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg	2040
gaataagggc gacacgaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa	2100
gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata	2160
aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgaacga agcatctgtg	2220
cttcattttg tagaacaaaa atgcaacgcg agagcgcctaa tttttcaaac aaagaatctg	2280
agctgcattt ttacagaaca gaaatgcaac gcgaaagcgc tattttacca acgaagaatc	2340
tgtgcttcat ttttgtaaaa caaaaatgca acgcgagagc gctaattttt caaacaaga	2400

atctgagctg cattttttaca gaacagaaat gcaacgcgag agcgctat	ttt taccaacaaa	2460
gaatctatac ttcttttttg ttctacaaaa atgcatcccg agagcgctat	ttttctaaca	2520
aagcatctta gattactttt tttctccttt gtgcgctcta taatgcagtc	tcttgataac	2580
tttttgact gtaggtccgt taaggtaga agaaggctac tttggtgtct	atcttctctt	2640
ccataaaaaa agcctgactc cacttccgc gtttactgat tactagcgaa	gctgcggtg	2700
cattttttca agataaaggc atccccgatt atattctata ccgatgtgga	ttgcgcatac	2760
tttgtgaaca gaaagtgata gcgttgatga ttcttcattg gtcagaaaat	tatgaacggt	2820
ttcttctatt ttgtctctat atactacgta taggaaatgt ttacattttc	gtattgtttt	2880
cgattcactc tatgaatagt tcttactaca atttttttgt ctaaagagta	atactagaga	2940
taaacataaa aaatgtagag gtcgagttta gatgcaagtt caaggagcga	aaggtggatg	3000
ggtaggttat atagggatat agcacagaga tatatagcaa agagatactt	ttgagcaatg	3060
tttgtggaag cggtattcgc aatatttttag tagctcgta cagtccggtg	cgtttttggt	3120
tttttgaaag tgcgtcttca gagcgctttt ggttttcaaa agcgctctga	agttcctata	3180
ctttctagag aataggaact tcggaatagg aacttcaaag cgtttccgaa	aacgagcgct	3240
tccgaaaatg caacgcgagc tgcgcacata cagctcactg ttcacgtcgc	acctatatct	3300
gcgtgttgcc tgtatatata tatacatgag aagaacggca tagtgcgtgt	ttatgcttaa	3360
atgcgtactt atatgcgtct atttatgtag gatgaaagggt agtctagtag	ctcctgtgat	3420
attatcccat tccatgcggg gtatcgtagt cttccttcag cactaccctt	tagctgttct	3480
atatgctgcc actcctcaat tggattagtc tcatccttca atgctatcat	ttcctttgat	3540
attggatcat ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat	aggcgtatca	3600
cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcggtg atgacggtga aaacctctga	cacatgcagc	3660
tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa	gcccgtcagg	3720
gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgcggca	tcagagcaga	3780
ttgtactgag agtgcacat aaattccgt tttaagagct tggtagcgc	taggagtcac	3840
tgccaggtat cgtttgaaca cggcattagt cagggaagtc ataacacagt	cctttccgc	3900
aatcttctt ttctattact cttggcctcc tctagtagac tctatatttt	tttatgcctc	3960
ggtaatgatt ttcatttttt tttttccct agcggatgac tctttttttt	tcttagcgat	4020
tggcattatc acataatgaa ttatacatata tataaagtaa tgtgatttct	tcgaagaata	4080
tactaaaaaa tgagcaggca agataaacga aggcaaagat gacagagcag	aaagccctag	4140
taaagcgtat taaaaatgaa accaagattc agattgcgat ctctttaaag	ggtggtcccc	4200
tagcgataga gcactcgatc ttcccagaaa aagaggcaga agcagtagca	gaacaggcca	4260

ES 2 735 024 T3

cacaatcgca agtgattaac gtccacacag gtataggggt tctggaccat atgatacatg	4320
ctctggccaa gcattccggc tggtcgctaa tcggtgagtg cattgggtgac ttacacatag	4380
acgaccatca caccactgaa gactgcggga ttgctctcgg tcaagctttt aaagaggccc	4440
tactggcgcg tggagtaaaa aggtttggat caggatttgc gcctttggat gaggcacttt	4500
ccagagcggg ggtagatctt tcgaacaggc cgtacgcagt tgtcgaactt ggtttgcaaa	4560
gggagaaagt aggagatctc tcttgcgaga tgatcccgca ttttcttgaa agctttgcag	4620
aggctagcag aattaccctc cacgttgatt gtctgcgagg caagaatgat catcaccgta	4680
gtgagagtgc gttcaaggct cttgcgggtg ccataagaga agccacctcg cccaatggta	4740
ccaacgatgt tccctccacc aaagggtgtt ttatgtagtg acaccgatta tttaaagctg	4800
cagcatacga tatatatata tgtgtatata tgtataccta tgaatgtcag taagtatgta	4860
tacgaacagt atgatactga agatgacaag gtaatgcata attctatacg tgtcattctg	4920
aacgaggcgc gctttccttt tttctttttg ctttttcttt ttttttctct tgaactcgac	4980
ggatctatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggaaa	5040
ttgtaaacgt taatattttg ttaaaattcg cgtaaattt ttgttaaata agctcatttt	5100
ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag accgagatag	5160
ggttgagtgt tgttccagtt tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg gactccaacg	5220
tcaaagggcg aaaaaccgtc tatcagggcg atggccact acgtgaacca tcaccctaata	5280
caagtttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg gaaccctaaa gggagccccc	5340
gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggg aagaaagcga	5400
aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagtg tagcggtcac gctgcgcgta accaccacac	5460
ccgccgcgct taatgcgccg ctacagggcg cgtcgcgccca ttcgccattc aggctgcgca	5520
actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg	5580
gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccaggggt ttcccagtcg cgacgttgta	5640
aaacgacggc cagtgagcgc gcgtaatacg actcactata gggcgaattg ggtaccgggc	5700
ccccctcga ggtattagaa gccgccgagc gggcgacagc cctccgacgg aagactctcc	5760
tccgtgcgtc ctcgcttca ccggtcgcgt tcctgaaacg cagatgtgcc tcgcgccgca	5820
ctgctccgaa caataaagat tctacaatac tagcttttat ggttatgaag aggaaaaatt	5880
ggcagtaacc tggccccaca aacottcaaa ttaacgaatc aaattaacaa ccataggatg	5940
ataatgcgat tagtttttta gccttatttc tggggtaatt aatcagcgaa gcgatgattt	6000
ttgatctatt aacagatata taaatggaaa agctgcataa ccactttaac taatactttc	6060
aacattttca gtttgtatta cttcttattc aaatgtcata aaagtatcaa caaaaaattg	6120
ttaatatacc tctatacttt aacgtcaagg agaaaaatgt ccaatttact gcccgtaac	6180

caaaatttgc ctgcattacc ggtcgatgca acgagtgatg aggttcgcaa gaacctgatg 6240
 gacatgttca gggatcgcca ggcgttttct gagcatacct ggaaaatgct tctgtccggt 6300
 tgccggtcgt gggcgcatg gtgcaagttg aataaccgga aatggtttcc cgcagaacct 6360
 gaagatgttc gcgattatct tctatatctt caggcgcgcg gtctggcagt aaaaactatc 6420
 cagcaacatt tgggccagct aaacatgctt catcgtcggt ccgggctgcc acgaccaagt 6480
 gacagcaatg ctgtttcact ggttatgcgg cggatccgaa aagaaaacgt tgatgccggt 6540
 gaacgtgcaa aacaggctct agcgttcgaa cgcactgatt tcgaccaggt tcgttcactc 6600
 atggaaaata gcgatcgctg ccaggatata cgtaatctgg catttctggg gattgcttat 6660
 aacaccctgt tacgtatagc cgaaattgcc aggatcaggg ttaaagatat ctcacgtact 6720
 gacgggtggga gaatgttaat ccatattggc agaacgaaaa cgctggtag caccgcaggt 6780
 gtagagaagg cacttagcct gggggtaact aaactggtcg agcgatggat ttccgtctct 6840
 ggtgtagctg atgatccgaa taactacctg ttttgccggg tcagaaaaaa tgggtgttgc 6900
 gcgccatctg ccaccagcca gctatcaact cgcgccctgg aagggat tttt tgaagcaact 6960
 catcgattga tttacggcgc taaggatgac tctggtcaga gatacctggc ctggtctgga 7020
 cacagtggc gtgtcggagc cgcgcgagat atggcccgcg ctggagt ttc aataccggag 7080
 atcatgcaag ctgggtggctg gaccaatgta aatattgtca tgaactatat ccgtaacctg 7140
 gatagtgaag caggggcaat ggtgcgcctg ctggaagatg gcgattagga gtaagcgaat 7200
 ttcttatgat ttatgatttt tattattaaa taagttataa aaaaaataag tgtatacaaa 7260
 ttttaaagtg actcttaggt tttaaaacga aaattcttat tcttgagtaa ctctttcctg 7320
 taggtcaggt tgctttctca ggtatagcat gaggtcgctc ttattgacca cacctctacc 7380
 ggcattgccga gcaaatgcct gcaaatcgct cccatttca cccaattgta gatatgctaa 7440
 ctccagcaat gagttgatga atctcggtgt gtattttatg tcctcagagg acaacacctg 7500
 tgggtccgcca ccgcggtgga gct 7523

<210> 122

<211> 96

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LA722

<400> 122

tgccaattat ttacctaaac atctataacc ttcaaaagta aaaaaatata caaacgttga 60
 atcatcacct tggctaactc gttgtatcat cactgg 96

10 <210> 123

<211> 80

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LA733

<400> 123

cataatcaat ctcaaagaga acaacacaat acaataacaa gaagaacaaa gcattgcgga 60

ttacgtattc taatgttcag 80

<210> 124

5 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LA453

10 <400> 124

caccgaagaa gaatgcaaaa attcagctc 30

<210> 125

<211> 25

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LA694

<400> 125

gctgaagtg ttagaactgt tgttg 25

20 <210> 126

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> LA695

<400> 126

tgtagctgg agtagactg g 21

<210> 127

<211> 22

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oBP594

<400> 127

35 agctgtctcg tgtgtgggt tt 22

<210> 128

<211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> oBP595

<400> 128

cttaataata gaacaatatc atcctttacg ggcatttat agtgtcgtt 49

<210> 129

45 <211> 49

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP596
 5 <400> 129
 gcgccaacga cactataaga tgcccgtaaa ggatgatatt gttctatta 49
 <210> 130
 <211> 49
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP597
 <400> 130
 tatggaccct gaaaccacag ccacattgca acgacgacaa tgccaaacc 49
 15 <210> 131
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> oBP598
 <400> 131
 tccttggttt ggcattgtcg tcgttgcaat gtggctgtgg ttcagggt 49
 <210> 132
 <211> 49
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP599
 <400> 132
 30 atcctctcgc ggagtccctg tcagtaaag gccatgaagc ttttcttt 49
 <210> 133
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oBP600
 <400> 133
 attggaaaga aaaagcttca tggcctttac tgaacaggga ctccgcgag 49
 <210> 134
 40 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP601
 45 <400> 134
 tcataccaca atcttagacc at 22

<210> 135
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> oBP602
 <400> 135
 tgttcaaacc cctaaccaac c 21
 10 <210> 136
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oBP603
 15 <400> 136
 tggtcccaca atctattacc ta 22
 <210> 137
 <211> 31
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LA811
 <400> 137
 aacgaagcat ctgtgcttca tttgtagaa c 31
 25 <210> 138
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> LA817
 <400> 138
 cgatccactt gtatatgttg atgaatttt gaggaattct gaaccagtcc taaaacgag 59
 <210> 139
 <211> 31
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LA812
 <400> 139
 40 aacaaagata tgctattgaa gtgcaagatg g 31
 <210> 140
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> LA818
 <400> 140

	ctcaaaaatt catccaaata tacaagtga tcg	33
	<210> 141	
	<211> 90	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> LA512	
	<400> 141	
	gtattttggt agattcaatt ctctttccct ttccttttcc ttcgctcccc ttccttatca	60
	gcattgcgga ttacgtattc taatgttcag	90
10	<210> 142	
	<211> 90	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> LA513	
	<400> 142	
	ttggttgggg gaaaaagagg caacaggaaa gatcagaggg ggaggggggg ggagagtgtc	60
	accttggtta actcgttgta tcatcactgg	90
	<210> 143	
	<211> 29	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> LA516	
	<400> 143	
25	ctcgaacaa taagacgacg atggctctg	29
	<210> 144	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> LA514	
	<400> 144	
	cactatctgg tgcaaactg gcaccggaag	30
	<210> 145	
35	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> LA515	
40	<400> 145	
	tgttgtagc cactcgtgaa cttctctgc	29
	<210> 146	
	<211> 6903	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	

ES 2 735 024 T3

<220>

<223> pLA71

<400> 146

aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat	60
gttcttttct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc	120
tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga	180
agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg	240
gcacgacagg tttcccgaact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta	300
gctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg	360
aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct	420
tgcatgcat ctgaaatgaa taacaatact gacagtagat ctgaaatgaa taacaatact	480
gacagtacta aataattgcc tacttggctt cacatacggt gcatacgtcg atatagataa	540
taatgataat gacagcagga ttatcgtaat acgtaatagt tgaaaatctc aaaaatgtgt	600
gggtcattac gtaaataatg ataggaatgg gattcttcta tttttccttt ttccattcta	660
gcagccgtcg ggaaaacgtg gcatcctctc tttcgggctc aattggagtc acgctgccgt	720
gagcatcctc tctttccata tctaacaact gagcacgtaa ccaatggaaa agcatgagct	780

tagcgttgct ccaaaaaagt attggatggg taataccatt tgtctgttct cttctgactt	840
tgactcctca aaaaaaaaaa atctacaatc aacagatcgc ttcaattacg ccctcacaaa	900
aacttttttc cttcttcttc gcccacgtta aattttatcc ctcatgttgt ctaacggatt	960
tctgcacttg atttattata aaaagacaaa gacataatac ttctctatca atttcagtta	1020
ttgttcttcc ttgcgttatt cttctgttct tctttttctt ttgtcatata taaccataac	1080
caagtaatac atattcaaat cttagagctga ggatgttgac aaaagcaaca aaagaacaaa	1140
aatcccttgt gaaaaacaga ggggcggagc ttgttggtga ttgcttagtg gagcaagggtg	1200
tcacacatgt atttggcatt ccaggtgcaa aaattgatgc ggtatttgac gctttacaag	1260
ataaaggacc tgaaattatc gttgcccggc acgaacaaaa cgcagcattc atggcccaag	1320
cagtcggccg tttaactgga aaaccgggag tcgtgttagt cacatcagga ccgggtgcct	1380
ctaacttggc aacaggcctg ctgacagcga acactgaagg agaccctgtc gttgcgcttg	1440
ctggaaacgt gatccgtgca gatcgtttta aacggacaca tcaatctttg gataatgcgg	1500
cgctattcca gccgattaca aaatacagtg tagaagttca agatgtaaaa aatataccgg	1560
aagctgttac aaatgcattt aggatagcgt cagcagggca ggctggggcc gcttttgtga	1620
gctttccgca agatgttgtg aatgaagtca caaatacgaa aaacgtgcgt gctgttgca	1680
cgccaaaact cggtcctgca gcagatgatg caatcagtcg ggccatagca aaaatccaaa	1740
cagcaaaaact tcctgtcgtt ttggtcggca tgaaaggcgg aagaccgga gcaattaaag	1800
cggttcgcaa gcttttgaaa aaggttcagc ttccatttgt tgaaacatat caagctgccg	1860
gtaccctttc tagagattta gaggatcaat attttgccg taccggttg ttccgcaacc	1920
agcctggcga ttactgcta gagcaggcag atgttgttct gacgatcggc tatgaccoga	1980
ttgaatatga tccgaaattc tggaatatca atggagaccg gacaattatc catttagacg	2040
agattatcgc tgacattgat catgcttacc agcctgatct tgaattgatc ggtgacattc	2100
cgtccacgat caatcatatc gaacacgatg ctgtgaaagt ggaatttgca gagcgtgagc	2160
agaaaatcct ttctgattta aaacaatata tgcatgaagg tgagcagggtg cctgcagatt	2220
ggaaatcaga cagagcgcac cctcttgaaa tcgttaaaga gttgcgtaat gcagtcgatg	2280
atcatgttac agtaacttgc gatatcgggt cgcacgccat ttggatgtca cgttatttcc	2340
gcagctacga gccgttaaca ttaatgatca gtaacgggat gcaaactc gccgttgccg	2400
ttccttgggc aatcggcgct tcattggtga aaccgggaga aaaagtgggt tctgtctctg	2460
gtgacggcgg tttcttattc tcagcaatgg aattagagac agcagttcga ctaaaagcac	2520
caattgtaca cattgtatgg aacgacagca catatgacat ggttgcatc cagcaattga	2580
aaaaatataa ccgtacatct gcggtcgatt tcggaaatat cgatatcgtg aaatatgcgg	2640

aaagcttcgg agcaactggc ttgcgcgtag aatcaccaga ccagctggca gatgttctgc	2700
gtcaaggcat gaacgctgaa ggtcctgtca tcatcgatgt cccggttgac tacagtgata	2760
acattaatth agcaagtgaac aagcttccga aagaattcgg ggaactcatg aaaacgaaag	2820
ctctctagtt aattaatcat gtaattagtt atgtcacgct tacattcacg ccctcccccc	2880
acatccgctc taaccgaaaa ggaaggagtt agacaacctg aagtctaggt ccctatttat	2940
ttttttatag ttatgttagt attaagaacg ttattttatat ttcaaatttt tctttttttt	3000
ctgtacagac gcgtgtacgc atgtaacatt atactgaaaa ccttgcttga gaaggttttg	3060
ggacgctcga aggctttaat ttaggttttg ggacgctcga aggctttaat ttggatccgc	3120
attgcggtatt acgtattcta atgttcagta ccgttcgtat aatgtatgct atacgaagtt	3180
atgcagattg tactgagagt gcaccatacc acagcttttc aattcaattc atcatthttt	3240
ttttattctt ttttttgatt tcggtttctt tgaaattttt ttgattcggg aatctccgaa	3300
cagaaggaag aacgaaggaa ggagcacaga cttagattgg tatatatacg catatgtagt	3360
gttgaagaaa catgaaattg cccagtattc ttaaccacaac tgcacagAAC aaaaacctgc	3420
aggaaacgaa gataaatcat gtcgaaagct acatataagg aacgtgctgc tactcatcct	3480
agtcctgttg ctgccaaagt atttaatatc atgcacgaaa agcaaacaaa cttgtgtgct	3540
tcattggatg ttcgtaccac caaggaatta ctggagttag ttgaagcatt aggtcccaaa	3600
atttgttttac taaaaacaca tgtggatatc ttgactgatt tttccatgga gggcacagtt	3660
aagccgctaa aggcattatc cgccaagtac aattttttac tcttcgaaga cagaaaattt	3720
gctgacattg gtaatacagt caaattgcag tactctgcgg gtgtatacag aatagcagaa	3780
tgggcagaca ttacgaatgc acacgggtgtg gtgggccag gtattgttag cggtttgaag	3840
caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct agaggccttt tgatgttagc agaattgtca	3900
tgcaagggct ccctatctac tggagaatat actaagggtg ctgttgacat tgcgaagagc	3960
gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct caaagagaca tgggtggaag agatgaaggt	4020
tacgattggg tgattatgac acccggtgtg ggttttagatg acaagggaga cgcattgggt	4080
caacagtata gaaccgtgga tgatgtggtc tctacaggat ctgacattat tattgttgga	4140
agaggactat ttgcaaaggg aagggtatgct aaggtagagg gtgaacgtta cagaaaagca	4200
ggctgggaag catattttgag aagatgcggc cagcaaaact aaaaaactgt attataagta	4260
aatgcatgta tactaaactc acaaattaga gcttcaattt aattatatca gttattacc	4320
tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggaaattgta	4380
aacgttaata ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac	4440
caataggccg aaatcggaac aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg	4500
agtgttggtc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa	4560

gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaaga	4620
taacttcgta taatgtatgc tatacgaacg gtaccagtga tgatacaacg agttagccaa	4680
ggtgaattca ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca	4740
acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg	4800
caccgatcgc ctttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgcc tgatgcggta	4860
ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata tgggtgcactc tcagtacaat	4920
ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc	4980
ctgacgggct tgtctgctcc cggcattccg ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag	5040
ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt	5100
gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcagggtg	5160
cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa	5220
tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa	5280
gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgagg cattttgcct	5340
tcctgttttt gctcaccag aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg	5400
tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg	5460
ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcgggtatt	5520
atcccgattt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga	5580
cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga	5640
attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac	5700
gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt ttgacacaac atgggggatc atgtaactcg	5760
ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac	5820
gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct	5880
agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct	5940
gcgctcgggc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg	6000
gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tcgtagttat	6060
ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg	6120
tgccctactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat	6180
tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct	6240
catgacaaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa	6300
gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa	6360
aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc	6420

ES 2 735 024 T3

gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta	6480
gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct	6540
gttaccagtg gctgctgccg gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg	6600
atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag	6660
cttgagcgca acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc	6720
cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg	6780
agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctgggtat ctttatagtc ctgtcgggtt	6840
tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg	6900
gaa	6903

<210> 147

<211> 6924

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pLA78

<400> 147	
gatccgcatt gcggattacg tattctaatag ttcagtaccg ttcgtataat gtatgctata	60
cgaagttatg cagattgtac tgagagtga ccataccacc ttttcaattc atcatttttt	120
ttttattctt ttttttgatt tcggtttcct tgaaattttt ttgattcggg aatctccgaa	180
cagaaggaag aacgaaggaa ggagcacaga cttagattgg tatatatacg catatgtagt	240
gttgaagaaa catgaaattg cccagtattc ttaaccaaac tgcacagaac aaaaacctgc	300
aggaaacgaa gataaatcat gtcgaaagct acatataagg aacgtgctgc tactcatcct	360
agtcctgttg ctgccaagct atttaatatc atgcacgaaa agcaaacaaa cttgtgtgct	420
tcattggatg ttcgtaccac caaggaatta ctggagttag ttgaagcatt aggtcccaaa	480
atttgtttac taaaaacaca tgtggatata ttgactgatt tttccatgga gggcacagtt	540
aagccgctaa aggcattatc cgccaagtac aattttttac tcttcgaaga cagaaaattt	600
gctgacattg gtaatacagt caaattgcag tactctgcgg gtgtatacag aatagcagaa	660
tgggcagaca ttacgaatgc acacggtgtg gtgggcccag gtattgttag cggtttgaag	720
caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct agaggccttt tgatgttagc agaattgtca	780
tgcaagggct ccctatctac tggagaatat actaagggtg ctgttgacat tgcgaagagc	840
gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct caaagagaca tgggtggaag agatgaaggt	900
tacgattggg tgattatgac acccggtgtg ggttttagatg acaagggaga cgcattgggt	960
caacagtata gaaccgtgga tgatgtgggc tctacaggat ctgacattat tattgttgga	1020
agaggactat ttgcaaaggg aagggatgct aaggtagagg gtgaacgtta cagaaaagca	1080

ggctgggaag catatttgag aagatgcggc cagcaaaact aaaaaactgt attataagta	1140
aatgcatgta tactaaactc acaaattaga gcttcaattt aattatatca gttattaccc	1200
tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggaaattgta	1260
aacgttaata ttttgtaaa attcgcgtta aatttttggt aaatcagctc attttttaac	1320
caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg	1380
agtgttggtc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa	1440
gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaaga	1500
taacttcgta taatgtatgc tatacgaacg gtaccagtga tgatacaacg agttagccaa	1560
ggtgaattca ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccga	1620
acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg	1680
caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgcc tgatgcggta	1740
ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata tgggtgactc tcagtacaat	1800
ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc	1860
ctgacgggct tgtctgctcc cggcacccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag	1920
ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt	1980
gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcagggtg	2040
cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa	2100
tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa	2160
gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcg cattttgcct	2220
tcctgttttt gctcaccag aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg	2280
tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg	2340
ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt	2400
atcccgattt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga	2460
cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcaccttacg gatggcatga cagtaagaga	2520
attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaactac ttctgacaac	2580
gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg	2640
ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac	2700
gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct	2760
agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct	2820
gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg	2880
gtctcgcggg atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tcgtagttat	2940

ctacacgacg	gggagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	3000
tgcctcactg	attaagcatt	ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	tacttttagat	3060
tgatttaaaa	cttcattttt	aattttaaag	gatctaggtg	aagatccttt	ttgataatct	3120
catgaccaa	atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	ccgtagaaaa	3180
gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	tgcaaacaaa	3240
aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	gagctaccaa	ctctttttcc	3300
gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	tgtagccgta	3360
gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	tgctaatact	3420
gttaccagtg	gctgctgcc	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	actcaagacg	3480
atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	cacagcccag	3540
cttgagcgga	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	gagaaagcgc	3600
cacgcttccc	gaagggagaa	aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	tcggaacagg	3660
agagcgcacg	aggagccttc	cagggggaaa	cgcctgggat	ctttatagtc	ctgtcggggt	3720
tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	ggagcctatg	3780
gaaaaacgcc	agcaacgcgg	ccttttttacg	gttcctggcc	ttttgctggc	cttttgctca	3840
catgttcttt	cctgcgttat	cccctgattc	tgtggataac	cgtattaccg	cctttgagtg	3900
agctgatacc	gctcgccgca	gccgaacgac	cgagcgcagc	gagtcagtga	gcgaggaagc	3960
ggaagagcgc	ccaatacgca	aaccgcctct	ccccgcgcgt	tggccgattc	attaatgcag	4020
ctggcacgac	aggtttcccg	actggaaagc	gggcagtgag	cgcaacgcaa	ttaatgtgag	4080
ttagctcact	cattaggcac	cccaggcttt	acactttatg	cttcggctc	gtatgttgtg	4140
tgggaattgtg	agcggataac	aatttcacac	aggaaacagc	tatgaccatg	attacgccaa	4200
gcttccaatt	accgtcgctc	gtgatttggt	tgcaaaaaga	acaaaactga	aaaaaccag	4260
acacgctcga	cttctgtctc	tcctattgat	tgagcttcc	aatttcgtca	cacaacaagg	4320
tcctgtcgac	gcctacttgg	cttcacatac	gttgcatagc	tcgatataga	taataatgat	4380
aatgacagca	ggattatcgt	aatacgtaat	agttgaaaat	ctcaaaaatg	tgtgggtcat	4440
tacgtaaata	atgataggaa	tgggattctt	ctatttttcc	tttttccatt	ctagcagccg	4500
tcgggaaaaac	gtggcatcct	ctctttcggg	ctcaattgga	gtcacgctgc	cgtgagcatc	4560
ctctctttcc	atatctaaca	actgagcacg	taaccaatgg	aaaagcatga	gcttagcggt	4620
gctccaaaaa	agtattggat	ggttaatacc	atttgtctgt	tctcttctga	ctttgactcc	4680
tcaaaaaaaaa	aaaatctaca	atcaacagat	cgcttcaatt	acgccctcac	aaaaactttt	4740
ttccttcttc	ttcgcccacg	ttaaatttta	tccctcatgt	tgtctaacgg	atttctgcac	4800
ttgatttatt	ataaaaagac	aaagacataa	tacttctcta	tcaatttcag	ttattgttct	4860

tccttgcgtt attcttctgt tcttcttttt cttttgtcat atataaccat aaccaagtaa	4920
tacatattca agtttaaaca tgtataccgt aggacagtac ttggtagata gactagaaga	4980
gattggtatc gataaggttt tcggtgtgcc aggggattac aatttgactt ttctagatta	5040
cattcaaat cacgaaggac tttcctggca agggaatact aatgaactaa acgcagcata	5100
tgcagcagat ggctacgccc gtgaaagagg cgtatcagct cttgttacta cattcggagt	5160
gggtgaactg tcagccatta acggaacagc tggtagtttt gcagaacaag tccctgtcat	5220
ccacatcgtg ggttctccaa ctatgaatgt gcaatccaac aaaaagctgg ttcatcattc	5280
cttaggaatg ggtaactttc ataacttttag tgaaatggct aaggaagtca ctgccgctac	5340
aaccatgctt actgaagaga atgcagcttc agagatcgac agagtattag aaacagcctt	5400
gttggaagagg aggccagtat acatcaatct tccaattgat atagctcata aagcaatagt	5460
taaacctgca aaagcactac aaacagagaa atcatctggt gagagagagg cacaacttgc	5520
agaaatcata ctatcacact tagaaaaggc cgctcaacct atcgtaatcg ccggtcatga	5580
gatcgcccggt ttccagataa gagaaagatt tgaaaactgg ataaaccaa caaagttgcc	5640
agtaaccaat ttggcatatg gcaaaggctc tttcaatgaa gagaacgaac atttcattgg	5700
tacctattac ccagcttttt ctgacaaaaa cgttctggat tacgttgaca atagtgactt	5760
cgttttacat tttggtggga aaatcattga caattctacc tcctcatttt ctcaaggctt	5820
taagactgaa aacactttaa ccgctgcaaa tgacatcatt atgctgccag atgggtctac	5880
ttactctggg atttctctta acggtctttt ggagagctg gaaaaactaa actttacttt	5940
tgctgatact gctgctaaac aagctgaatt agctgttttc gaaccacagg ccgaaacacc	6000
actaaagcaa gacagatttc accaagctgt tatgaacttt ttgcaagctg atgatgtgtt	6060
ggctactgag caggggacat catctttcgg tttgatgttg gcacctctga aaaaggtat	6120
gaatttgatc agtcaaacat tatggggctc cataggatac acattacctg ctatgattgg	6180
ttcacaaatt gctgccccag aaaggagaca cattctatcc atcgggtgatg gatcttttca	6240
actgacagca caggaaatgt ccaccatctt cagagagaaa ttgacaccag tgatattcat	6300
tatcaataac gatggctata cagtcgaaag agccatccat ggagaggatg agagttacaa	6360
tgatatacca acttggaact tgcaattagt tgctgaaaca tttggtggtg atgccgaaac	6420
tgctgacact cacaacgttt tcacagaaac agacttcgct aatacttttag ctgctatcga	6480
tgctactcct caaaaagcac atgtcgttga agttcatatg gaacaaatgg atatgccaga	6540
atcattgaga cagattggct tagccttatac taagcaaaac tcttaagttt aaactaagcg	6600
aatttcttat gatttatgat ttttattatt aaataagtta taaaaaaat aagtgtatac	6660
aaattttaaa gtgactctta ggttttataa cgaaaattct tattcttgag taactctttc	6720

ES 2 735 024 T3

ctgtaggtca ggttgctttc tcaggtatag catgaggtcg ctcttattga ccacacctct 6780
accggcatgc cgagcaaattg cctgcaaattc gctccccatt tcacccaatt gtagatatgc 6840
taactccagc aatgagttga tgaatctcgg tgtgtatttt atgtcctcag aggacaacac 6900
ctgttgtaat cgttcttcca cacg 6924

<210> 148
<211> 6761
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> pLA65

<400> 148

gatccgcatt gcggattacg tattctaattg ttcagtaccg ttcgtataat gtatgctata 60
cgaagtattg cagattgtac tgagagtgc ccataccacc ttttcaattc atcatttttt 120
ttttattctt ttttttgatt tcggtttcct tgaaattttt ttgattcggg aatctccgaa 180
cagaaggaag aacgaaggaa ggagcacaga cttagattgg tatatatacg catatgtagt 240
gttgaagaaa catgaaattg cccagtattc ttaacccaac tgcacagaac aaaaacctgc 300
aggaaacgaa gataaatcat gtcgaaagct acatataagg aacgtgctgc tactcatcct 360
agtcctgttg ctgccaaagt atttaatatc atgcacgaaa agcaaacaaa cttgtgtgct 420
tcattggatg ttcgtaccac caaggaatta ctggagttag ttgaagcatt aggtcccaaa 480
atgtgtttac taataaacaca tgtggatatc ttgactgatt tttccatgga gggcacagtt 540
aagccgctaa aggcattatc cgccaagtac aattttttac tcttcgaaga cagaaaattt 600
gctgacattg gtaatacagt caaattgcag tactctgcgg gtgtatacag aatagcagaa 660
tgggcagaca ttacgaatgc acacgggtgtg gtgggccag gtattgttag cggtttgaag 720
caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct agaggccttt tgatgttagc agaattgtca 780
tgcaagggct ccctatctac tggagaatat actaagggtg ctgttgacat tgcgaagagc 840
gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct caaagagaca tgggtggaag agatgaaggt 900
tacgattggg tgattatgac acccgggtgtg ggttttagatg acaagggaga cgcattgggt 960
caacagtata gaaccgtgga tgatgtgggc tctacaggat ctgacattat tattgttgga 1020
agaggactat ttgcaaaggg aagggatgct aaggtagagg gtgaacgtta cagaaaagca 1080
ggctgggaag catatttgag aagatgcggc cagcaaaact aaaaaactgt attataagta 1140
aatgcatgta tactaaactc acaaattaga gcttcaattt aattatatca gttattaccc 1200
tatgcgggtg gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggaaattgta 1260
aacgttaata ttttgtaaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac 1320
caataggccg aaatcgga aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg 1380

agtgttggtc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa	1440
gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaaga	1500
taacttcgta taatgtatgc tatacgaacg gtaccagtga tgatacaacg agttagccaa	1560
ggtgaattca ctggccgtcg ttttacaacg tctgtactgg gaaaaccctg gcgttaccca	1620
acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccc	1680
caccgatcgc cttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgcc tgatgcggta	1740
ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata tgggtgcactc tcagtacaat	1800
ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc	1860
ctgacgggct tgtctgctcc cggcattccg ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag	1920
ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt	1980
gatacgcta tttttatag ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcagggtg	2040
cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa	2100
tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa	2160
gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgccg cattttgcct	2220
tcctgttttt gctcaccag aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg	2280
tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg	2340
ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcgggtatt	2400
atcccgatt gacgccgggc aagagcaact cggctcgccgc atacactatt ctcagaatga	2460
cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga	2520
attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac	2580
gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg	2640
ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac	2700
gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct	2760
agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct	2820
gcgctcggcc cttccggctg gctgggttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg	2880
gtctcgcggg atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tctgagttat	2940
ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg	3000
tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat	3060
tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct	3120
catgacaaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa	3180
gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa	3240

aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc	3300
gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta	3360
gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct	3420
gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg	3480
atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag	3540
cttgaggcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc	3600
cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg	3660
agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcggggt	3720
tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg	3780
gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca	3840
catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cttttgagt	3900
agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc	3960
ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgcggt tggccgattc attaatgcag	4020
ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag	4080
ttagctcact cattaggcac cccaggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttggt	4140
tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgcaa	4200
gcttacctgg taaaacctct agtggagtag tagatgtaat caatgaagcg gaagccaaaa	4260
gaccagagta gaggcctata gaagaaactg cgataccttt tgtgatggct aaacaaacag	4320
acatcttttt atatgttttt acttctgtat atcgtgaagt agtaagtgat aagcgaattt	4380
ggctaagaac gttgtaagtg aacaagggac ctcttttgcc tttcaaaaaa ggattaaatg	4440
gagttaatca ttgagattta gttttcgtta gattctgtat ccctaaataa ctcccttacc	4500
cgacgggaag gcacaaaaga cttgaataat agcaaacggc cagtagccaa gaccaaataa	4560
tactagagtt aactgatggt cttaaacagg cattacgtgg tgaactccaa gaccaatata	4620
caaaatatcg ataagttatt cttgccacc aatttaagga gcctacatca ggacagtagt	4680
accattcctc agagaagagg tatacataac aagaaaatcg cgtgaacacc ttatataact	4740
tagcccgtta ttgagctaaa aaaccttgca aaatttccta tgaataagaa tacttcagac	4800
gtgataaaaa ttactttct aactcttctc acgctgcccc tatctgttct tccgctctac	4860
cgtgagaaat aaagcatcga gtacggcagt tcgctgtcac tgaactaaaa caataaggct	4920
agttcgaatg atgaacttgc ttgctgtcaa acttctgagt tgccgctgat gtgacactgt	4980
gacaataaat tcaaaccggt tatagcggtc tcctccggta ccggttctgc cacctccaat	5040
agagctcagt aggagtcaga acctctgcgg tggctgtcag tgactcatcc gcgtttcgta	5100
agttgtgcgc gtgcacattt cgcccggttc cgctcatctt gcagcaggcg gaaattttca	5160

tcacgctgta ggacgcaaaa aaaaaataat taatcgtaca agaatcttgg aaaaaaatt 5220
gaaaaatttt gtataaaagg gatgacctaa cttgactcaa tggctttttac acccagtatt 5280
ttccctttcc ttgtttgtta caattataga agcaagacaa aaacatatag acaacctatt 5340
cctaggagtt atattttttt accctaccag caatataagt aaaaaactgt ttatgaaagc 5400
attagtgtat agggggcccag gccagaagtt ggtggaagag agacagaagc cagagcttaa 5460
ggaacctggt gacgctatag tgaaggtaac aaagactaca atttgcgga ccatctaca 5520
cattcttaaa ggtgacgttg cgacttgtaa acccggtcgt gtattagggc atgaaggagt 5580
gggggttatt gaatcagtcg gatctggggt tactgctttc caaccaggcg atagagtttt 5640
gatatcatgt atatcgagtt gcggaaagtg ctcatcttct agaagaggaa tgttcagtca 5700
ctgtacgacc gggggttga ttctgggcaa cgaaattgat ggtaccaag cagagtacgt 5760
aagagtacca catgctgaca catcccttta tcgtattccg gcaggtgcgg atgaagaggc 5820
cttagtcatg ttatcagata ttctaccaac gggttttgag tgcggagtcc taaacggcaa 5880
agtcgcacct ggttcttcg tggctatagt aggtgctggt cccgttggtt tggccgcctt 5940
actgacagca caattctact cccagctga aatcataatg atcgatcttg atgataacag 6000
gctgggatta gccaaacaat ttggtgccac cagaacagta aactccacgg gtggtaacgc 6060
cgcagccgaa gtgaaagctc ttactgaagg cttagggtgt gatactgcga ttgaagcagt 6120
tgggatacct gctacatttg aattgtgtca gaatatcgta gctcccgtg gaactatcgc 6180
taatgtcggc gttcacggta gcaaagttga tttgcatctt gaaagtttat ggtcccataa 6240
tgtcacgatt actacaaggt tggttgacac ggctaccacc ccgatgttac tgaaaactgt 6300
tcaaagtcac aagctagatc catctagatt gataacacat agattcagcc tggaccagat 6360
cttggaagca tatgaaactt ttggccaagc tgcgtctact caagcactaa aagtcacat 6420
ttcgatggag gcttgattaa ttaagagtaa gcgaatttct tatgatttat gatTTTTatt 6480
attaaataag ttataaaaaa aataagtgt tacaattttt aaagtgactc ttaggtttta 6540
aaacgaaaat tcttattctt gagtaactct ttcctgtagg tcaggttgct ttctcaggta 6600
tagcatgagg tcgctcttat tgaccacacc tctaccgga tgcgagcaa atgcctgcaa 6660
atcgctcccc atttcaccca attgtagata tgctaactcc agcaatgagt tgatgaatct 6720
cgggtgtgtat tttatgtcct cagaggacaa cacctgtggt g 6761

<210> 149
<211> 90
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> 895
<400> 149

		tctcaattat tattttctac tcataacctc acgcaaaata acacagtcaa atcaatcaaa	60
		atgttgacaa aagcaacaaa agaacaaaaa	90
	<210>	150	
	<211>	81	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	679	
	<400>	150	
		gtggagcatc gaagactggc aacatgattt caatcattct gatcttagag caccttggct	60
		aactcgttgt atcatcactg g	81
10	<210>	151	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
15	<223>	681	
	<400>	151	
		ttattgctta gcgttgtag	20
	<210>	152	
	<211>	22	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	92	
	<400>	152	
25		gagaagatgc ggccagcaaa ac	22
	<210>	153	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	N245	
	<400>	153	
		agggtagcct ccccataaca taaac	25
	<210>	154	
35	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	N246	
40	<400>	154	
		tctccaaata tatacctctt gtgtg	25
	<210>	155	
	<211>	90	
	<212>	ADN	
45	<213>	Secuencia artificial	

<220>
 <223> 896
 <400> 155
 ttttatatac agtataaata aaaaacccac gtaatatagc aaaaacatat tgccaacaaa 60
 aattaccgtc gtcgtgatt tgtttgcaaa 90
 5 <210> 156
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> 897
 <400> 156
 caaactgtgt aagtttatatt atttgcaaca ataattcgtt tgagtacact actaatggcc 60
 accttggtta actcgttgta tcatcactgg 90
 <210> 157
 <211> 28
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 365
 <400> 157
 20 ctctatctcc gtcaggcta agcaattg 28
 <210> 158
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> 366
 <400> 158
 cagccgactc aacggcctgt ttcacg 26
 <210> 159
 30 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> N638
 35 <400> 159
 aaaagatagt gtagtagtga taaactgg 28
 <210> 160
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 740
 <400> 160
 cgataatcct gctgtcatta tc 22

	<210>	161		
	<211>	83		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
5	<220>			
	<223>	856		
	<400>	161		
		gcttatttag aagtgtcaac aacgtatcta ccaacgattt gacccttttc cacaccttgg		60
		ctaactcggt gtatcatcac tgg		83
10	<210>	162		
	<211>	80		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	857		
15	<400>	162		
		gcacaatatt tcaagctata ccaagcatat aatcaactat ctcatatata atgaaagcat		60
		tagtgtatag gggcccaggc		80
20	<210>	163		
	<211>	25		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	BK415		
	<400>	163		
		gcctcattga tgggtgtaca taacg	25	
25	<210>	164		
	<211>	26		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
30	<223>	N1092		
	<400>	164		
		agagtttga tatcatgtat atcgag	26	
35	<210>	165		
	<211>	92		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	906		
	<400>	165		
		atgacaggtg aaagaattga aaaggtgaaa ataaatgacg aatttgcaaa atcacatttc		60
40		acctggtaaa acctctagtg gagtagtaga tg		92
	<210>	166		
	<211>	87		
	<212>	ADN		

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 907

<400> 166

aaaaagattc aatgccgtct cctttcgaaa ctttaataata gaacaatatc atccttcacc 60

5 ttggctaact cgttgatatca tcaactgg 87

<210> 167

<211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> 667

<400> 167

tctcctttcg aaacttaata atagaacaat atcatccttt tgtaaaacga cggccagtga 60

attcaccttg 70

<210> 168

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 749

20 <400> 168

caagtctttt gtgcctccc gtcgg 25

<210> 169

<211> 25

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 413

<400> 169

ggacataaaa tacacaccga gattc 25

30 <210> 170

<211> 10934

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> pRS423::TEF(M4)-xpk1+ENO1-eutD

<400> 170

ES 2 735 024 T3

ggtggagctc cagcttttgt tcccttttagt gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat	60
ggcatagct gtttcctgtg tgaaattggt atccgctcac aattccacac aacataggag	120
ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgagt gaggtaactc acattaattg	180
cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa	240
tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct tcctcgctca	300
ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg	360
taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc	420
agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc	480
cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac	540
tataaagata ccaggcggtt ccccttgga gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct	600
tgcgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata	660
gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc	720
acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca	780
accggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	840
cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta	900
gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	960
gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc	1020
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt	1080
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa	1140
ggatcttcac ctagatcctt tttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat	1200
atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga	1260
tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac	1320

gggagggcctt	accatctggc	cccagtgctg	caatgatacc	gcgagaccca	cgctcaccgg	1380
ctccagattt	atcagcaata	aaccagccag	ccggaagggc	cgagcgcaga	agtggtcctg	1440
caactttatc	cgcctccatc	cagtctatta	attgttgccg	ggaagctaga	gtaagtagtt	1500
cgccagttaa	tagtttgccg	aacgttggtg	ccattgctac	aggcatcgtg	gtgtcacgct	1560
cgtcgttttg	tatggcttca	ttcagctccg	gttcccaacg	atcaaggcga	gttacatgat	1620
ccccatggt	gtgcaaaaaa	gcggttagct	ccttcgggtc	tccgatcgtt	gtcagaagta	1680
agttggccgc	agtgttatca	ctcatgggta	tggcagcact	gcataattct	cttactgtca	1740
tgccatccgt	aagatgcttt	tctgtgactg	gtgagtactc	aaccaagtca	ttctgagaat	1800
agtgtatgcg	gcgaccgagt	tgctcttgcc	cggcgtcaat	acgggataat	accgcgccac	1860
atagcagaac	tttaaaagtg	ctcatcattg	gaaaacgttc	ttcggggcga	aaactctcaa	1920
ggatcttacc	gctgttgaga	tccagttcga	tgtaacccac	tcgtgcaccc	aactgatctt	1980
cagcatcttt	tactttcacc	agcgtttctg	ggtgagcaaa	aacaggaagg	caaaatgccg	2040
caaaaaaggg	aataagggcg	acacggaaat	gttgaatact	catactcttc	ctttttcaat	2100
attattgaag	catttatcag	ggttattgtc	tcattgagcgg	atacatattt	gaatgtattt	2160
agaaaaataa	acaaataggg	gttccgcgca	catttccccg	aaaagtgccca	cctgaacgaa	2220
gcatctgtgc	ttcattttgt	agaacaaaaa	tgcaacgcga	gagcgctaata	ttttcaaaca	2280
aagaatctga	gctgcatttt	tacagaacag	aaatgcaacg	cgaaagcgct	atttttaccaa	2340
cgaagaatct	gtgcttcatt	tttgtaaaac	aaaaatgcaa	cgcgagagcg	ctaatttttc	2400
aaacaaagaa	tctgagctgc	atttttacag	aacagaaatg	caacgcgaga	gcgctatttt	2460
accaacaaag	aatctatact	tcttttttgt	tctacaaaaa	tgcatcccgga	gagcgctatt	2520
tttctaacaa	agcatcttag	attacttttt	ttctcctttg	tgcgctctat	aatgcagtct	2580
cttgataact	ttttgcactg	taggtccggt	aagggttagaa	gaaggctact	ttggtgtcta	2640
ttttctcttc	cataaaaaaa	gcctgactcc	acttcccgcg	tttactgatt	actagcgaag	2700
ctgcgggtgc	attttttcaa	gataaaggca	tccccgatta	tattctatac	cgatgtggat	2760
tgcgcatact	ttgtgaacag	aaagtgatag	cgttgatgat	tcttcattgg	tcagaaaatt	2820
atgaacgggt	tcttctatct	tgtctctata	tactacgtat	aggaaatgtt	tacattttcg	2880
tattgttttc	gattcactct	atgaatagtt	cttactacaa	tttttttgtc	taaagagtaa	2940
tactagagat	aaacataaaa	aatgtagagg	tcgagtttag	atgcaagttc	aaggagcgaa	3000
aggtggatgg	gtagggtata	tagggatata	gcacagagat	atatagcaaa	gagatacttt	3060
tgagcaatgt	ttgtggaagc	ggatattcgca	atatttttagt	agctcgttac	agtccgggtgc	3120
gtttttgggt	ttttgaaagt	gcgtcttcag	agcgccttttg	gttttcaaaa	gcgctctgaa	3180

gttcctatac	tttctagaga	ataggaactt	cggaatagga	acttcaaagc	gtttccgaaa	3240
acgagcgctt	ccgaaaaatgc	aacgcgagct	gcgcacatac	agctcactgt	tcacgtcgca	3300
cctatatctg	cgtgttgcc	gtatatatat	atacatgaga	agaacggcat	agtgcgtgtt	3360
tatgcttaaa	tgcgtactta	tatgcgtcta	tttatgtagg	atgaaaggta	gtctagtacc	3420
tcctgtgata	ttatcccatt	ccatgcgggg	tatcgtatgc	ttccttcagc	actacccttt	3480
agctgttcta	tatgctgcca	ctcctcaatt	ggattagtct	catccttcaa	tgctatcatt	3540
tcctttgata	ttggatcatc	taagaaacca	ttattatcat	gacattaacc	tataaaaata	3600
ggcgtatcac	gagggccctt	cgtctcgcgc	gtttcgggtga	tgacggtgaa	aacctctgac	3660
acatgcagct	cccggagacg	gtcacagctt	gtctgtaagc	ggatgccggg	agcagacaag	3720
cccgctcagg	cgcgctcagcg	ggtgttgggc	ggtgtcgggg	ctggcttaac	tatgcggcat	3780
cagagcagat	tgtactgaga	gtgcaccata	aattcccgtt	ttaagagctt	ggtgagcgct	3840
aggagtcact	gccaggatct	gtttgaacac	ggcattagtc	agggaagtca	taacacagtc	3900
ctttcccgca	attttctttt	tctattactc	ttggcctcct	ctagtacact	ctatatTTTT	3960
ttatgcctcg	gtaatgattt	tcattttttt	ttttccocta	gcggatgact	cttttttttt	4020
cttagcgatt	ggcattatca	cataatgaat	tatacattat	ataaagtaat	gtgatttctt	4080
cgaagaatat	actaaaaaat	gagcaggcaa	gataaacgaa	ggcaaagatg	acagagcaga	4140
aagccctagt	aaagcgtatt	acaaatgaaa	ccaagattca	gattgcgatc	tccttaaagg	4200
gtgggtccct	agcgatagag	cactcgatct	tcccagaaaa	agaggcagaa	gcagtagcag	4260
aacaggccac	acaatcgcaa	gtgattaacg	tccacacagg	tatagggttt	ctggaccata	4320
tgatacatgc	tctggccaag	cattccggct	ggtcgcta	cgttgagtgc	attggtgact	4380
tacacataga	cgaccatcac	accactgaag	actgcgggat	tgctctcggt	caagctttta	4440
aagaggccct	actggcgctg	ggagtaaaaa	ggtttggatc	aggatttgcg	cctttggatg	4500
aggcactttc	cagagcgggtg	gtagatcttt	cgaacaggcc	gtacgcagtt	gtcgaacttg	4560
gtttgcaaag	ggagaaagta	ggagatctct	cttgcgagat	gatcccgcat	tttcttgaaa	4620
gctttgcaga	ggctagcaga	attaccctcc	acgttgattg	tctgcgaggc	aagaatgatc	4680
atcaccgtag	tgagagtgcg	ttcaaggctc	ttgcggttgc	cataagagaa	gccacctcgc	4740
ccaatggtac	caacgatgtt	ccctccacca	aagggttct	tatgtagtga	caccgattat	4800
ttaaagctgc	agcatacgat	atatatacat	gtgtatatat	gtatacctat	gaatgtcagt	4860
aagtatgtat	acgaacagta	tgatactgaa	gatgacaagg	taatgcatca	ttctatacgt	4920
gtcattctga	acgaggcgcg	ctttcctttt	ttctttttgc	tttttctttt	tttttctctt	4980
gaactcgacg	gatctatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	5040
atcaggaaat	tgtaaacggt	aatatTTTgt	taaaattcgc	gttaaatttt	tgtaaataca	5100

gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga	5160
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg	5220
actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggccacta cgtgaacctat	5280
caccctaatac aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag	5340
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga	5400
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa	5460
ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgcgcg tacagggcgc gtgcgcgcat tcgccattca	5520
ggctgcgcaa ctggtgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg	5580
cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac	5640
gacgttgtaa aacgacggcc agtgagcgcg cgtaatacga ctactatag ggcgaattgg	5700
gtaccggggc cccctcgag gtcgacggta tcgataagct tgatatcgaa ttcctgcgcc	5760
cgggccaacta gtcagatgcc gcgggcactt gagcacctca tgcacagcaa taacacaaca	5820
caatggttag tagcaacctg aattcgggtca ttgatgcatg catgtgccgt gaagcgggac	5880
aaccagaaaa gtcgtctata aatgccggca cgtgcgatca tcgtggcggg gttttaagag	5940
tgcatatcac aaattgtcgc attaccgcgg aaccgccaga tattcattac ttgacgcaaa	6000
agcgtttgaa ataatgacga aaaagaagga agaaaaaaaa agaaaaatac cgcttctagg	6060
cgggttatct actgatccga gcttccacta ggatagcacc caaacacctg catatttgga	6120
cgacctttac ttacaccacc aaaaaccact ttcgcctctc ccgcccctga taacgtccac	6180
taattgagcg attacctgag cggctcctctt ttgtttgcag catgagactt gcatactgca	6240
aatcgtaagt agcaacgtct caaggtcaaa actgtatgga aaccttgtca cctcacttaa	6300
ttctagctag cctaccctgc aagtcaagag gtctccgtga ttcctagcca cctcaaggta	6360
tgctctccc cggaactgt ggccttttct ggcacacatg atctccacga tttcaacata	6420
taaatagctt ttgataatgg caatattaat caaatattt ttacttcttt cttgtaacat	6480
ctctcttgta atcccttatt ccttctagct atttttcata aaaaaccaag caactgctta	6540
tcaacacaca aactactaat caaagctgag gatggattta tttgagtcac tagcacaaaa	6600
aattactggg aaagatcaaa caattgtttt ccctgaagga actgaacccc gaattgtcgg	6660
tgccgcagcg cgattagctg cagacggctt ggtaagccg attgttttag gtgcaacgga	6720
caaagttcag gctgtggcta acgatttgaa tgcggattta acaggcggtc aagtccttga	6780
tcctgcgaca taccggctg aagataagca agcaatgctt gatgccctcg ttgaacggcg	6840
gaaaggtaag aatacgccag aacaagcggc taaatgctg gaagatgaaa actactttgg	6900
cacgatgctc gtttatatgg gcaaagcgga tgggatggtt tcaggtgcaa tccatccaac	6960

tggtgatacg	gtacggccag	cgttacaaat	tattaagacc	aagcccgggt	cacaccgaat	7020
ctcgggtgca	tttatcatgc	aaaaggggtga	ggaacgctac	gtctttgctg	actgtgccat	7080
caatattgat	cccgatgccg	atacgttagc	ggaaattgcc	actcagagtg	cggctactgc	7140
taaggtcttc	gatattgacc	cgaaagttgc	gatgctcagc	ttctcaacta	aggggttcggc	7200
taagggtgaa	atggtcacta	aagtgcaga	agcaacggcc	aaggcgcaag	ctgctgaacc	7260
ggaattggct	atcgatggtg	aacttcaatt	tgacgcggcc	ttcgttgaaa	aagttggttt	7320
gcaaaaggct	cctggttcca	aagtagctgg	tcatgccaat	gtctttgtat	ttccagagct	7380
tcagtctggt	aatattggct	ataagattgc	gcaacgattt	ggtcattttg	aagcgggtggg	7440
tcctgtcttg	caaggcctga	acaagccggg	ctccgacttg	tcacgtggat	gcagtgaaga	7500
agacgtttat	aaggttgcca	ttattacagc	agcccaagga	ttagcttaat	taattaagag	7560
taagcgaatt	tcttatgatt	tatgattttt	attattaaat	aagttataaa	aaaaataagt	7620
gtatacaaat	tttaaagtga	ctcttaggtt	ttaaaacgaa	aattcttatt	cttgagtaac	7680
tctttcctgt	aggtcaggtt	gctttctcag	gtatagcatg	aggtcgctct	tattgaccac	7740
acctctaccg	gcatgccgag	caaatgcctg	caaatcgctc	cccatttcac	ccaattgtag	7800
atatgctaac	tccagcaatg	agttgatgaa	tctcgggtgtg	tattttatgt	cctcagagga	7860
caacacctgt	ggtactagtt	ctagagcggc	cgcccgcaaa	ttaaagcctt	cgagcgtccc	7920
aaaaccttct	caagcaagggt	tttcagtata	atgttacatg	cgtacacgcg	tttgtaacaga	7980
aaaaaaagaa	aaatttgaaa	tataaataac	gttcttaata	ctaacataac	tattaaaaaa	8040
aataaatagg	gacctagact	tcagggtgtc	taactccttc	cttttcgggt	agagcgggatg	8100
tgggaggagg	gcgtgaatgt	aagcgtgaca	taactaatta	catgattaat	taattatttt	8160
aaacccttcc	attgccaatc	attaacttct	ggcaagtcag	ttccggcatc	ccggatatag	8220
gcattgtggt	tagcaagcat	attatccatg	gattgaacga	aggccgcacc	agtgttttcc	8280
attgctgggt	gcgccgcaat	tgccgactta	gctaagtcga	agcgggtccat	ctgggttcatg	8340
acccgtacgt	cgaatgggtg	ggtaatatca	ccattttcac	ggtaaccgtg	gacgtataag	8400
ttatggttgt	gacgatcaaa	gaagatgtca	cgaactaagt	cttcgtaacc	gtggaaagca	8460
aagaccactg	gtttgtcctt	agtaaagtaa	tggtcaaaact	cagcatctga	caagccccgc	8520
ggatcctttt	caggactacg	taacttcaag	atgtcgacca	cgttcacgaa	acgaatcttc	8580
atctctggga	aactgtcgtg	tagtaattgg	atggcagcca	acgtttcaag	cgttgggttcc	8640
gtcccagcag	ctgcaaagac	aatgtctggt	tcgctacctt	ggcccgtaact	tgcccaatca	8700
atgataccaa	gaccattgtc	aactaattgc	ttagcttctt	caatgctgaa	ccattgttga	8760
cgtgggtggt	ttgacgtaac	cacgtagttg	atcttttctt	ggctccggaa	aatgacgtca	8820
ccgacagcta	ataacgtggt	ggcatcggct	ggtaaatatt	cacgaatgta	ttctgggttct	8880

ttttcggcca	aatgagttaa	tgcacctgga	tcttggtggg	tataaccatt	atggtcttgt	8940
tggaatacag	ttgaagccgc	gataatgtta	agtgatgggt	actttttacg	ccaatcaagt	9000
tcattggcctt	tacgtaacca	cttgaagtgt	tgcgtcaaca	ttgagtccac	aacgcgtagg	9060
aaggcttcat	aactggcaaa	taacctatga	cgtccagtta	agacgtaacc	ttctaaccaa	9120
ccttcagcctt	ggtgttcaga	taactgagca	tctaagaccc	ggccagctgg	tgcttcatat	9180
tggtcactat	ctggatgaat	gtcttccatc	cattgacgat	tagtggtttc	gaagacacca	9240
tataaacggt	tagacatggt	ttcatcaggt	ccgaacaacc	ggaagttatc	aggatttttc	9300
ttgatgacat	cccgcaaata	gtctgaccaa	acgatcatat	cttgcttaac	attcgcgcct	9360
tctttggacg	tatcgaccgc	ataatcacgg	aagtttggtg	agttcaaggc	tttcggatcg	9420
acccaccat	tggtgattgg	gttagcagcc	atccgactgt	ccccagtagg	aataatttct	9480
ttaatatcat	ccttcaaaga	gccatcttca	ttgaagagtt	cttttggttg	atatgattcg	9540
agccaatcaa	ctaaagcatc	cgcatgttcc	atgtcatttt	gatcaacagg	aatcgggaatt	9600
tgatgagcac	ggaatgaacc	ttcgatctta	tcaccgtccc	atgacttcgg	accagtccag	9660
cccttaggtg	cgcggaagac	gatcattggc	catactggca	atgttgcata	gttattttcg	9720
cgagcatgct	tctggattgc	cttgatcttt	tcaacggctt	catccatggc	cttagctaag	9780
gctgggtgaa	ccttttcagg	atcgtcacct	tcaacgaaga	ttggttccca	attcatgctt	9840
tcgaagtatt	ccttaatctt	agcatcagaa	gtccgaccaa	aaatcgttgg	attagaaatc	9900
ttaaaaccat	ttaagttcaa	gattggtaaa	acagccccgt	cgttgattgg	gttaatgaac	9960
ttcgttgatt	gccatgaagt	tgctaattga	cccgtttcgg	attccccatc	accaacaaca	10020
accgcggcga	tttcgtcagg	attgtcaaga	attgccccaa	ccccgtgtga	aattgagtaa	10080
ccaagttcgc	caccttcgtg	gattgaaccg	ggtgtttcag	gtgccgcatg	ggaagcaacc	10140
ccacctggga	atgagaattg	cttgaagagc	ttttgcatcc	cttcaacatc	ctgcgtaatt	10200
tctggataaa	tatcgggtga	agtaccgtca	aggtaagagt	ttgaaaccat	cacttgacca	10260
ccatgacctg	gaccttcaac	gtagaacatc	ttcaaaccgt	acttgttgat	gacccggtta	10320
agatgagcat	agataaagtt	ttgaccggca	atcgtccccc	agtgaccaat	tggtatgaacc	10380
ttaacgtcac	tggccttcaa	tggccgttgt	aatagtggat	tatcttttaa	ataaagttga	10440
ccaactgata	agtagttggc	agcacgccag	tacttatcaa	ctttttgcaa	atatgctggt	10500
gatgagtaat	ctgttgctat	cctcagctgg	aacttagatt	agattgctat	gctttctctc	10560
taacgagcaa	gaagtaaaaa	aagttgtaat	agaacaagaa	aaatgaaact	gaagcttgag	10620
aaattgaaga	ccgtttatta	gcttaaatat	caatgggagg	tcatcgaaag	agaaaaaaat	10680
caagaaagaa	actctcaaga	aaaagaaacg	tgataaaaat	ttttattgcc	tctctcgacg	10740

ES 2 735 024 T3

	aagagaaaga aacgaggcgg tccctttttt cttttccaaa ccttttagtac gggtaattag	10800
	cgacacccta gaggaagaaa gaggggaaat ttagtatgct gtgcttgggt gtcttgaagt	10860
	ggtagcggcga tgcgcggagt ccgagaaaat ctggaagagt aaaaaggggg tagaagcggt	10920
	ttgaagctat ccgc	10934
	<210> 171	
	<211> 80	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> N1341	
	<400> 171	
	gttgcaagaa atgcattatg caattttttg attatgacaa tctctcgaaa atagcttcaa	60
	aacgcttcta cccctttttt	80
10	<210> 172	
	<211> 80	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> N1338	
	<400> 172	
	catacattat acgaacggta ctgaacatta gaatacgtaa tccgcaatgc ccgcaaatta	60
	aagccttcga gcgtcccaaa	80
	<210> 173	
	<211> 30	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> N1033c	
	<400> 173	
25	gcattgcgga ttacgtattc taatgttcag 30	
	<210> 174	
	<211> 81	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> N1342	
	<400> 174	
	acatatgtga aaaaaaatag ttgatatttt aaaccaaata agaaatttat caccttggct	60
	aactcgttgt atcatcactg g	81
	<210> 175	
35	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223>	N1364	
	<400>	175	
		atgacaacag attactcatc accagcatat	30
5	<210>	176	
	<211>	604	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	L8	
10	<400>	176	
		gcctacttgg cttcacatac gttgcatacg acgatataga aaataatgat aatgacagca	60
		ggattatcgt ataacgtaat agtcgaaaaa tctcaaaaat ctgtgggtca ttacgtaaat	120
		aatgatagga atgtgattct tctatTTTTTc cTTTTTccat tctggcagcc gtcgggaaaa	180
		cgtggcttcc tctcttttcgg gctctatttg agtaacgctg ccgtgagctt cctctctttc	240
		catatctaac aactgagcac gtaaccaatg gtaaagcatg agcttagcgt tgctccaaag	300
		aagtattgga aggttaatac catgtgtctg ttctcttctg actttgactc ctcaaataaa	360
		aaaaaattct acaatcaaca gatcgcttca attacgctct cacaaaaact tttttccttc	420
		ttcttcgccc acgttaaatt ttaaccctca tgctgtctaa cggatttctg cacttaattt	480
		attataaaac gacaaagaca taatacttct ctatcaattt cagttattgt tcttcattgc	540
		attactcttc tgttcttctt tttcatttgt catatacaac cataaccaa taatacatat	600
		tcaa	604
	<210>	177	
	<211>	80	
	<212>	ADN	
15	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	N1366	
	<400>	177	
		gttgcaagaa atgcattatg caattttttg attatgacaa tctctcgaaa gcctacttgg	60
		cttcacatac gttgcatacg	80
20	<210>	178	
	<211>	65	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
25	<223>	N1368	
	<400>	178	
		atatgctggg gatgagtaat ctgttgcatt tttgaatatg tattatttgg ttatggttgt	60
		atatg	65
	<210>	179	
	<211>	80	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> N1371
 5 <400> 179
 aaaaactaat acgtaaacct gcattaaggt aagattatat cagaaaatgt gttgcaagaa 60
 atgcattatg caattttttg 80
 <210> 180
 <211> 85
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> N1372
 <400> 180
 tagaagctaa tctttaacct ggaagacagg acagaaaagt aattacaaga acatatgtga 60
 aaaaaaatag ttgatatttt aaacc 85
 15 <210> 181
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> BK93
 <400> 181
 aaaaattgat tctcatcgta aatgc 25
 <210> 182
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> N1114
 <400> 182
 30 atatgctggg gatgagtaat ctgtgtcat 30
 <210> 183
 <211> 6728
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> pJT254
 <400> 183

tgcgcgcttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgcgtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accataaatt cccgttttaa gagcttgggtg agcgctagga gtcactgcca ggtatcgttt	240
gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt cccgcaattt tctttttcta	300
ttactcttgg ctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa tgattttcat	360
tttttttttt cccctagcgg atgactcttt ttttttctta gcgattggca ttatcacata	420
atgaattata cattatataa agtaatgtga tttcttcgaa gaatatacta aaaaatgagc	480
aggcaagata aacgaaggca aagatgacag agcagaaagc cctagtaaag cgtattacaa	540
atgaaaccaa gattcagatt gcgatctctt taaaggggtg tcccctagcg atagagcact	600
cgatcttccc agaaaaagag gcagaagcag tagcagaaca ggccacacaa tcgcaagtga	660
ttaacgtcca cacaggtata gggtttctgg accatatgat acatgctctg gccaagcatt	720
cgggctggtc gctaatcggt gagtgcattg gtgacttaca catagacgac catcacacca	780
ctgaagactg cgggattgct ctcggtcaag ctttttaaaga ggcctactg gcgcgtggag	840
taaaaagggt tggatcagga tttgcgcctt tggatgaggc actttccaga gcggtggtag	900
atcttttcgaa caggccgtac gcagttgtcg aacttggttt gcaaaggag aaagtaggag	960
atctctcttg cgagatgatc ccgcattttc ttgaaagctt tgcagaggct agcagaatta	1020
ccctccacgt tgattgtctg cgaggcaaga atgatcatca ccgtagttag agtgcgttca	1080
aggctcttgc ggttgccata agagaagcca cctcgcccaa tggtagcaac gatgttccct	1140
ccaccaaagg tgttcttatg tagtgacacc gattatttaa agctgcagca tacgatatat	1200
atacatgtgt atatatgtat acctatgaat gtcagtaagt atgtatacga acagtatgat	1260
actgaagatg acaaggtaat gcatcattct atacgtgtca ttctgaacga ggcgcgcttt	1320
ccttttttct ttttgctttt tctttttttt tctcttgaac tcgacggatc tatgcggtgt	1380
gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggaaattgta aacgttaata	1440
ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg	1500
aaatcgga aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtggtgttc	1560
cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa	1620
cogtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt	1680

cgaggtgccg	taaagcacta	aatcggaacc	ctaaagggag	cccccgattt	agagcttgac	1740
ggggaaagcc	ggcgaacgtg	gcgagaaagg	aaggggaagaa	agcgaaagga	gcgggcgcta	1800
gggcgctggc	aagtgtagcg	gtcacgctgc	gcgtaaccac	cacacccgcc	gcgcttaatg	1860
cgccgctaca	gggcgctcg	cgccattcgc	cattcaggct	gcgcaactgt	tgggaagggc	1920
gatcggtgcg	ggcctcttcg	ctattacgcc	agctggcgaa	agggggatgt	gctgcaaggc	1980
gattaagttg	ggtaacgcc	gggttttccc	agtcacgacg	ttgtaaaacg	acggccagtg	2040
agcgcgcgta	atacgactca	ctatagggcg	aattgggtac	cgggccccc	ctcgaggtcg	2100
acggtatcga	taagcttgat	tagaagccgc	cgagcgggcg	acagccctcc	gacggaagac	2160
tctcctccgt	gcgtcctcgt	cttcaccggt	cgcgttcctg	aaacgcagat	gtgcctcgcg	2220
ccgcactgct	ccgaacaata	aagattctac	aatactagct	tttatggtta	tgaagaggaa	2280
aaattggcag	taacctggcc	ccacaaacct	tcaaattaac	gaatcaaatt	aacaaccata	2340
ggatgataat	gcgattagtt	ttttagcctt	atttctgggg	taattaatca	gcgaagcgat	2400
gatttttgat	ctattaacag	atatataaat	ggaaaagctg	cataaccact	ttaactaata	2460
ctttcaacat	tttcagtttg	tattacttct	tattcaaagt	tcataaaagt	atcaacaaaa	2520
aattgttaat	atacctctat	actttaacgt	caaggagaaa	aatgtccaat	ttactgcccg	2580
tacacaaaaa	tttgcctgca	ttaccggtcg	atgcaacgag	tgatgagggt	cgcaagaacc	2640
tgatggacat	gttcagggat	cgccaggcgt	tttctgagca	tacctggaaa	atgcttctgt	2700
ccgtttgccg	gtcgtgggcg	gcatggtgca	agttgaataa	ccggaaatgg	tttccgcgag	2760
aacctgaaga	tgttcgcgat	tatcttctat	atcttcaggc	gcgcggtctg	gcagtaaaaa	2820
ctatccagca	acatttgggc	cagctaaaca	tgcttcacog	tcgggtccggg	ctgccacgac	2880
caagtgacag	caatgctggt	tactgggtta	tgccggcgat	ccgaaaagaa	aacgttgatg	2940
ccggtgaacg	tgcaaaacag	gctctagcgt	tcgaacgcac	tgatttcgac	cagggttcgtt	3000
cactcatgga	aaatagcgat	cgctgccagg	atatacgtaa	tctggcattt	ctggggattg	3060
cttataaac	cctgttacgt	atagccgaaa	ttgccaggat	cagggttaaa	gatatctcac	3120
gtactgacgg	tgggagaatg	ttaatccata	ttggcagaac	gaaaacgctg	gtagcaccg	3180
cagggtgtaga	gaaggcactt	agcctggggg	taactaaact	ggtcgagcga	tggatttccg	3240
tctctggtgt	agctgatgat	ccgaataact	acctgttttg	ccgggtcaga	aaaaatggtg	3300
ttgccgcgcc	atctgccacc	agccagctat	caactogcgc	cctggaaggg	atthttgaag	3360
caactcatcg	attgatttac	ggcgctaagg	atgactctgg	tcagagatac	ctggcctggt	3420
ctggacacag	tgcccgtgtc	ggagccgcgc	gagatatggc	ccgcgctgga	gtttcaatac	3480
cggagatcat	gcaagctggt	ggctggacca	atgtaaatat	tgtcatgaac	tatatccgta	3540
acctggatag	tgaacaggg	gcaatggtgc	gcctgctgga	agatggcgat	taggagtaag	3600

cgaatttctt atgatttatg atttttatta tttaaataagt tataaaaaaa ataagtgtat	3660
acaaatttta aagtgactct taggttttaa aacgaaaatt cttattcttg agtaactctt	3720
tcctgtaggt caggttgctt tctcaggtat agcatgaggt cgctcttatt gaccacacct	3780
ctaccggcat gccgagcaaa tgcctgcaaa tcgctcccca tttcacccaa ttgtagatat	3840
gctaactcca gcaatgagtt gatgaatctc ggtgtgtatt ttatgtcctc agaggacaac	3900
acctgtggtg ttctagagcg gccgccaccg cgggtggagct ccagcttttg ttccctttag	3960
tgagggttaa ttgcgcgctt ggcgtaatca tgggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt	4020
tatccgctca caattccaca caacatagga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt	4080
gcctaatagag tgaggtaact cacattaatt gcgttgcgct cactgccgcg tttccagtcg	4140
ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcgggttg	4200
cgtattgggc gctcttccgc ttctcgctc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg	4260
cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga atcaggggat	4320
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc	4380
gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc	4440
tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga	4500
agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccgatacct gtccgccttt	4560
ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg	4620
taggtcgctt gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc	4680
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg	4740
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc	4800
ttgaagtggc ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg	4860
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaacacc	4920
gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct	4980
caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt	5040
taagggattt tggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa	5100
aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa	5160
tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac catagttgcc	5220
tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct	5280
gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca	5340
gccggaaggg ccgagcgag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt	5400
aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt	5460

gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc 5520
 ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc 5580
 tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatgggt 5640
 atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 5700
 ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 5760
 ccggcgctcaa tacgggataa taccgcgccca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 5820
 ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 5880
 atgtaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 5940
 ggggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 6000
 tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 6060
 ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 6120
 acatttcccc gaaaagtgcc acctgggtcc ttttcatcac gtgctataaa aataattata 6180
 atttaaat ttttaataaa atatataaat taaaaataga aagtaaaaaa agaaattaaa 6240
 gaaaaaatag tttttgtttt ccgaagatgt aaaagactct agggggatcg ccaacaaata 6300
 ctacctttta tcttgctctt cctgctctca ggtattaatg ccgaattgtt tcatcttgtc 6360
 tgtgtagaag accacacacg aaaatcctgt gattttacat ttactttatc gttaatcgaa 6420
 tgtatatcta tttaatctgc ttttcttgtc taataaatat atatgtaaag tacgcttttt 6480
 gttgaaat ttttaacctt tgtttat tttttcttca ttccgtaact cttctacctt 6540
 ctttattttac tttctaaaat ccaaatacaa aacataaaaa taaataaaca cagagtaaat 6600
 tcccaaatta ttccatcatt aaaagatacg aggcgcgtgt aagttacagg caagcgatcc 6660
 gtcctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc 6720
 ctttcgtc 6728

<210> 184

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> N160Seq F5

<400> 184

cctgaagtct aggtccctat tt 22

10 <210> 185

<211> 1650

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Amn1

<400> 185

ES 2 735 024 T3

atgaagctgg agcgctgag ttctaacggg agctttaagc gtggccgtga catccaaagt	60
ttggagagtc cgtgtacccg cccattaaag aaaatgtcgc catcaccttc atttacgagc	120
ctgaagatgg aaaaaccggt taaggacatt gttcgaaaat acgggggtca cctgcaccag	180
tcctcgtata acccagggtc ttcaaaagtt gaactcgtgc gtccggacct gagcttgaaa	240
acggaccaat catttttgca gagcagcgtg cagacaaccc cgaacaaaaa gagttgtaac	300
gagtatctgt ccacaccgga agccactccc cttaagaaca cggccaccga gaatgcgtgg	360
gctacgtcaa ggggtggtgag cgcataaagc ctgtcaatcg tcacgccgac cgaatatcaa	420
aatatactgg ttgacgagtt tagtgaacta aaacttggtc agcccttaac agcccagcac	480
caacggagcc atgcagtttt cgagatacct gagatcgtag agaacataat caagatgac	540
gtttccctcg agagcgccaa tattccgaaa gaacgtccgt gcctgcgtcg caaccgcgag	600
agttatgagc attcccttct gatgtataaa gacgaggaac gcgcgaagaa agcatggtcc	660
gcggctcaac aactgcgcga tccgccgctg gtgggtcata aggaaaaaaa acagggcgct	720
ctgttttagct gcatgatggt caaccgcctg tgggtgaatg tcacgcgtcc gttcttattt	780
aagtctctgc atttcaaac agtgcacaac ttcaaagaat ttctgcgcac aagtcaggaa	840
accacgcaag tgatgaggcc atcgcacttt atcctgcata aattgcacca ggtaacgcag	900
ccgatattg agagactgtc tagaatggaa tgccagaacc tcaagtggtt ggaattttat	960
gtatgtcccc gtattacacc tccactgtct tgggtcgaca atttgcataa gttagaaaaa	1020
ttaatcatcc ccggaacaa gaatatcgac gataatttcc tcttacggct gtctcagagt	1080
attcctaacc tgaaacacct cgtgcttcgt gcttgcgaca atgtttccga tagtggtgta	1140
gtttgtatcg ccctgaactg ccctaagctg aagacgttca acatcggacg tcatcgccgc	1200
ggcaatctga ttacatcagt tagcttggtt gccctgggta agtatacgca agttgagacc	1260
gttggttttg caggctgcga tgtggacgac gcaggcatat gggagttcgc gcgtttaaac	1320
gggaaaaacg tcgagcgcct gtcactcaac agttgccggc ttttaaccga ctatagcttg	1380
ccaatcctgt ttgcccttaa tagtttcccg aaccttgccg tgttggaat tcgaaacctc	1440
gataaaatta cagatgtccg ccattttgtg aaatataatc tgtggaagaa atcactggat	1500
gtccttatcc tgattgaggc gtgcgaacgc ataacaaagc tgattgatca ggaagagaac	1560
cgggtcaaac gcataaatag cctggtcgct ttaaaggata tgaccgcgtg ggtgaacgct	1620
gacgatgaaa ttgaaaacaa cgtcgattga	1650

<210> 186

<211> 549

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amn1

<400> 186

ES 2 735 024 T3

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

Leu Arg Asp Pro Pro Leu Val Gly His Lys Glu Lys Lys Gln Gly Ala
 225 230 235 240
 Leu Phe Ser Cys Met Met Val Asn Arg Leu Trp Leu Asn Val Thr Arg
 245 250 255
 Pro Phe Leu Phe Lys Ser Leu His Phe Lys Ser Val His Asn Phe Lys
 260 265 270
 Glu Phe Leu Arg Thr Ser Gln Glu Thr Thr Gln Val Met Arg Pro Ser
 275 280 285
 His Phe Ile Leu His Lys Leu His Gln Val Thr Gln Pro Asp Ile Glu
 290 295 300
 Arg Leu Ser Arg Met Glu Cys Gln Asn Leu Lys Trp Leu Glu Phe Tyr
 305 310 315 320
 Val Cys Pro Arg Ile Thr Pro Pro Leu Ser Trp Phe Asp Asn Leu His
 325 330 335
 Lys Leu Glu Lys Leu Ile Ile Pro Gly Asn Lys Asn Ile Asp Asp Asn
 340 345 350
 Phe Leu Leu Arg Leu Ser Gln Ser Ile Pro Asn Leu Lys His Leu Val
 355 360 365
 Leu Arg Ala Cys Asp Asn Val Ser Asp Ser Gly Val Val Cys Ile Ala
 370 375 380
 Leu Asn Cys Pro Lys Leu Lys Thr Phe Asn Ile Gly Arg His Arg Arg
 385 390 395 400
 Gly Asn Leu Ile Thr Ser Val Ser Leu Val Ala Leu Gly Lys Tyr Thr
 405 410 415
 Gln Val Glu Thr Val Gly Phe Ala Gly Cys Asp Val Asp Asp Ala Gly
 420 425 430
 Ile Trp Glu Phe Ala Arg Leu Asn Gly Lys Asn Val Glu Arg Leu Ser
 435 440 445
 Leu Asn Ser Cys Arg Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Leu Pro Ile Leu Phe
 450 455 460
 Ala Leu Asn Ser Phe Pro Asn Leu Ala Val Leu Glu Ile Arg Asn Leu
 465 470 475 480

ES 2 735 024 T3

Asp Lys Ile Thr Asp Val Arg His Phe Val Lys Tyr Asn Leu Trp Lys
485 490 495

Lys Ser Leu Asp Ala Pro Ile Leu Ile Glu Ala Cys Glu Arg Ile Thr
500 505 510

Lys Leu Ile Asp Gln Glu Glu Asn Arg Val Lys Arg Ile Asn Ser Leu
515 520 525

Val Ala Leu Lys Asp Met Thr Ala Trp Val Asn Ala Asp Asp Glu Ile
530 535 540

Glu Asn Asn Val Asp
545

<210> 187

<211> 6638

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pLA67

<400> 187

aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat	60
gttcttttctt gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc	120
tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga ggcgcagcag tcagtgcagc aggaagcgga	180
agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg	240
gcacgcacag tttcccgact ggaaagcggg cagtgcagcgc aacgcaatta atgtgagtta	300
gctcactcat taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg	360
aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct	420
tgcatgcctg caggtcgact ctagaggatc cgcattgcgg attacgtatt ctaatgttca	480
gtaccgttcg tataatgtat gctatacgaa gttatgcaga ttgtactgag agtgcaccat	540
accacagctt ttcaattcaa ttcattcattt tttttttatt cttttttttg atttcggttt	600
ctttgaaatt tttttgattc ggtaattctcc gaacagaagg aagaacgaag gaaggagcac	660
agacttagat tggatatatat acgcatatgt agtggtgaag aaacatgaaa ttgcccagta	720
ttcttaaccc aactgcacag aacaaaaacc tgcaggaaac gaagataaat catgtcgaaa	780
gctacatata aggaacgtgc tgctactcat cctagtcctg ttgctgcaa gctatttaat	840
atcatgcacg aaaagcaaac aaacttgtgt gcttcattgg atgttcgtac caccaaggaa	900
ttactggagt tagttgaagc attaggtccc aaaatttggt tactaaaaac acatgtggat	960
atcttgactg atttttccat ggagggcaca gttaagccgc taaaggcatt atccgccaag	1020

tacaatTTTT	tactcttcga	agacagaaaa	tttgctgaca	ttggtaatac	agtcaaattg	1080
cagtactctg	cgggtgtata	cagaatagca	gaatgggcag	acattacgaa	tgcacacggt	1140
gtggtgggcc	caggtattgt	tagcggtttg	aagcaggcgg	cagaagaagt	aacaaaggaa	1200
cctagaggcc	ttttgatgtt	agcagaattg	tcattgcaagg	gctccctatc	tactggagaa	1260
tatactaagg	gtactgttga	cattgcgaag	agcgacaaaag	atTTTgttat	cggctttatt	1320
gctcaaagag	acatgggtgg	aagagatgaa	ggttacgatt	ggttgattat	gacacccggt	1380
gtgggttttag	atgacaaggg	agacgcattg	ggtcaacagt	atagaaccgt	ggatgatgtg	1440
gtctctacag	gatctgacat	tattattgtt	ggaagaggac	tatttgcaaa	gggaagggat	1500
gctaaggtag	aggggtgaacg	ttacagaaaa	gcaggctggg	aagcatattt	gagaagatgc	1560
ggccagcaaa	actaaaaaac	tgtattataa	gtaaatgcat	gtataactaaa	ctcacaaatt	1620
agagcttcaa	tttaattata	tcagttatta	ccctatgcgg	tgtgaaatac	cgcacagatg	1680
cgtaaggaga	aaataccgca	tcaggaaatt	gtaaacgtta	atattttgtt	aaaattcgcg	1740
ttaaatTTTT	gttaaatcag	ctcattTTTT	aaccaatagg	ccgaaatcgg	caaaatccct	1800
tataaatcaa	aagaatagac	cgagataggg	ttgagtgttg	ttccagtttg	gaacaagagt	1860
ccactattaa	agaacgtgga	ctccaacgtc	aaagggcgaa	aaaccgtcta	tcagggcgat	1920
ggccactac	gtgaaccatc	accctaatac	agataacttc	gtataatgta	tgctatacga	1980
acggtaccag	tgatgataca	acgagttagc	caagggtgaat	tcgacttagg	atgtctcatc	2040
aatcatctta	ttcctgctgg	tgttttttgt	atcgcccttg	cttgaggagt	ttatgcttgt	2100
cctttgttca	gtaaccattc	ttcaagtttg	tttcaagtag	taggatacct	tcagatatac	2160
gaaagaaagg	gagtatagtt	gtggatatat	atatatatag	caacccttct	ttataagggt	2220
cctatagact	atactcttca	cactttaaag	tacggaatta	aggcccaagg	gaactaacia	2280
aaacgttcaa	aaagttttaa	aactatatgt	gttaactgta	caaaaataac	ttatttatca	2340
tatcattttt	ttctctgttt	atttcttcta	gaacttatac	ctgtcttttc	cttttattct	2400
ttgaatttgk	tttaatatcc	ctttttgktt	taatatccat	ccattccttt	cacttagaac	2460
taataattcc	cttcgtttga	taatttatca	ttttcctttt	ctgttagtaa	agtacccatt	2520
aatgaagct	ggagcgcgtg	agttctaacg	ggagctttaa	gogtggccgt	gacatccaaa	2580
gtttggagag	tccgtgtacc	cgcccattaa	agaaaatgtc	gccatcacct	tcattttacga	2640
gcctgaagat	ggaaaaaccg	tttaaggaca	ttgttcgaaa	atacgggggt	cacctgcacc	2700
agtcctcgta	taaccacggt	tcttcaaaaag	ttgaactcgt	gogtccggac	ctgagcttga	2760
aaacggacca	atcatttttg	cagagcagcg	tgacagacaac	cccgaacaaa	aagagttgta	2820
acgagtatct	gtccacaccc	gaagccactc	cccttaagaa	cacggccacc	gagaatgcgt	2880

gggctacgtc	aaggggtggtg	agcgcaccaa	gcctgtcaat	cgtcacgccg	accgaaatca	2940
aaaatatact	ggttgacgag	tttagtgaac	taaaacttgg	tcagccctta	acagcccagc	3000
accaacggag	ccatgcagtt	ttcgagatac	ctgagatcgt	agagaacata	atcaagatga	3060
tcgtttccct	cgagagcgcc	aatattccga	aagaacgtcc	gtgcctgcgt	cgcaacccgc	3120
agagttatga	gcattccctt	ctgatgtata	aagacgagga	acgcgcgaag	aaagcatggt	3180
ccgcggtctca	acaactgcgc	gatccgccgc	tgggtgggtca	taaggaaaaa	aaacagggcg	3240
ctctgttttag	ctgcatgatg	gtcaaccgcc	tgtggttgaa	tgtcacgcgt	ccgttcttat	3300
ttaagtctct	gcatttcaaa	tcagtgcaca	acttcaaaga	atttctgcgc	acaagtcagg	3360
aaaccacgca	agtgatgagg	ccatcgcaact	ttatcctgca	taaattgcac	caggtaacgc	3420
agccggatat	tgagagactg	tctagaatgg	aatgccagaa	cctcaagtgg	ttggaatttt	3480
atgtatgtcc	ccgtattaca	cctccactgt	cttggttcga	caatttgcat	aagttagaaa	3540
aattaatcat	ccccgaaac	aagaatatcg	acgataattt	cctcttacgg	ctgtctcaga	3600
gtatttcctaa	cctgaaacac	ctcgtgcttc	gtgcttgcca	caatgtttcc	gatagtgggtg	3660
tagtttgtat	cgccctgaac	tgccctaagc	tgaagacggt	caacatcgga	cgtcatcgcc	3720
gcggaatct	gattacatca	gtagcttgg	ttgccctggg	taagtatacg	caagttgaga	3780
ccgttgggtt	tgcaggctgc	gatgtggacg	acgcaggcat	atgggagttc	gcgcgtttta	3840
acgggaaaaa	cgtcgagcgc	ctgtcactca	acagttgccg	gcttttaacc	gactatagct	3900
tgccaatcct	gtttgccctt	aatagtttcc	cgaaccttgc	ggtgttgga	attcgaaacc	3960
tcgataaaat	tacagatgtc	cgccattttg	tgaaatataa	tctgtggaag	aaatcactgg	4020
atgctcctat	cctgattgag	gcgtgcgaac	gcataacaaa	gctgattgat	caggaagaga	4080
accgggtcaa	acgcataaat	agcctggtcg	ctttaaagga	tatgaccgcg	tgggtgaacg	4140
ctgacgatga	aattgaaaac	aacgtcgatt	gagacgatga	aattgaaaac	aacgtcgatt	4200
gaggtaccat	ggtttttgtg	actttacctt	taaatagtac	acaacagacc	accagtaatt	4260
ctacacactt	cttaactgat	aatattatta	taattgtaac	tttttagcag	cactaaattt	4320
aatgaataca	tagattttta	actagcattt	tactattctg	tactttttac	ttgaaattcc	4380
agaagggccg	aagaaaccag	aattccttca	cagaaaacga	attcactggc	cgtcgtttta	4440
caacgtcgtg	actgggaaaa	ccctggcggt	acccaactta	atcgcccttc	agcacatccc	4500
cctttcgcca	gctggcgtaa	tagcgaagag	gcccgcaccg	atcgcccttc	ccaacagttg	4560
cgcagcctga	atggcgaatg	gcgcctgatg	cggatatttt	tccttacgca	tctgtgcggt	4620
atttcacacc	gcataatggtg	cactctcagt	acaatctgct	ctgatgccgc	atagttaagc	4680
cagccccgac	accgcgaac	accgctgac	gcgcctgac	gggcttgtct	gctcccggca	4740
tccgcttaca	gacaagctgt	gaccgtctcc	gggagctgca	tgtgtcagag	gttttcaccg	4800

ES 2 735 024 T3

tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac gcctatTTTT ataggTTaat	4860
gtcatgataa taatggTTtc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga	4920
accctatTTt gTTtattTTt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa	4980
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt	5040
gtcgccctta ttccctTTTT tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca ccagaaaacg	5100
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg	5160
gatctcaaca gcggtaaagt ccttgagagt tttcgccccg aagaacgTTt tccaatgatg	5220
agcactTTta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag	5280
caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttggt ttgagtactc accagtcaca	5340
gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg	5400
agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc	5460
gctTTTTtgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttgggg accggagctg	5520
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg	5580
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac	5640
tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg	5700
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg	5760
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact	5820
atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggTgcct cactgattaa gcattggtaa	5880
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt	5940
aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag	6000
ttttcgTTcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct	6060
ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggTggtt	6120
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg	6180
cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct	6240
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc	6300
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcg	6360
tcgggctgaa cggggggTtc gtgcacacag ccagcttggt agcgaacgac ctacaccgaa	6420
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg	6480
gacaggtatc cggtaaagcg cagggctcga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg	6540
ggaaacgcct ggtatctTTa tagtcctgtc gggTTtcgcc acctctgact tgagcgtcga	6600
tttttTgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaa	6638

<210> 188
 <211> 100
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LA712

<400> 188

cttaattgaa agaaagaatt tccttcaact tcggtttcct ggttccgcta tttctcgctt 60

5 gtttcttcta gcattgcgga ttacgtattc taatgttcag 100

<210> 189

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> LA746

<400> 189

gtttctgtg aaggaattct ggttcttcg 30

<210> 190

15 <211> 66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 190

Arg Val Thr Met Trp Val Phe Glu Glu Asp Ile Gly Gly Lys Lys Leu

1 5 10 15

Thr Glu Ile Ile Asn Thr Gln His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Gly

20 25 30

His Lys Leu Pro Pro Asn Val Val Ala Val Pro Asp Val Val Gln Ala

35 40 45

Ala Glu Asp Ala Asp Ile Leu Ile Phe Val Val Pro His Gln Phe Ile

50 55 60

Gly Lys

65

20 <210> 191

<211> 66

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 191

Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu Lys Leu

1 5 10 15

25

ES 2 735 024 T3

Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro Gly
20 25 30

Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile Asp Ser
35 40 45

Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu
50 55 60

Pro Arg
65

<210> 192

<211> 60

<212> PRT

5 <213> Rickettsia prowazekii

<400> 192

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

Tyr Lys Lys Thr Asn Ala Gln Tyr Leu Gly Asp Ile Glu Leu Pro Thr
20 25 30

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

Ile Ile Ile Ala Val Pro Ser Tyr Ala Phe Asp Asp
50 55 60

<210> 193

<211> 61

10 <212> PRT

<213> Beggiatoa alba

<400> 193

Pro Ile Tyr Leu Trp Gly Lys Asp Pro Ala His Val His Thr Leu Gln
1 5 10 15

Ile Gln Arg Cys Asn Gln Arg Phe Leu Pro Asn Ala Val Phe Pro Asp
20 25 30

Asn Leu Tyr Ala Ile Thr Asp Phe Val Thr Leu Met Pro Ile Val Glu
35 40 45

Asp Ile Ile Ile Val Val Pro Ser His Gly Phe Arg Glu
50 55 60

<210> 194

15 <211> 61

<212> PRT

<213> Kangiella koreensis

<400> 194

ES 2 735 024 T3

Ser Val Gln Leu Trp Ala Arg Asn Ser Gln His Val Val Glu Met Gln
1 5 10 15

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

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

Ile Ile Leu Val Ala Val Pro Ser His Ala Phe Arg Asp
50 55 60

<210> 195

<211> 391

<212> PRT

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 195

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

ES 2 735 024 T3

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

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 196

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F73G

<400> 196

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Gly Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
180 185 190

ES 2 735 024 T3

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 197

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F73A

<400> 197

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn

ES 2 735 024 T3

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

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 198

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F73R

<400> 198

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Arg Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu

ES 2 735 024 T3

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

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 199

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F73K

<400> 199

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Lys Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His

ES 2 735 024 T3

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

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 200

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F129G

<400> 200

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Gly Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly

ES 2 735 024 T3

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

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 201

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F129A

<400> 201

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

260

265

270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 202

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F129R

<400> 202

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

325

330

335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 203

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F129K

<400> 203

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Lys Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

ES 2 735 024 T3

Val	Arg	Ala	Ile	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly	Phe	Glu	Val	Gly	Ala	Lys	Gly	145	150	155	160
Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ile	Thr	Glu	Glu	Leu	Gly	Ile	Gln	Cys	165	170	175	
Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Ala	Thr	Glu	Val	Ala	Gln	Glu	His	180	185	190	
Trp	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	His	Ile	Pro	Lys	Asp	Phe	Arg	Gly	195	200	205	
Glu	Gly	Lys	Asp	Val	Asp	His	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	His	Arg	210	215	220	
Pro	Tyr	Phe	His	Val	Ser	Val	Ile	Glu	Asp	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Ile	225	230	235	240
Cys	Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Cys	Gly	Phe	Val	Glu	245	250	255	
Gly	Leu	Gly	Trp	Gly	Asn	Asn	Ala	Ser	Ala	Ala	Ile	Gln	Arg	Val	Gly	260	265	270	
Leu	Gly	Glu	Ile	Ile	Arg	Phe	Gly	Gln	Met	Phe	Phe	Pro	Glu	Ser	Arg	275	280	285	
Glu	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Leu	Ile	Thr	290	295	300	
Thr	Cys	Ala	Gly	Gly	Arg	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Arg	Leu	Met	Ala	Thr	305	310	315	320
Ser	Gly	Lys	Asp	Ala	Trp	Glu	Cys	Glu	Lys	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Gln	325	330	335	
Ser	Ala	Gln	Gly	Leu	Ile	Thr	Cys	Lys	Glu	Val	His	Glu	Trp	Leu	Glu	340	345	350	
Thr	Cys	Gly	Ser	Val	Glu	Asp	Phe	Pro	Leu	Phe	Glu	Ala	Val	Tyr	Gln	355	360	365	
Ile	Val	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Pro	Met	Lys	Asn	Leu	Pro	Asp	Met	Ile	Glu	370	375	380	
Glu	Leu	Asp	Leu	His	Glu	Asp										385	390		

ES 2 735 024 T3

<210> 204
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> F73A F129G

<400> 204

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
 1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
 20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
 35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
 50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Ala Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
 65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
 85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
 100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
 115 120 125

Gly Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205

ES 2 735 024 T3

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 205

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F73A F129A

<400> 205

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 206

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F73A F129R

<400> 206

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Ala Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 207

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F73A F129K

<400> 207

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Ala Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Lys Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

ES 2 735 024 T3

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
 210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
 225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
 245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
 260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
 275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
 290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
 305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
 325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
 340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
 355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
 370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
 385 390

ES 2 735 024 T3

<210> 208
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> F73G F129G

<400> 208

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
 1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
 20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
 35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
 50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Gly Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
 65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
 85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
 100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
 115 120 125

Gly Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205

ES 2 735 024 T3

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 209

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F73G F129A

<400> 209

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 210

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F73G F129R

<400> 210

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Gly Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

ES 2 735 024 T3

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
 85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
 100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
 115 120 125

Arg Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
 210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
 225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
 245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
 260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
 275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
 290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
 305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
 325 330 335

ES 2 735 024 T3

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 211

<211> 390

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F73G F129K

<400> 211

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Gly Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Lys Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

ES 2 735 024 T3

Val	Arg	Ala	Ile	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly	Phe	Glu	Val	Gly	Ala	Lys	Gly	145	150	155	160
Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ile	Thr	Glu	Glu	Leu	Gly	Ile	Gln	Cys	165	170	175	
Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Ala	Thr	Glu	Val	Ala	Gln	Glu	His	180	185	190	
Trp	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	His	Ile	Pro	Lys	Asp	Phe	Arg	Gly	195	200	205	
Glu	Gly	Lys	Asp	Val	Asp	His	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	His	Arg	210	215	220	
Pro	Tyr	Phe	His	Val	Ser	Val	Ile	Glu	Asp	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Ile	225	230	235	240
Cys	Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Cys	Gly	Phe	Val	Glu	245	250	255	
Gly	Leu	Gly	Trp	Gly	Asn	Asn	Ala	Ser	Ala	Ala	Ile	Gln	Arg	Val	Gly	260	265	270	
Leu	Gly	Glu	Ile	Ile	Arg	Phe	Gly	Gln	Met	Phe	Phe	Pro	Glu	Ser	Arg	275	280	285	
Glu	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Leu	Ile	Thr	290	295	300	
Thr	Cys	Ala	Gly	Gly	Arg	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Arg	Leu	Met	Ala	Thr	305	310	315	320
Ser	Gly	Lys	Asp	Ala	Trp	Glu	Cys	Glu	Lys	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Gln	325	330	335	
Ser	Ala	Gln	Gly	Leu	Ile	Thr	Cys	Lys	Glu	Val	His	Glu	Trp	Leu	Glu	340	345	350	
Thr	Cys	Gly	Ser	Val	Glu	Asp	Phe	Pro	Leu	Phe	Glu	Ala	Val	Tyr	Gln	355	360	365	
Ile	Val	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Pro	Met	Lys	Asn	Leu	Pro	Asp	Met	Ile	Glu	370	375	380	
Glu	Leu	Asp	Leu	His	Glu											385	390		

<210> 212

<211> 391
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> N44A

<400> 212

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
 1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
 20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Ala Trp Gly Thr Thr
 35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
 50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
 65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
 85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
 100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
 115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205

ES 2 735 024 T3

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 213

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> N44C

<400> 213

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 214

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> N44G

<400> 214

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu

ES 2 735 024 T3

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

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 215

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> N44I

<400> 215

Met Ser Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Ile Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly

ES 2 735 024 T3

145		150		155		160									
Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ile	Thr	Glu	Glu	Leu	Gly	Ile	Gln	Cys
				165					170					175	
Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Ala	Thr	Glu	Val	Ala	Gln	Glu	His
			180					185					190		
Trp	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	His	Ile	Pro	Lys	Asp	Phe	Arg	Gly
		195					200					205			
Glu	Gly	Lys	Asp	Val	Asp	His	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	His	Arg
	210					215					220				
Pro	Tyr	Phe	His	Val	Ser	Val	Ile	Glu	Asp	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Ile
225					230					235					240
Cys	Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Cys	Gly	Phe	Val	Glu
				245					250					255	
Gly	Leu	Gly	Trp	Gly	Asn	Asn	Ala	Ser	Ala	Ala	Ile	Gln	Arg	Val	Gly
			260					265					270		
Leu	Gly	Glu	Ile	Ile	Arg	Phe	Gly	Gln	Met	Phe	Phe	Pro	Glu	Ser	Arg
		275					280					285			
Glu	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Leu	Ile	Thr
	290					295					300				
Thr	Cys	Ala	Gly	Gly	Arg	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Arg	Leu	Met	Ala	Thr
305					310					315					320
Ser	Gly	Lys	Asp	Ala	Trp	Glu	Cys	Glu	Lys	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Gln
				325					330					335	
Ser	Ala	Gln	Gly	Leu	Ile	Thr	Cys	Lys	Glu	Val	His	Glu	Trp	Leu	Glu
			340					345					350		
Thr	Cys	Gly	Ser	Val	Glu	Asp	Phe	Pro	Leu	Phe	Glu	Ala	Val	Tyr	Gln
		355					360					365			
Ile	Val	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Pro	Met	Lys	Asn	Leu	Pro	Asp	Met	Ile	Glu
	370					375					380				
Glu	Leu	Asp	Leu	His	Glu	Asp									
385					390										
<210>	216														
<211>	391														

ES 2 735 024 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> N44L

5 <400> 216

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

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

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg

ES 2 735 024 T3

210

215

220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 217

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> N44M

<400> 217

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

ES 2 735 024 T3

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Met Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg

ES 2 735 024 T3

275

280

285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 218

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> N44S

<400> 218

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Ser Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

ES 2 735 024 T3

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
 100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
 115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
 210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
 225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
 245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
 260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
 275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
 290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
 305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
 325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu

340

345

350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 219

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> N44V

<400> 219

Met Ser Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Val Trp Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160

ES 2 735 024 T3

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 220

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

ES 2 735 024 T3

<220>

<223> W45A

<400> 220

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

ES 2 735 024 T3

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 221

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> W45C

<400> 221

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 222

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> W45G

<400> 222

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Gly Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

ES 2 735 024 T3

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
 100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
 115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
 210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
 225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
 245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
 260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
 275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
 290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
 305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
 325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
 340 345 350

ES 2 735 024 T3

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 223

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> W45H

<400> 223

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn His Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160

ES 2 735 024 T3

Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ile	Thr	Glu	Glu	Leu	Gly	Ile	Gln	Cys	
				165					170					175		
Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Ala	Thr	Glu	Val	Ala	Gln	Glu	His	
			180					185					190			
Trp	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	His	Ile	Pro	Lys	Asp	Phe	Arg	Gly	
		195					200					205				
Glu	Gly	Lys	Asp	Val	Asp	His	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	His	Arg	
	210					215					220					
Pro	Tyr	Phe	His	Val	Ser	Val	Ile	Glu	Asp	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Ile	
225					230				235						240	
Cys	Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Cys	Gly	Phe	Val	Glu	
				245					250					255		
Gly	Leu	Gly	Trp	Gly	Asn	Asn	Ala	Ser	Ala	Ala	Ile	Gln	Arg	Val	Gly	
			260					265					270			
Leu	Gly	Glu	Ile	Ile	Arg	Phe	Gly	Gln	Met	Phe	Phe	Pro	Glu	Ser	Arg	
		275					280					285				
Glu	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Leu	Ile	Thr	
	290					295					300					
Thr	Cys	Ala	Gly	Gly	Arg	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Arg	Leu	Met	Ala	Thr	
305					310					315					320	
Ser	Gly	Lys	Asp	Ala	Trp	Glu	Cys	Glu	Lys	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Gln	
				325					330					335		
Ser	Ala	Gln	Gly	Leu	Ile	Thr	Cys	Lys	Glu	Val	His	Glu	Trp	Leu	Glu	
			340					345					350			
Thr	Cys	Gly	Ser	Val	Glu	Asp	Phe	Pro	Leu	Phe	Glu	Ala	Val	Tyr	Gln	
		355					360					365				
Ile	Val	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Pro	Met	Lys	Asn	Leu	Pro	Asp	Met	Ile	Glu	
	370					375					380					
Glu	Leu	Asp	Leu	His	Glu	Asp										
385					390											

<210> 224

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

ES 2 735 024 T3

<220>

<223> W45I

<400> 224

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

ES 2 735 024 T3

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 225

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> W45K

<400> 225

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 226

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> W45L

<400> 226

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

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

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

ES 2 735 024 T3

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
 100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
 115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
 210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
 225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
 245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
 260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
 275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
 290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
 305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
 325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
 340 345 350

ES 2 735 024 T3

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 227

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> W45M

<400> 227

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Met Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160

ES 2 735 024 T3

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 228

<211> 391

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 735 024 T3

<220>

<223> W45N

<400> 228

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Asn Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
210 215 220

ES 2 735 024 T3

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 229

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> W45Q

<400> 229

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Gln Gly Thr Thr

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 230

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> W45R

<400> 230

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Arg Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile

ES 2 735 024 T3

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

ES 2 735 024 T3

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 231

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> W45S

<400> 231

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Ser Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys

ES 2 735 024 T3

	165		170		175										
Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Ala	Thr	Glu	Val	Ala	Gln	Glu	His
	180				185								190		
Trp	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	His	Ile	Pro	Lys	Asp	Phe	Arg	Gly
	195						200					205			
Glu	Gly	Lys	Asp	Val	Asp	His	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	His	Arg
	210					215					220				
Pro	Tyr	Phe	His	Val	Ser	Val	Ile	Glu	Asp	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Ile
225					230					235					240
Cys	Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Cys	Gly	Phe	Val	Glu
				245					250					255	
Gly	Leu	Gly	Trp	Gly	Asn	Asn	Ala	Ser	Ala	Ala	Ile	Gln	Arg	Val	Gly
			260					265					270		
Leu	Gly	Glu	Ile	Ile	Arg	Phe	Gly	Gln	Met	Phe	Phe	Pro	Glu	Ser	Arg
	275						280					285			
Glu	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Leu	Ile	Thr
	290					295					300				
Thr	Cys	Ala	Gly	Gly	Arg	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Arg	Leu	Met	Ala	Thr
305					310					315					320
Ser	Gly	Lys	Asp	Ala	Trp	Glu	Cys	Glu	Lys	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Gln
				325					330					335	
Ser	Ala	Gln	Gly	Leu	Ile	Thr	Cys	Lys	Glu	Val	His	Glu	Trp	Leu	Glu
			340					345					350		
Thr	Cys	Gly	Ser	Val	Glu	Asp	Phe	Pro	Leu	Phe	Glu	Ala	Val	Tyr	Gln
	355						360					365			
Ile	Val	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Pro	Met	Lys	Asn	Leu	Pro	Asp	Met	Ile	Glu
	370					375					380				
Glu	Leu	Asp	Leu	His	Glu	Asp									
385					390										

<210> 232

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 735 024 T3

<223> W45T

<400> 232

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Thr Gly Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile

ES 2 735 024 T3

225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 233

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> W45V

<400> 233

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Val Gly Thr Thr
35 40 45

ES 2 735 024 T3

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr

ES 2 735 024 T3

290

295

300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 234

<211> 90

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> F1

<400> 234

tcaagaaaca attgtatatt gtacaccccc cccctccaca aacacaaata ttgataatat 60

aaagatgaac caacgtaatg cttcaatgac 90

10 <210> 235

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> R1

<400> 235

ctgaacatta gaatacgtaa tccgcaatgc ttagtggtcg ctgcgctcgt cc 52

<210> 236

<211> 52

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> F2

<400> 236

25 ggacgagcgc agcagccact aagcattgcg gattacgtat tctaatttc ag 52

<210> 237

<211> 93

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> R2

<400> 237

gatatagaag agcctcgaaa aaagtggggg aaagtatgat atgttatctt tctccaataa 60

5 atcaccttgg ctaactcgtt gtatcatcac tgg 93

<210> 238

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Ptrc-gpsA NcoI F

<400> 238

taaggaggaa taaacctga accaacgtaa tgctcaatg ac 42

<210> 239

15 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ptrc-gpsA PstI R

20 <400> 239

atggtaccag ctgcattagt ggctgctgcg ctcgtc 36

<210> 240

<211> 11222

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pLMH11-JM44

<400> 240

tcccattacc gacatttggg cgctatacgt gcatatgttc atgtatgtat ctgtatttaa 60

aacacttttg tattatTTTT cctcatatat gtgtataggt ttatacggat gatttaatta 120

ttacttcacc accctttatt tcaggctgat atcttagcct tgttactaga ttaatcatgt 180

aattagttat gtcacgctta cattcacgcc ctccccccac atccgctcta accgaaaagg 240

aaggagttag acaacctgaa gtctaggtcc ctatttattt ttttatagtt atgttagtat 300

taagaacgtt atttatattt caaatttttc ttttttttct gtacagacgc gtgtacgcat 360

gtaacattat actgaaaacc ttgcttgaga aggttttggg acgctcgaag gctttaattt 420

gogggcgggc gcacctggta aaacctctag tggagtagta gatgtaatca atgaagcgga	480
agccaaaaga ccagagtaga ggcctataga agaaactgcg ataccttttg tgatggctaa	540
acaaacagac atctttttat atgtttttac ttctgtatat cgtgaagtag taagtataa	600
gcgaatttgg ctaagaacgt tgtaagtga caagggacct cttttgcctt tcaaaaaagg	660
attaaatgga gttaatcatt gagatttagt tttcgttaga ttctgtatcc ctaaataact	720
cccttaccgc acgggaaggc acaaaagact tgaataatag caaacggcca gtagccaaga	780
ccaaataata ctagagttaa ctgatggtct taaacaggca ttacgtggtg aactccaaga	840
ccaatataca aaatatcgat aagttattct tgcccaccaa tttaaggagc ctacatcagg	900
acagtagtac cattcctcag agaagaggta tacataacaa gaaaatcgcg tgaacacctt	960
atataactta gcccgttatt gagctaaaaa accttgcaaa atttcctatg aataagaata	1020
cttcagacgt gataaaaatt tactttctaa ctcttctcac gctgccccta tctgttcttc	1080
cgctctaccg tgagaaataa agcatcgagt acggcagttc gctgtcactg aactaaaaca	1140
ataaggctag ttcgaaatgat gaacttgctt gctgtcaaac ttctgagttg ccgctgatgt	1200
gacactgtga caataaatc aaaccggtta tagcggctct ctcgggtacc ggttctgcc	1260
cctccaatag agctcagtag gagtcagaac ctctgcggtg gctgtcagtg actcatccgc	1320
gtttcgtaag ttgtgcgcgt gcacatttgc ccggttcccg ctcatcttgc agcaggcgga	1380
aattttcatc acgctgtagg acgcaaaaaa aaaataatta atcgtacaag aatcttgga	1440
aaaaaattga aaaattttgt ataaaaggga tgacctaaact tgactcaatg gcttttacac	1500
ccagtatttt ccctttcctt gtttgttaca attatagaag caagacaaaa acatatagac	1560
aacctattcc taggagttat atttttttac cctaccagca atataagtaa aaaactgttt	1620
aaacagtatg gctaagattt actaccaaga agactgtaac ttgtccttgt tggatggtaa	1680
gactatcgcc gttatcggtt acggttctca aggtcacgct catgccctga atgctaagga	1740
atccggttgt aacgttatca ttggtttatt cgaaggtgcg gaggagtga aaagagctga	1800
agaacaaggt ttcgaagtct acaccgctgc tgaagctgct aagaaggctg acatcattat	1860
gatcttgatc ccagatgaat accaggctgt catgtacaaa aacgacatcg aaccaaactt	1920
ggaagccggt aacatgttga tggtcgtca cggtttcaac atccatttcg gttgtattgt	1980
tccaccaaag gacgttgatg tcaactatgat cgctccaaag ggtccaggtc acaccgtag	2040
atccgaatac gaagaaggta aaggtgtccc atgcttggtt gctgtcgaac aagacgctac	2100
tggcaaggct ttggatatgg ctttggccta cgcttttagcc atcggtggtg ctagagccgg	2160
tgtcttgga actaccttca gaaccgaaac tgaaaccgac ttgttcggtg aacaagctgt	2220
tttatgtggt ggtgtctgcg ctttgatgca ggccggtttt gaaaccttgg ttgaagccgg	2280
ttacgacca agaaacgctt acttcgaatg tatccacgaa atgaagttga tcgttgactt	2340

gatctaccaa tctggtttct ccggtatgcg ttactctatc tccaacactg ctgaatacgg	2400
tgactacatt accggtccaa agatcattac tgaagatacc aagaaggcta tgaagaagat	2460
tttgtctgac attcaagatg gtacctttgc caaggacttc ttggttgaca tgtctgatgc	2520
tggttcccag gtccacttca aggctatgag aaagtggcc tccgaacacc cagctgaagt	2580
tgtcggtgaa gaaattagat ccttgtactc ctggtccgac gaagacaagt tgattaacaa	2640
ctgaggccct gcaggccaga ggaaaataat atcaagtgc tggaaactttt tctcttgaa	2700
tttttgcaac atcaagtcatt agtcaattga attgacccaa tttcacattt aagatttttt	2760
ttttttcatc cgacatacat ctgtacacta ggaagccctg tttttctgaa gcagcttcaa	2820
atatatatat tttttacata tttattatga ttcaatgaac aatctaatta aatcgaaaac	2880
aagaaccgaa acgcgaataa ataatttatt tagatgggtga caagtgtata agtcctcatc	2940
gggacagcta cgatttctct ttcggttttg gctgagctac tggttgctgt gacgcagcgg	3000
cattagcgcg gcgttatgag ctaccctcgt ggccgtgaaag atggcgggaa taaagcggaa	3060
ctaaaaatta ctgactgagc catattgagg tcaatttgtc aactcgtcaa gtcacgtttg	3120
gtggacggcc cctttccaac gaatcgtata tactaacatg cgcgcgcttc ctatatacac	3180
atatacatat atatatatat atatatgtgt gcgtgtatgt gtacacctgt atttaatttc	3240
cttactcgcg ggtttttctt ttttctcaat tcttggcttc ctctttctcg agcggaccgg	3300
atcctcgcga actccaaaat gagctatcaa aaacgataga tcgattagga tgactttgaa	3360
atgactccgc agtggactgg ccgttaattt caagcgtgag taaaatagtg catgacaaaa	3420
gatgagctag gcttttgtaa aaatatctta cgttgtaaaa ttttagaaat cattatttcc	3480
ttcatatcat tttgtcattg accttcagaa gaaaagagcc gaccaataat ataaataaat	3540
aaataaaaaat aatattccat tatttctaaa cagattcaat actcattaaa aaactatatc	3600
aattaatttg aattaacgcg gccgcttaac cacagcaacc aggacaacat tttttgccag	3660
tttcttcagg ctccaaaag tctgttacgg ctcccctaga agcagacgaa acgatgtgag	3720
catatttacc aaggataccg cgtgaataga gcggtggcaa ttcaatggtc tcttgacgat	3780
gttttaactc ttcatcggag atatcaaagt gtaattcctt agtgtcttgg tcaatagtga	3840
ctatgtctcc tgtttgacgg taggcgattg gaccgccatc ttgtgcttca ggagcgatat	3900
gaccacgac aagaccataa gtaccacctg agaagcggcc atctgtcaga agggcaactt	3960
tttcaccttg ccctttacca acaatcattg atgaaaggga aagcatttca ggcataccag	4020
gaccgccctt tggtcctaca aaacgtacga caacaacatc accatcaaca atatcatcat	4080
tcaagacagc ttcaatggct tcttcttcag aattaaagac cttagcagga ccgacatgac	4140
gacgcacttt tacaccagaa actttggcaa cggcaccgtc tggagccaag ttaccatgga	4200

gaataatgac	cggaccatct	tcacgttttag	gatttttcaag	cggcataata	accttttgac	4260
caggtgttaa	atcatcaaaa	gccttcaaat	tttcagcgac	tgttttgcca	gtacaagtga	4320
tacggtcacc	atgaaggaag	ccatttttaa	ggagatattt	cataactgct	ggtacccctc	4380
cgaccttgta	aaggtcttgg	aatacatatt	gaccagaagg	tttcaaatca	gccaaatgag	4440
gaactttttc	ttggaaaagta	ttgaaatcat	caagtgtcaa	ttccacatta	gcagcatggg	4500
caatagctaa	gaggtgaagg	gttgagttgg	ttgaacctcc	cagagccata	gttacagtaa	4560
tagcatcttc	aaaagcttca	cgcgttaaaa	tgtcagaagg	ttttaagccc	atttcgagca	4620
ttttgacaac	agcgcgacca	gcttcttcaa	tatctgcttt	cttttctgcg	gattcagccg	4680
ggtgagaaga	tgaacccgga	aggctaagtc	ccaaaacttc	aatagctgtc	gccattgtgt	4740
tagcagtata	cataccaccg	cagcctccag	gaccgggaca	agcattacat	tccaaagctt	4800
taacttcttc	tttggtcata	tcgccgtggg	tccaatggcc	gacaccttca	aagacagaga	4860
ctaaatcgat	atctttgccg	tctaaattac	caggtgcaat	tgttccgccg	taagcaaaaa	4920
tggctgggat	atccatgtta	gccatagcga	taacagaacc	gggcatgttt	ttatcacaac	4980
cgccaatggc	tacaaaagca	tccgcattat	gacctcccat	ggctgcttca	atagaatctg	5040
caataatatc	acgagatgtc	aaggagaaac	gcattccttg	ggttcccatg	gcgattccat	5100
cagaaaccgt	gattgttccg	aactgaactg	gccaagcacc	agcttcctta	acaccgactt	5160
tggctagttt	accaaagtca	tgtaagtgga	tattacaagg	tgtgttttca	gccaagtgtg	5220
aaatgacacc	gacgataggt	ttttcaaagt	cttcatcttg	cataccagtt	gcacgcaaca	5280
tagcacgatt	aggtgattta	accattgaat	cgtaaacaga	actacgattt	cttaagtctt	5340
taagagtttt	tttgtcagtc	atactcacgt	gaaacttaga	ttagattgct	atgctttctt	5400
tccaatgagc	aagaagtaaa	aaaagttgta	atagaacagg	aaaaatgaag	ctgaaacttg	5460
agaaattgaa	gaccgtttgt	taactcaaat	atcaatggga	ggcgtcgaa	agagaacaaa	5520
atcgaaaaaa	aagttttcaa	gagaaagaaa	cgtgataaaa	atttttattg	ccttctccga	5580
cgaagaaaaa	gggacgaggc	ggtctctttt	tccttttcca	aacctttagt	acgggtaatt	5640
aacggcaccc	tagaggaagg	aggaggggga	atttagtatg	ctgtgcttgg	gtgttttgaa	5700
gtggtacggc	ggtgcgcgga	gtccgagaaa	atctggaaga	gtaaaaaagg	agtagagaca	5760
ttttgaagct	atgccggcag	atctatttaa	atggcgcgcc	gacgtcaggt	ggcacttttc	5820
ggggaaatgt	gcgcggaacc	cctatttggt	tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	5880
cgctcatgag	acaataaccc	tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	aagagtatga	5940
gtattcaaca	tttccgtgtc	gcccttattc	ccttttttgc	ggcattttgc	cttcctgttt	6000
ttgctcacc	agaaacgctg	gtgaaagtaa	aagatgctga	agatcagttg	ggtgcacgag	6060
tgggttacat	cgaactggat	ctcaacagcg	gtaagatcct	tgagagtttt	cgccccgaag	6120

aacgttttcc	aatgatgagc	actttttaag	ttctgctatg	tggcgcggta	ttatcccgt	6180
ttgacgccgg	gcaagagcaa	ctcggtcgcc	gcatacacta	ttctcagaat	gacttggttg	6240
agtactcacc	agtcacagaa	aagcatctta	cggatggcat	gacagtaaga	gaattatgca	6300
gtgctgccat	aaccatgagt	gataaactg	cggccaactt	acttctgaca	acgatcggag	6360
gaccgaagga	gctaaccgct	tttttgcaca	acatggggga	tcatgtaact	cgccttgatc	6420
gttggaacc	ggagctgaat	gaagccatac	caaacgacga	gcgtgacacc	acgatgcctg	6480
tagcaatggc	aacaacgttg	cgcaaactat	taactggcga	actacttact	ctagcttccc	6540
ggcaacaatt	aatagactgg	atggaggcgg	ataaagttgc	aggaccactt	ctgcgctcgg	6600
cccttcggc	tggctggttt	attgctgata	aatctggagc	cggtgagcgt	gggtctcgcg	6660
gtatcattgc	agcactgggg	ccagatggta	agccctcccg	tatcgtagtt	atctacacga	6720
cggggagtca	ggcaactatg	gatgaacgaa	atagacagat	cgctgagata	ggtgcctcac	6780
tgattaagca	ttggtaaactg	tcagaccaag	tttactcata	tatactttag	attgatttaa	6840
aacttcattt	ttaatttaaa	aggatctagg	tgaagatcct	ttttgataat	ctcatgacca	6900
aaatccctta	acgtgagttt	tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaag	6960
gatcttcttg	agatcctttt	tttctgcgcg	taatctgctg	cttgcaaaca	aaaaaaccac	7020
cgtaccagc	ggtggtttgt	ttgccggatc	aagagctacc	aactcttttt	ccgaaggtaa	7080
ctggcttcag	cagagcgag	ataccaaata	ctgttcttct	agtgtagccg	tagttaggcc	7140
accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaata	ctgttaccag	7200
tggctgctgc	cagtggcgat	aagtcgtgtc	ttaccgggtt	ggactcaaga	cgatagttac	7260
cggataaggc	gcagcggtcg	ggctgaacgg	ggggttcgtg	cacacagccc	agcttgagac	7320
gaacgacct	caccgaactg	agatacctac	agcgtgagct	atgagaaagc	gccacgcttc	7380
ccgaaggag	aaaggcggac	aggtatccgg	taagcggcag	ggtcggaaaca	ggagagcgca	7440
cgagggagct	tccaggggga	aacgcctggt	atctttatag	tcctgtcggg	tttcgccacc	7500
tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	cgtcaggggg	gcggagccta	tggaaaaacg	7560
ccagcaacgc	ggccttttta	cggttcctgg	ccttttgctg	gccttttgct	cacatgttct	7620
ttcctgcgtt	atcccctgat	tctgtggata	accgtattac	cgcctttgag	tgagctgata	7680
ccgctcgccg	cagccgaacg	accgagcgca	gcgagtcagt	gagcgaggaa	gcggaagagc	7740
gcccataacg	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttgccgat	tcattaatgc	agctggcacg	7800
acaggtttcc	cgactggaaa	gcgggcagtg	agcgcaacgc	aattaatgtg	agttagctca	7860
ctcattaggc	accccaggct	ttacacttta	tgcttccggc	tcgtatgttg	tgtggaattg	7920
tgagcggata	acaatttcac	acaggaaaca	gctatgacca	tgattacgcc	aagctttttc	7980

tttccaattt	tttttttttc	gtcattataa	aaatcattac	gaccgagatt	cccgggtaat	8040
aactgatata	attaaattga	agctctaatt	tgtgagttta	gtatacatgc	atttacttat	8100
aatacagttt	tttagttttg	ctggcgcgat	cttctcaa	atgcttccca	gcctgctttt	8160
ctgtaacgtt	caccctctac	cttagcatcc	cttccctttg	caaatagtcc	tcttccaaca	8220
ataataatgt	cagatcctgt	agagaccaca	tcatccacgg	ttctatactg	ttgacccaat	8280
gcgtctccct	tgtcatctaa	acccacaccg	gggtgcataa	tcaaccaatc	gtaaccttca	8340
tctcttccac	ccatgtctct	ttgagcaata	aagccgataa	caaaatcttt	gtcgtctctc	8400
gcaatgtcaa	cagtaccctt	agtatattct	ccagtagata	gggagccctt	gcatgacaat	8460
tctgctaaca	tcaaaaggcc	tctaggttcc	tttgttactt	cttctgccgc	ctgcttcaaa	8520
ccgctaacaa	tacctggggc	caccacaccg	tgtgcattcg	taatgtctgc	ccattctgct	8580
attctgtata	caccgcgaga	gtactgcaat	ttgactgtat	taccaatgtc	agcaaatttt	8640
ctgtcttcga	agagtaaaaa	attgtacttg	gcggataatg	ccttttagcgg	cttaactgtg	8700
ccctccatgg	aaaaatcagt	caagatatcc	acatgtgttt	ttagtaaaaa	aattttggga	8760
cctaattgctt	caactaactc	cagtaattcc	ttgggtggtac	gaacatccaa	tgaagcacac	8820
aagtttggtt	gcttttcgtg	catgatatta	aatagcttgg	cagcaacagg	actaggatga	8880
gtagcagcac	gttccttata	tgtagctttc	gacatgattt	atcttcggtt	cctgcagggt	8940
tttgttctgt	gcagttgggt	taagaatact	gggcaatttc	atgtttcttc	aacactacat	9000
atgcgtatat	ataccaatct	aagtctgtgc	tccttccttc	gttcttcctt	ctgttcggag	9060
attaccgaat	caaaaaaatt	tcaaggaaac	cgaaatcaaa	aaaaagaata	aaaaaaaaat	9120
gatgaattga	aaagcttgca	tgccctgcagg	tcgactctag	tatactccgt	ctactgtacg	9180
atacacttcc	gctcaggtcc	ttgtccttta	acgaggcctt	accactcttt	tgttactcta	9240
ttgatccagc	tcagcaaagg	cagtgtgatc	taagattcta	tcttcgcgat	gtagtaaaac	9300
tagctagacc	gagaaagaga	ctagaaatgc	aaaaggcact	tctacaatgg	ctgccatcat	9360
tattatccga	tgtgacgctg	catttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	9420
tttttttttt	ttttgtacgt	cacctggcaa	aacgacgatc	ttcttagggg	cagacattac	9480
aatggtatat	ccttgaaata	tatatataaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaatgcag	9540
cttctcaatg	atattcgaat	acgctttgag	gagatacagc	ctaatatccg	acaaactggt	9600
ttacagatth	acgatcgtac	ttgttaccga	tcattgaatt	ttgaacatcc	gaacctggga	9660
gttttccctg	aaacagatag	tatatattga	cctgtataat	aatatatagt	ctagcgcttt	9720
acggaagaca	atgtatgtat	ttcggttcct	ggagaaacta	ttgcatctat	tgcataggta	9780
atcttgcacg	tcgcatcccc	ggttcatttt	ctgcgtttcc	atcttgcact	tcaatagcat	9840
atctttgtta	acgaagcatc	tgtgcttcat	tttgtagaac	aaaaatgcaa	cgcgagagcg	9900

ctaatttttc aaacaaagaa tctgagctgc atttttacag aacagaaatg caacgcgaaa 9960
gcgctatttt accaacgaag aatctgtgct tcatttttgt aaaacaaaaa tgcaacgcga 10020
gagcgctaatt ttttcaaaca aagaatctga gctgcatttt tacagaacag aaatgcaacg 10080
cgagagcgct attttacc aaagaatct atacttcttt tttgttctac aaaaatgcat 10140
cccgagagcg ctatttttct aacaaagcat cttagattac tttttttctc ctttgtgcgc 10200
tctataatgc agtctcttga taactttttg cactgtaggt ccgttaaggt tagaagaagg 10260
ctactttggt gtctattttc tcttccataa aaaaagcctg actccacttc ccgcgtttac 10320
tgattactag cgaagctgcg ggtgcatttt ttcaagataa aggcattccc gattatattc 10380
tataccgatg tggattgcgc atactttgtg aacagaaagt gatagcgttg atgattcttc 10440
attggtcaga aaattatgaa cggtttcttc tattttgtct ctatatacta cgtataggaa 10500
atgtttacat tttcgtattg ttttcgattc actctatgaa tagttcttac tacaattttt 10560
ttgtctaaag agtaatacta gagataaaca taaaaaatgt agaggctcag tttagatgca 10620
agttcaagga gcgaaaggtg gatgggtagg ttatataggg atatagcaca gagatatata 10680
gcaaagagat acttttgagc aatgtttgtg gaagcgggat tcgcaatatt ttagtagctc 10740
gttacagtcc ggtgcgtttt tggttttttg aaagtgcgtc ttcagagcgc ttttggtttt 10800
caaaagcgct ctgaagttcc tatactttct agagaatagg aacttcggaa taggaacttc 10860
aaagcgtttc cgaaaacgag cgcttccgaa aatgcaacgc gagctgcgca catacagctc 10920
actgttcacg tcgcacctat atctgcgtgt tgcctgtata tatatataca tgagaagaac 10980
ggcatagtgc gtgtttatgc ttaaatacgt acttatatgc gtctatttat gtaggatgaa 11040
aggtagtcta gtacctctg tgatattatc ccattccatg cggggtatcg tatgcttcct 11100
tcagcactac ctttagctg ttctatatgc tgccactcct caattggatt agtctcatcc 11160
ttcaatgcta tcatttcctt tgatattgga tcatatgcat agtaccgaga aactagagga 11220
tc 11222

<210> 241

<211> 54

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oBP1350

<400> 241

gattgaggcg atcggtgcg gcggacatct ttatattatc aatattgtg ttg 54

10 <210> 242

<211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> oBP1351

<400> 242

aaacacaaat attgataata taaagatgtc cgccgcagcc gatcgctca atc 53

<210> 243
 <211> 40
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oBP1352

<400> 243

ttaagtttaa acttaacct catgcagatc cagttctcg 40

10 <210> 244
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> oBP1353

<400> 244

gtttaatcta tcagcagcag cagacatctt tatattatca atattgtgt ttg 53

20 <210> 245
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oBP1354

<400> 245

25 aaacacaaat attgataata taaagatgtc tgctgctgct gatagattaa ac 52

<210> 246
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> oBP1355

<400> 246

ttaagtttaa acctaactt catgtagatc taattctc 39

35 <210> 247
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oBP1356

40 <400> 247

agaaacgtca aggttgctag gctaatag 27

45 <210> 248
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oBP1357

<400> 248

gtgaagaaac gtattatcag gagtcg 26

<210> 249

<211> 7063

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pBP3518GPD1_EcOpt

<400> 249

tgcgcgcgttt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacgggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcgggcc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaaggg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggg	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	cgagctcggg	acccggggat	420
ccggcgcgcc	gtgtagacgt	agtataacag	tatatctgac	acgcacgtga	tgaccacgta	480
atcgcatcgc	ccctcacatc	tcacctctca	ccgctgactc	agcttcacta	aaaaggaaaa	540
tatatactct	ttcccaggca	aggtgacagc	ggtccccgtc	tcctccacaa	aggcctctcc	600
tggggtttga	gcaagtctaa	gtttacgtag	cataaaaatt	ctcggattgc	gtcaaataat	660
aaaaaaagta	actccacttc	tacttctaca	tcggaaaaac	attccattca	catatcgtct	720
ttggcctatc	ttgttttgtc	cttggtagat	caggtcagta	caaacgcaac	acgaaagaac	780
aaaaaaagaa	gaaaacagaa	ggccaagaca	gggtcaatga	gactgttgtc	ctcctactgt	840
ccctatgtct	ctggccgatc	acgcgccatt	gtccctcaga	aacaaatcaa	acacccacac	900
cccgggcacc	caaagtcccc	acccacacca	ccaatacgta	aacggggcg	cccctgcagg	960
ccctcctgcg	cgcggcctcc	cgccttgctt	ctctcccctc	ccttttcttt	ttccagtttt	1020
ccctattttg	tccctttttc	cgcacaacaa	gtatcagaat	gggttcatca	aatctatcca	1080

acctaattcg	cacgtagact	ggcttggtat	tggcagtttc	gcagttatat	atatactacc	1140
atgagtga	aa ctgttacgtt	accttaaatt	ctttctccct	ttaattttct	tttatcttac	1200
tctcctacat	aagacatcaa	gaaacaattg	tatattgtac	acccccccc	tccacaaaca	1260
caaataattga	taatataaa	atgtccgccg	cagccgatcg	cctcaatctc	acgtccggtc	1320
atgtgaacgc	aggtcgtaaa	cgcagcagca	gctccgtag	cttgaaagcg	gcggagaagc	1380
cgtttaaagt	gaccgtgatt	ggtagcggta	actggggcac	caccattgcg	aaagtgggtcg	1440
cagagaactg	taagggctac	ccggaagtgt	tcgctccgat	tgttcagatg	tgggtgtttg	1500
aagaagagat	caatggtgaa	aaactgacgg	agatcatcaa	caccgccac	caaaacgtca	1560
aatatctgcc	tggcatcacc	ttgccggaca	atctggtggc	gaatccggac	ctgatcgatt	1620
ctgtcaaaga	cggtgacatt	attgttttca	acatcccgca	ccagtttctg	ccgcgtattt	1680
gcagccagct	gaagggtcac	gtcgatagcc	acgtccgcgc	gattagctgc	ctgaaaggct	1740
tcgaggtggg	cgcgaagggt	gttcaattgc	tgtctagcta	catcaccgaa	gagctgggca	1800
ttcagtgcgg	tgcgctgtcc	ggtgctaata	tcgctaccga	agttgcacaa	gagcattgga	1860
gcgagactac	ggtcgcgtat	cacattccga	aggacttccg	tggcgaaggc	aaggatgtcg	1920
accataaagt	tctgaaggcg	ctgtttcacc	gtccgtactt	tcatgtcagc	gtcatcgaa	1980
atgttgccgg	tatcagcatt	tgtggtgcgt	tgaagaacgt	tgttgcaactg	ggttgccggtt	2040
ttgttgaggg	tctgggttgg	ggtacaacacg	cgtctgcggc	aattcaacgt	gtgggtctgg	2100
gcgagatcat	ccgtttcggc	cagatgttct	tcccagagag	ccgtgaagaa	acgtattatc	2160
aggagtcggc	cggtgtggcc	gacctgatca	ccacttgccg	tgggtggccg	aatgttaagg	2220
tagcgcgtct	gatggcgacc	agcggcaagg	acgcctggga	gtgcgagaaa	gagctgctga	2280
atggtcagag	cgcacaagg	ctgattacct	gtaaagaagt	gcacgaatgg	ctggaaacgt	2340
gtggcagcgt	cgaggacttc	ccgctgtttg	aggcagtgt	ccaaattgtg	tacaacaatt	2400
acccgatgaa	gaatctgccg	gatatgatcg	aagaactgga	tctgcatgag	gattaagttt	2460
aaactcatgt	aattagttat	gtcacgotta	cattcacgcc	ctcctccac	atccgctcta	2520
accgaaaagg	aaggagttag	acaacctgaa	gtctaggtcc	ctatttat	tttttaatat	2580
ttatgttagt	attaagaacg	ttattttatat	ttcaaatttt	tctttttttt	ctgtacaaac	2640
gcgtgtacgc	atgtaacatt	atactgaaaa	ccttgcttga	gaaggttttg	ggacgctcga	2700
aggctttaat	ttgcggggcc	ggccgcattg	cggattacgt	attctaattgt	tcagtaccgt	2760
tcgtataatg	tatgctatac	gaagttaatgc	agattgtact	gagagtgcac	cataccacct	2820
tttcaattca	tcattttttt	tttattcttt	tttttgattt	cggtttcctt	gaaatttttt	2880
tgattcggta	atctccgaac	agaaggaaga	acgaaggaag	gagcacagac	ttagattgggt	2940
atatatacgc	atatgtagt	ttgaagaaac	atgaaattgc	ccagtattct	taacccaact	3000

gcacagaaca	aaaacctgca	ggaaacgaag	ataaatcatg	tcgaaagcta	catataagga	3060
acgtgctgct	actcatccta	gtcctgttgc	tgccaagcta	tttaatatca	tgcacgaaaa	3120
gcaaacaaac	ttgtgtgctt	cattggatgt	tcgtaccacc	aaggaattac	tggagttagt	3180
tgaagcatta	ggccccaaaa	tttgtttact	aaaaacacat	gtggatatct	tgactgattt	3240
ttccatggag	ggcacagtta	agccgctaaa	ggcattatcc	gccaagtaca	atTTTTtact	3300
cttcgaagac	agaaaatttg	ctgacattgg	taatacagtc	aaattgcagt	actctgctgg	3360
tgtatacaga	atagcagaat	gggcagacat	tacgaatgca	cacggtgtgg	tgggcccagg	3420
tattgttagc	ggtttgaagc	aggcggcaga	agaagtaaca	aaggaaaccta	gaggcctttt	3480
gatgttagca	gaattgtcat	gcaagggctc	cctatctact	ggagaatata	ctaagggtag	3540
tgttgacatt	gcgaagagcg	acaaagattt	tgttatcggc	tttattgctc	aaagagacat	3600
gggtggaaga	gatgaagggt	acgattgggt	gattatgaca	cccgtgtgtg	gtttagatga	3660
caagggagac	gcattgggtc	aacagtatag	aaccgtggat	gatgtgggtc	ctacaggatc	3720
tgacattatt	attgttggaa	gaggactatt	tgcaaaggga	agggatgcta	aggtagaggg	3780
tgaacgttac	agaaaagcag	gctgggaagc	atatttgaga	agatgcggcc	agcaaaaacta	3840
aaaaactgta	ttataagtaa	atgcatgtat	actaaactca	caaattagag	cttcaattta	3900
attatatcag	ttattaccct	atgcggtgtg	aaataaccgca	cagatgcgta	aggagaaaat	3960
accgcatcag	gaaattgtaa	gcgttaatat	tttgttaaaa	ttcgcgttaa	atTTTTgtta	4020
aatcagctca	TTTTTTaacc	aataggccga	aatcggcaaa	atcccttata	aatcaaaaga	4080
atagaccgag	ataggggtga	gtgttggtcc	agtttggaac	aagagtccac	tattaaagaa	4140
cgtggactcc	aacgtcaaag	ggcgaaaaac	cgtctatcag	ggcgtatggc	cactacgtga	4200
accatcacc	taatcaagat	aacttcgtat	aatgtatgct	atacgaacgg	taccagtgat	4260
gatacaacga	gttagccaag	gtggcggccg	catttattgg	agaaagataa	catatcatat	4320
tttccccac	TTTTTTcgag	gctcttctat	atcatattca	taaattagca	ttatgtcatt	4380
tctcataact	actttatcac	gttagaaatt	acttattatt	attaaattaa	tacaaaattt	4440
agtaaccaa	taaatataaa	taaatatgca	tattttaaatt	ttaaaaaaaa	aatcctatag	4500
agcaaaagga	ttctccatta	taatatgagc	tatacacctc	ttacgcattt	tttgaggggtg	4560
gttacaacac	cactcattca	gaggctgtcg	gcacagttgc	ttccagcatc	tggcgtccgt	4620
atgtatgggt	gtatttttaa	taataaacia	agtgccacac	cttcaccaat	tatgtcttta	4680
agaaatggac	aagttccaaa	gagcttgccc	aaggctcgac	aaggatgtac	tttagaatat	4740
ctatattcaa	gtacgtggcg	cgcatatgtt	tgagtgtgca	cacaataaag	gttaattaat	4800
ctagagtcga	cctgcaggca	tgcaagcttg	gcgtaatcat	gtcatagct	gtttcctgtg	4860

tgaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa	4920
gcctggggtg cctaattgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct	4980
ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga	5040
ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct tctcgcctca ctgactcgct gcgctcggtc	5100
gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa	5160
tcaggggata acgcagggaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt	5220
aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa	5280
aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt	5340
ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg	5400
tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc	5460
agttcgggtg aggtcggtcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc	5520
gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagttca acccggttaag acacgactta	5580
tgcgcaactg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatgt aggcggtgct	5640
acagagttct tgaagtggcg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc	5700
tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa	5760
caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa	5820
aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa	5880
aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt	5940
ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac	6000
agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc	6060
atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc	6120
cccagtgcgt caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata	6180
aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgctccatc	6240
cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcg	6300
aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttg tatggcttca	6360
ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa	6420
gcggttagct ctttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca	6480
ctcatgggta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt	6540
tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt	6600
tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg	6660
ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga	6720
tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc	6780

ES 2 735 024 T3

```

agcgttttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg      6840
acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag      6900
ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg      6960
gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaaccat tattatcatg      7020
acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtc      7063

```

<210> 250

<211> 7063

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pBP3518GPD1_Native

<400> 250

```

tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca      60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg      120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc      180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc      240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgcatc ggtgcggggc tcttcgctat      300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccaggg      360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggg acccggggat      420
ccggcgcgcc gtgtagacgt agtataacag tatactctgac acgcacgtga tgaccacgta      480
atcgcatcgc ccctcacatc tcacctctca ccgctgactc agcttcacta aaaaggaaaa      540
tatatactct tcccaggca aggtgacagc ggtccccgtc tcctccacaa aggcctctcc      600
tggggtttga gcaagtctaa gtttacgtag cataaaaatt ctcggattgc gtcaaataat      660
aaaaaaagta actccacttc tacttctaca tcggaaaaac attccattca catatcgtct      720
ttggcctatc ttgttttgtc cttggtagat caggtcagta caaacgcaac acgaaagaac      780
aaaaaaagaa gaaaacagaa ggccaagaca gggatcaatga gactgttgtc ctccactgt      840
ccctatgtct ctggccgatc acgcgccatt gtccctcaga aacaaatcaa acaccacac      900
cccgggcacc caaagtcccc acccacacca ccaatacgta aacggggcgc cccctgcagg      960
ccctcctgcg cgcggcctcc cgccttgctt ctctcccctc ccttttcttt ttccagtttt      1020
ccctattttg tccctttttc cgcacaacaa gtatcagaat gggttcatca aatctatcca      1080
acctaattcg cacgtagact ggcttggtat tggcagtttc gcagttatat atatactacc      1140
atgagtgaat ctgttacgtt accttaaatt ctttctccct ttaattttct tttatcttac      1200
tctcctacat aagacatcaa gaaacaattg tatattgtac accccccccc tccacaaaca      1260

```

caaatattga	taatataaag	atgtctgctg	ctgctgatag	attaaactta	acttcogggc	1320
acttgaatgc	tggtagaaag	agaagttcct	cttctgtttc	tttgaaggct	gccgaaaagc	1380
ctttcaaggt	tactgtgatt	ggatctggta	actggggtag	tactattgcc	aaggtggttg	1440
ccgaaaattg	taagggatac	ccagaagttt	tcgctccaat	agtacaaatg	tgggtgttcg	1500
aagaagagat	caatgggtgaa	aaattgactg	aaatcataaa	tactagacat	caaaacgtga	1560
aatacttgcc	tggtcatcact	ctacccgaca	atttggttgc	taatccagac	ttgattgatt	1620
cagtcaagga	tgctgacatc	atcgttttca	acattccaca	tcaatttttg	ccccgtatct	1680
gtagccaatt	gaaaggtcat	gttgattcac	acgtcagagc	tatctcctgt	ctaaagggtt	1740
ttgaagttgg	tgctaaaggt	gtccaattgc	tatcctctta	catcactgag	gaactaggta	1800
ttcaatgtgg	tgctctatct	ggtgctaaca	ttgccaccga	agtcgctcaa	gaacactggt	1860
ctgaaacaac	agttgcttac	cacattccaa	aggatttcag	aggcgagggc	aaggacgtcg	1920
accataaggt	tctaaaggcc	ttgttccaca	gaccttactt	ccacgttagt	gtcatcgaag	1980
atgttgctgg	tatctccatc	tgtggtgctt	tgaagaacgt	tgttgccctta	ggttggtggtt	2040
tcgtcgaagg	tctaggctgg	ggtacaacac	cttctgctgc	catccaaaga	gtcgggtttgg	2100
gtgagatcat	cagattcggg	caaagtgttt	tcccagaatc	tagagaagaa	acatactacc	2160
aagagtctgc	tggtgttgct	gatttgatca	ccacctgctc	tggtggtaga	aacgtcaagg	2220
ttgctaggct	aatggctact	tctggtaagg	acgcctggga	atgtgaaaag	gagttgttga	2280
atggccaatc	cgctcaaggt	ttaattacct	gcaaagaagt	tcacgaatgg	ttggaaacat	2340
gtggctctgt	cgaagacttc	ccattatttg	aagccgtata	ccaaatcggt	tacaacaact	2400
acccaatgaa	gaacctgccg	gacatgattg	aagaattaga	tctacatgaa	gattagggtt	2460
aaactcatgt	aattagttat	gtcacgctta	cattcacgcc	ctcctccac	atccgctcta	2520
accgaaaagg	aaggagttag	acaacctgaa	gtctagggtc	ctatttat	tttttaatat	2580
ttatgttagt	attaagaacg	ttatttatat	ttcaaatttt	tctttttttt	ctgtacaaac	2640
gcgtgtacgc	atgtaacatt	atactgaaaa	ccttgcttga	gaaggttttg	ggacgctcga	2700
aggctttaat	ttgcggggcc	ggccgcattg	cggattacgt	attctaattg	tcagtaccgt	2760
tcgtataatg	tatgctatac	gaagttatgc	agattgtact	gagagtgcac	cataccacct	2820
tttcaattca	tcattttttt	tttattcttt	tttttgattt	cggtttcctt	gaaatttttt	2880
tgattcggta	atctccgaac	agaaggaaga	acgaaggaag	gagcacagac	ttagattggt	2940
atatatacgc	atatgtagtg	ttgaagaaac	atgaaattgc	ccagtattct	taacccaact	3000
gcacagaaca	aaaacctgca	ggaaacgaag	ataaatcatg	tcgaaagcta	catataagga	3060
acgtgctgct	actcatccta	gtcctgttgc	tgccaagcta	tttaatatca	tgcacgaaaa	3120
gcaaacaaac	ttgtgtgctt	cattggatgt	tcgtaccacc	aaggaattac	tggagttagt	3180

tgaagcatta ggtcccaaaa tttgtttact aaaaacacat gtggatatct tgactgattt	3240
ttccatggag ggcacagtta agccgctaaa ggcattatcc gccaaagtaca atttttttact	3300
cttcgaagac agaaaatttg ctgacattgg taatacagtc aaattgcagt actctgcggg	3360
tgtatacaga atagcagaat gggcagacat tacgaatgca cacggtgtgg tgggcccagg	3420
tattgttagc ggtttgaagc aggcggcaga agaagtaaca aaggaaccta gaggcctttt	3480
gatgttagca gaattgtcat gcaagggctc cctatctact ggagaatata ctaagggtag	3540
tgttgacatt gcgaagagcg acaaagattt tgttatcggc tttattgctc aaagagacat	3600
gggtggaaga gatgaagggt acgattgggt gattatgaca cccggtgtgg gtttagatga	3660
caaggagac gcattgggtc aacagtatag aaccgtggat gatgtggtct ctacaggatc	3720
tgacattatt attgttggaa gaggactatt tgcaaaggga agggatgcta aggtagaggg	3780
tgaacgttac agaaaagcag gctgggaagc atatttgaga agatgcggcc agcaaaacta	3840
aaaaactgta ttataagtaa atgcatgtat actaaactca caaattagag cttcaattta	3900
attatatcag ttattaccct atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat	3960
accgcatcag gaaattgtaa gcgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta	4020
aatcagctca ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga	4080
atagaccgag atagggttga gtgttgttcc agtttggaac aagagtccac tattaagaa	4140
cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga	4200
accatcacc taatcaagat aacttcgtat aatgtatgct atacgaacgg taccagtgat	4260
gatacaacga gtagccaag gtggcgcccg catthattgg agaaagataa catatcatac	4320
tttccccac ttttttcgag gctcttctat atcatattca taaattagca ttatgtcatt	4380
tctcataact actttatcac gtagaaatt acttattatt attaaattaa tacaaaattt	4440
agtaaccaa taaatataaa taaatatgca tattttaaatt ttaaaaaaa aatcctatag	4500
agcaaaagga ttctccatta taatatgagc tatacacctc ttacgcattt tttgagggtg	4560
gttacaacac cactcattca gaggtgtcg gcacagttgc ttccagcatc tggcgtccgt	4620
atgtatgggt gtattttaaa taataaaca agtgccacac cttcaccaat tatgtcttta	4680
agaaatggac aagttccaaa gagcttgccc aaggctcgac aaggatgtac tttagaatat	4740
ctatattcaa gtacgtggcg cgcatatgtt tgagtgtgca cacaataaag gttaattaat	4800
ctagagtcga cctgcaggca tgcaagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg	4860
tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa	4920
gcctggggtg cctaattgagt gagctaaact acattaattg cgttgcgctc actgcccgt	4980
ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga	5040

ggcgggtttgc	gtattgggcg	ctcttccgct	tcctcgctca	ctgactcgct	gcgctcggtc	5100
gttcgggctgc	ggcgagcggt	atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	5160
tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	5220
aaaaaggccg	cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	5280
aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgttt	5340
ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggatacctg	5400
tccgcctttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	5460
agttcgggtgt	aggtcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	5520
gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	acccggtaag	acacgactta	5580
tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cgaggatatgt	aggcggtgct	5640
acagagttct	tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atttgggtatc	5700
tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	5760
caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	5820
aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	tctacgggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	5880
aactcacgtt	aagggatttt	ggtcattgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	5940
ttaaattaaa	aatgaagttt	taaatcaatc	taaagtatat	atgagtaaac	ttgggtctgac	6000
agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	atctcagcga	tctgtctatt	tcgttcatcc	6060
atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	gggagggcct	accatctggc	6120
cccagtgctg	caatgatacc	gcgagaccca	cgctcaccgg	ctccagattt	atcagcaata	6180
aaccagccag	ccggaagggc	cgagcgcaga	agtggtcctg	caactttatc	cgcctccatc	6240
cagtctatta	attgttgccg	ggaagctaga	gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgccg	6300
aacgttgttg	ccattgctac	aggcatcgtg	gtgtcacgct	cgtcgttttg	tatggcttca	6360
ttcagctccg	gttcccaacg	atcaaggcga	gttacatgat	cccccatggt	gtgcaaaaaa	6420
gcggttagct	ccttcgggtcc	tccgatcgtt	gtcagaagta	agttggccgc	agtgttatca	6480
ctcatgggta	tggcagcact	gcataattct	cttactgtca	tgccatccgt	aagatgcttt	6540
tctgtgactg	gtgagtactc	aaccaagtca	ttctgagaat	agtgtatgcg	gcgaccgagt	6600
tgctcttgcc	cggcgtcaat	acgggataat	accgcgccac	atagcagaac	tttaaaagtg	6660
ctcatcattg	gaaaacgttc	ttcggggcga	aaactctcaa	ggatcttacc	gctgttgaga	6720
tccagttcga	tgtaaccac	tcgtgcaccc	aactgatctt	cagcatcttt	tactttcacc	6780
agcgtttctg	ggtgagcaaa	aacaggaagg	caaatgccg	caaaaaaggg	aataagggcg	6840
acacggaaat	gttgaatact	catactcttc	ctttttcaat	attattgaag	catttatcag	6900
ggttattgtc	tcatgagcgg	atacatattt	gaatgtattt	agaaaaataa	acaaataggg	6960

ES 2 735 024 T3

gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg	7020
acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtc	7063

REIVINDICACIONES

1. Una enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) diseñada que tiene al menos 90% de identidad a SEQ ID NO:195, en donde la enzima comprende al menos una sustitución en un residuo que corresponde a la posición 73 o 129 de SEQ ID NO:195.
- 5 2. La enzima GPD diseñada de la reivindicación 1, en donde la enzima comprende una sustitución que corresponde a la posición 73 de SEQ ID NO:195 y una sustitución que corresponde a la posición 129 de SEQ ID NO:195.
3. La enzima GPD diseñada de la reivindicación 1 o 2, que tiene al menos 95% de identidad a SEQ ID NO:195.
4. La enzima GPD diseñada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la K_M para NADH es de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 1 mM.
- 10 5. Un microorganismo recombinante que comprende la enzima GPD diseñada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el microorganismo comprende una ruta biosintética de alcohol que comprende al menos un gen que es heterólogo al microorganismo recombinante; en donde el microorganismo comprende una delección o disrupción de un gen endógeno que codifica GPD; en donde el microorganismo tiene una producción de alcohol mejorada en comparación con un microorganismo que carece de la enzima GPD diseñada, y en donde el
- 15 microorganismo es *Saccharomyces cerevisiae*.
6. Un método para la producción de alcohol usando la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) diseñada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el microorganismo recombinante de la reivindicación 5.

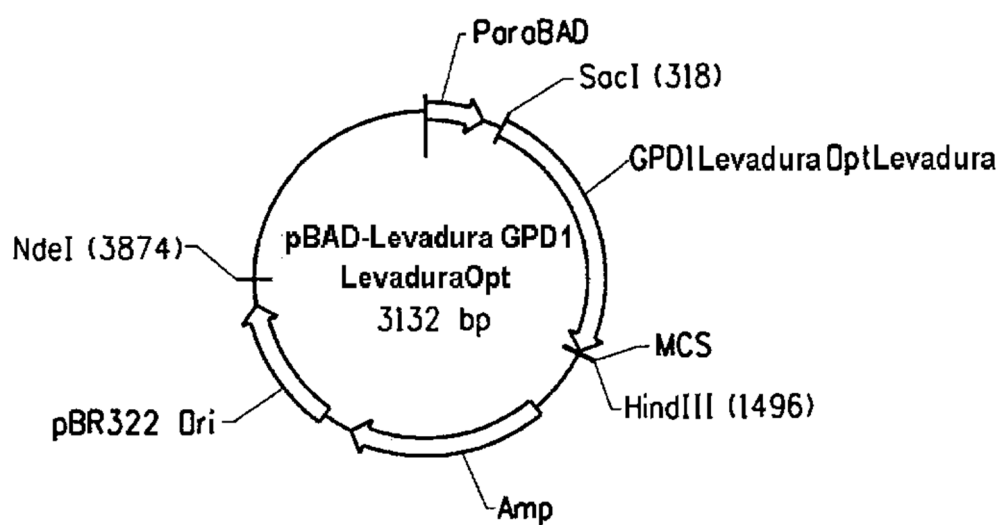


FIG. 1

FIG. 2

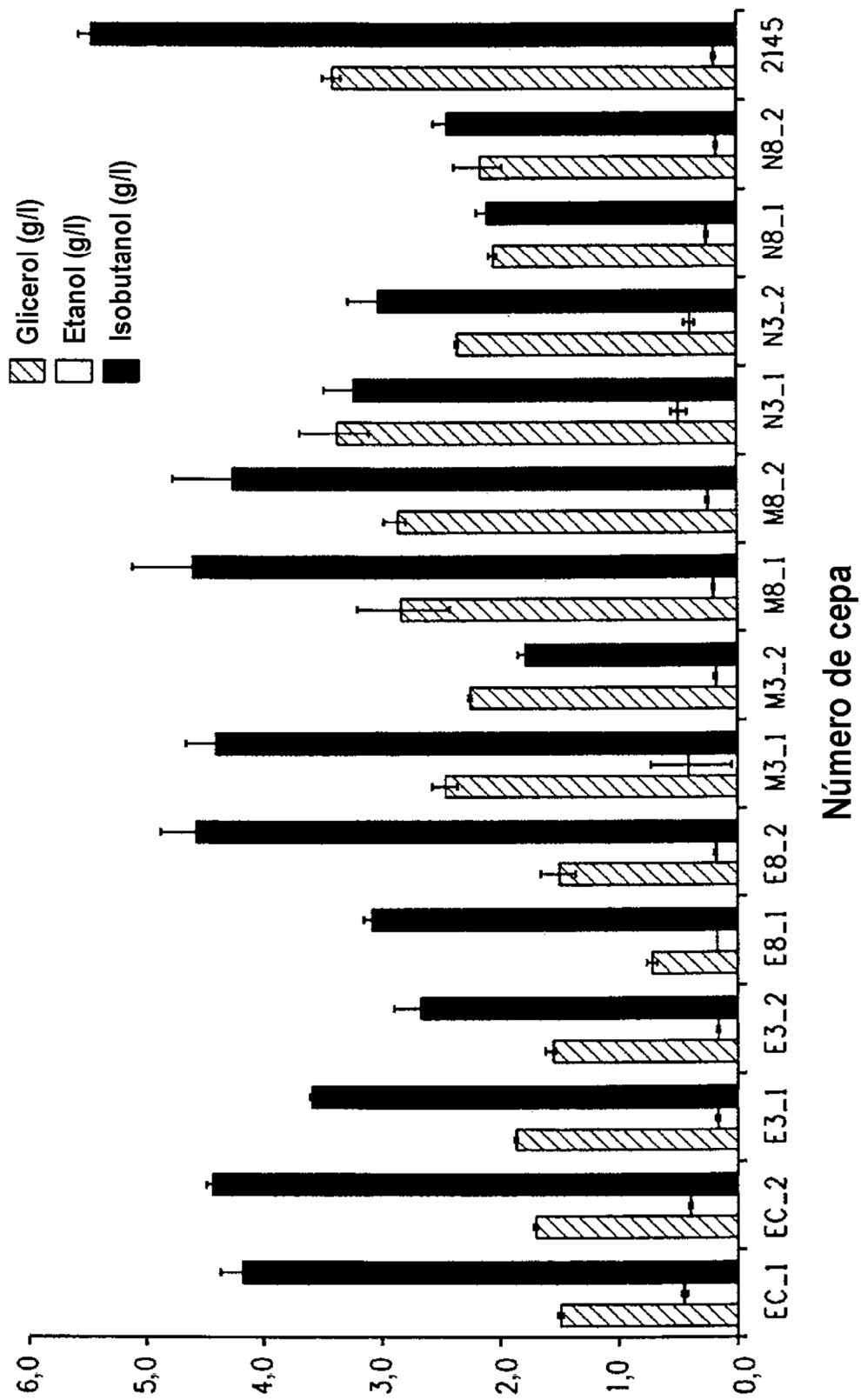


FIG. 3

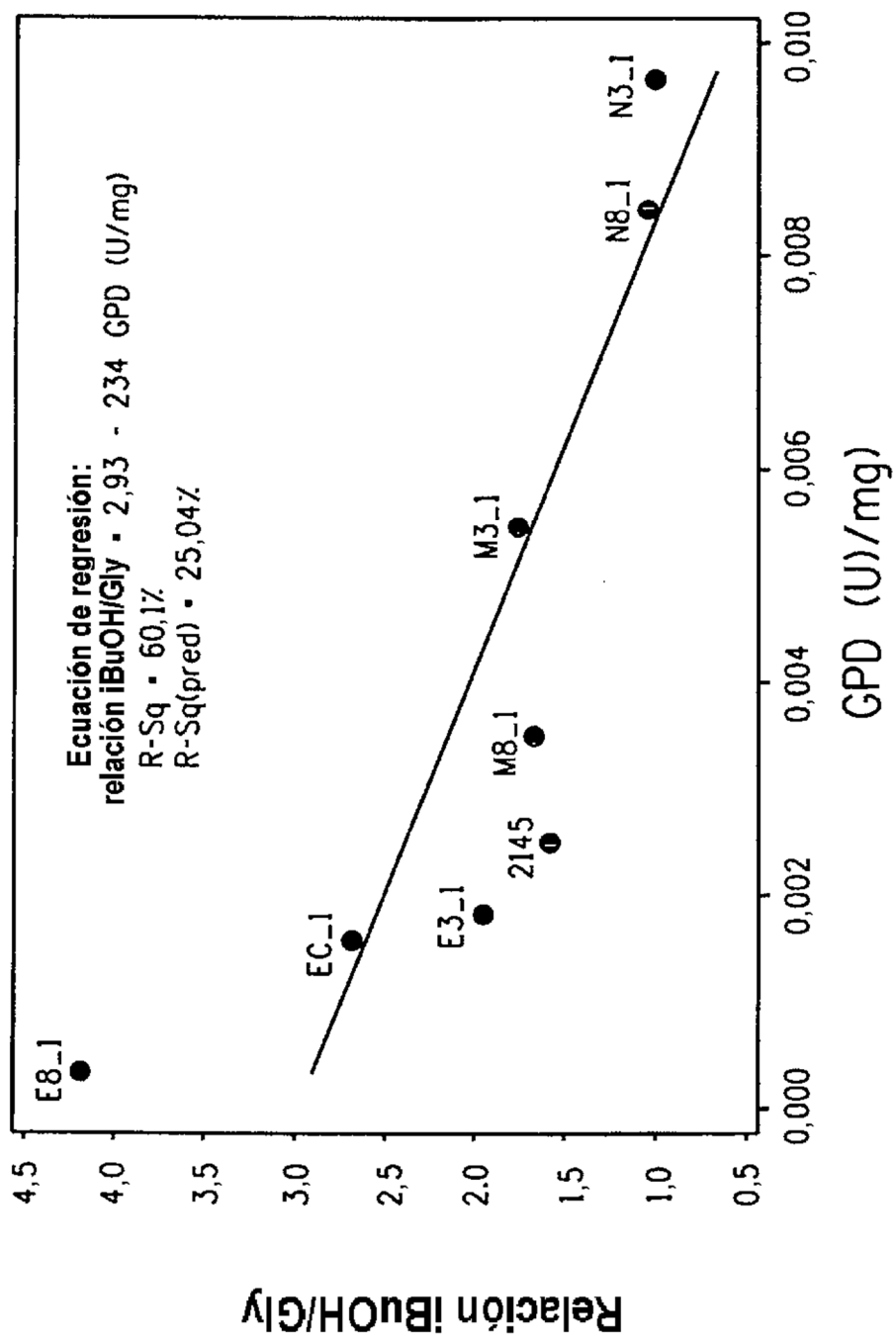


FIG. 4

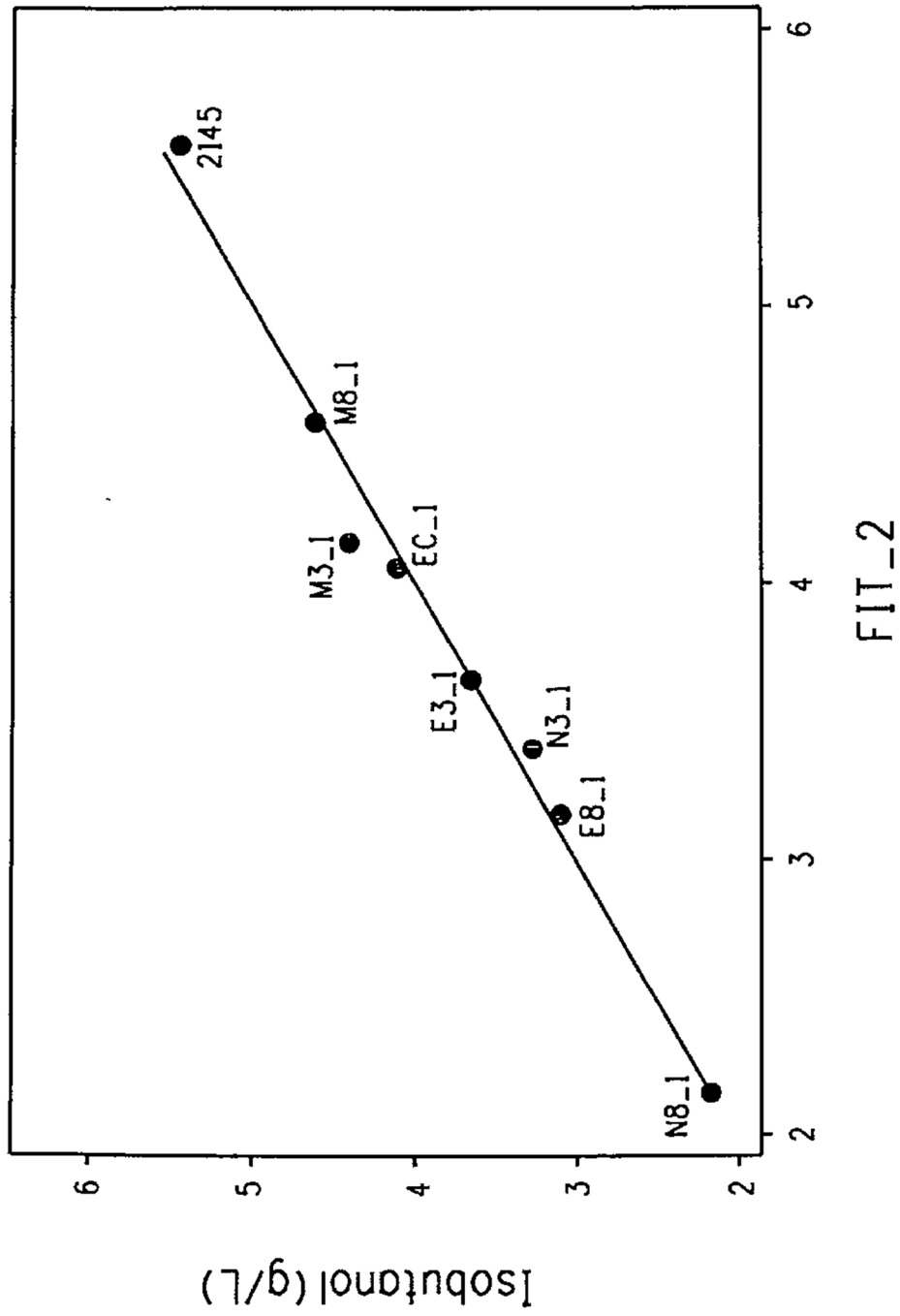


FIG. 5

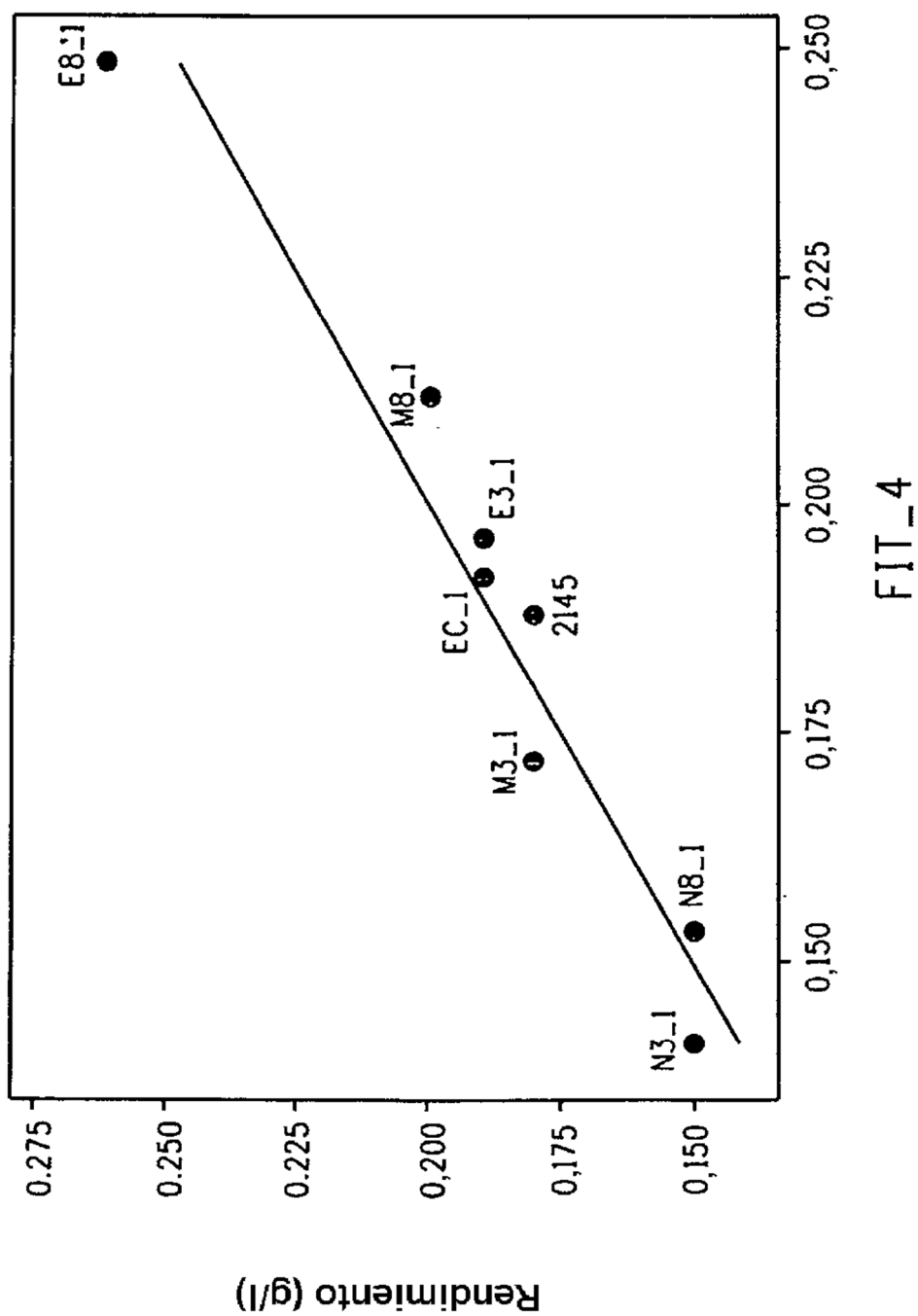


FIG. 6

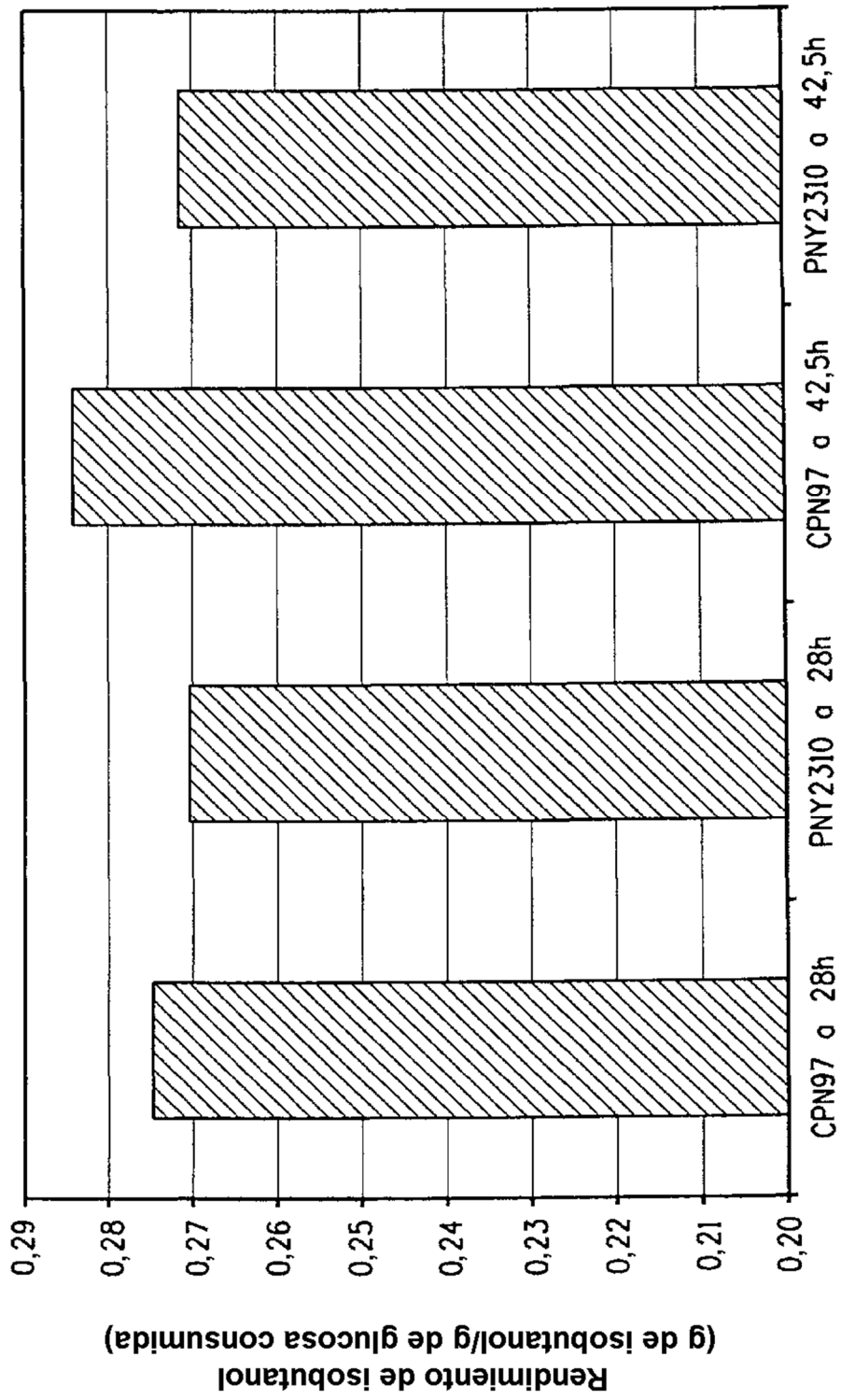


FIG. 7

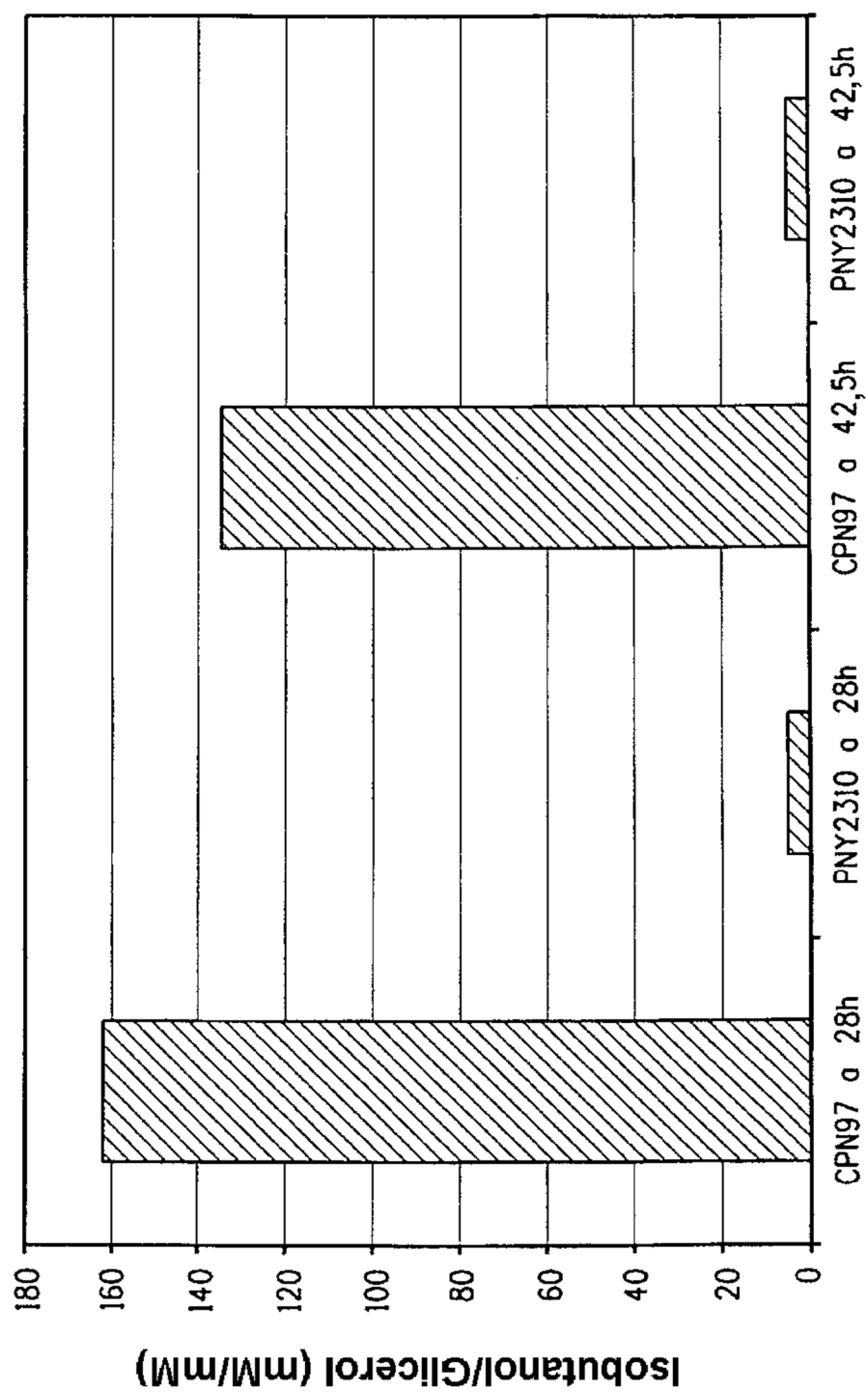


FIG. 8

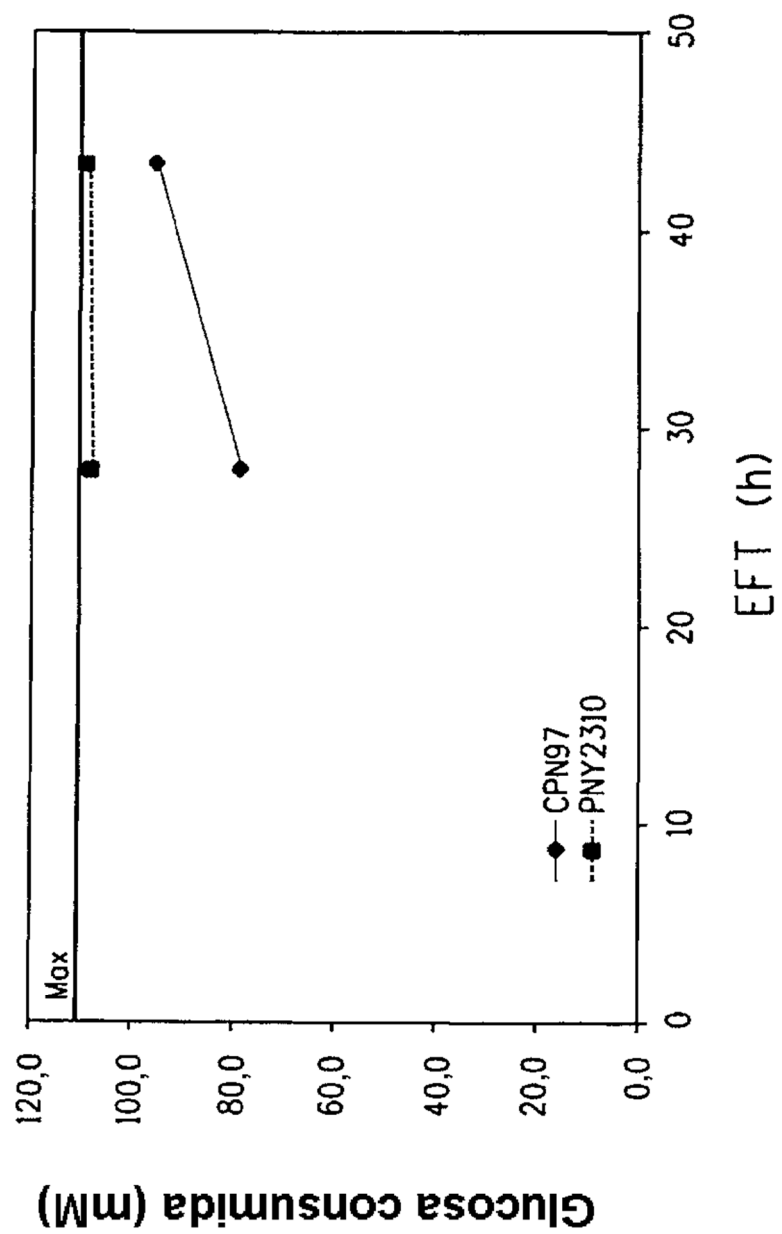


FIG. 9