

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 224**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12P 7/28 (2006.01)

C12R 1/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2010 PCT/EP2010/052244**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010 WO10121849**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2010 E 10704577 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2421960**

54 Título: **Células y procedimiento para la producción de acetona**

30 Prioridad:

23.04.2009 DE 102009002583

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2017

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**BECKER, ULRICH;
GRUND, GERDA;
ORSCHER, MATTHIAS;
DODERER, KAI;
LÖHDEN, GERD;
BRAND, GERD;
DÜRRE, PETER;
THUM, SIMONE;
BAHL, HUBERT JOHANNES;
FISCHER, RALF-JÖRG y
MAY, ANTJE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 639 224 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

Células y procedimiento para la producción de acetona

Campo de la invención

Es objeto de la invención un procedimiento para la producción de acetona.

5 Estado de la técnica

Proceso ABE en Clostridium

El proceso clásico de fermentación ABE, es decir, la producción microbiana de acetona, butanol y etanol, era durante mucho tiempo el segundo proceso biotecnológico a nivel mundial directamente tras la fermentación de etanol con levaduras. La fermentación ABE comercial comenzó en 1916 en Inglaterra, donde, entre otros, Chaim Weizmann, descubrió la aptitud de *Clostridium acetobutylicum* para la formación del disolvente acetona, butanol y etanol. El proceso se aplicó hasta finales de los años 50 en el mundo occidental, en Sudáfrica incluso hasta 1981.

Dos motivos principales son responsables de que se ajustara este proceso: por una parte, la síntesis química de acetona y butanol se hizo cada vez más conveniente, y por otra parte el precio de los substratos de fermentación aumentó en gran medida. Especialmente se elevó el precio de melaza debido a su empleo como aditivo a piensos para vacas.

Los costes crecientes de productos previos petroquímicos, así como de nuevas posibilidades tecnológicas en el campo de ingeniería de vías de microorganismos exploran ahora nuevas opciones para el desarrollo de cepas de alto rendimiento y procesos de fermentación comerciales para la producción de disolventes, como acetona.

La fermentación ABE clásica se basa en el organismo *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*. Ambos son Gram-positivos y se propagan bajo condiciones estrictamente anaerobias. Estos organismos pueden transformar mono-, di- y polisacáridos, siendo melaza y almidón los substratos empleados principalmente en la fermentación.

El proceso de fermentación con *C. acetobutylicum* se subdivide en dos fases. En la primera fase, la formación de biomasa va acompañada de la formación de acetato, butirato y trazas de etanol ("fase acidógena"). En la segunda fase, la denominada "fase solventogénica" se utilizan los ácidos para formar los productos de fermentación acetona, butanol y etanol (ABE). Los productos acetona, butanol y etanol se forman en el tipo salvaje *C. acetobutylicum* en proporción de aproximadamente 3 : 6 : 1. Esta proporción de producto se puede variar en gran medida según condiciones de cultivo seleccionadas (por ejemplo pH o alimentación de nutrientes), o substratos empleados.

Los enzimas de la biosíntesis de disolventes de acetona, butanol y etanol son sensiblemente puros y están caracterizados desde el punto de vista bioquímico (véase figura 1; Duerre, P., y Bahl, H. 1996. Microbial production of acetone/butanol/isopropanol. En: Biotechnology, vol. 6, 2nd ed. M. Roehr, (ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany. páginas 229-268. Duerre, P. 1998. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 639-648.). También se presenta la secuencia genómica de *C. acetobutylicum* (Noelling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V. & 16 other authors (2001). Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. J Bacteriol 183, 4823-4838.).

Se generaron ya cepas de *Clostridium acetobutylicum*, en las que la producción de acetona es independiente de la producción de butanol y etanol, de modo que estas cepas producen solo acetona (Mermelstein et al. (1993). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic operon. Biotech. Bioeng. 42:1053-1060.; Nair, R.V., and Papoutsakis, E.T. 1994). Los títulos medidos para acetona se situaban en principio bajo las concentraciones de las del tipo salvaje.

En la figura 2 se representa la vía metabólica clásica, caracterizada en *Clostridium*, para la síntesis de acetona. Esta vía parte de Acetyl-CoA, un metabolito central, que se forma en todos los microorganismos, independientemente de la fuente de C que se metaboliza o de las vías metabólicas que se establecen. Son enzimas que se requieren: la β -cetotiolasa, las dos subunidades de acetil-CoA/butiril-CoA-transferasa, y la acetoacetato-decarboxilasa.

Se pudo mostrar que la expresión heteróloga de estas enzimas de *C. acetobutylicum* en *Escherichia coli*, que catalizan la formación de acetona partiendo de acetil-CoA (acetoacetato-decarboxilasa, acetil-CoA/butiril-CoA-transferasa y tiolasa), conduce a una formación de acetona en este organismo de aproximadamente 150 mM, produciéndose también, no obstante, cantidades elevadas de acetato (50 mM) de modo desfavorable (Bermejo L. L., N. E. Welker, E. T. Papoutsakis. 1998. Expression of Clostridium acetobutylicum ATCC 824 Genes in Escherichia coli for Acetone Production and Acetate Detoxification. Appl. Env. Microbiol. 64:1079-1085).

En este caso, un inconveniente ulterior consiste en que la acetona se produjo solo bajo condiciones aerobias, ya que los equivalentes redox, que se producen durante la metabolización de glucosa para dar acetil-CoA, no se pueden reoxidar bajo condiciones anaerobias.

Todos los procedimientos descritos es común que requieren fuentes de carbono desfavorablemente complejas, como por ejemplo azúcar.

Células acetógenas

Son conocidas células acetógenas, es decir, células que son aptas para formar acetato por medio de respiración anaerobia.

A las bacterias acetógenas pertenecen, por ejemplo, tipos de la especie *Acetobacterium*, como *A. woodii* y *Clostridium aceticum*.

El documento WO0068407 describe el empleo de bacterias acetógenas para la producción de etanol.

Recientemente también se presenta la secuencia genómica de *C. ljungdahli*. De *C. aceticum* y *C. carboxidivorans* no se ha publicado aún una secuencia genómica. Sin embargo se sabe que *C. aceticum* porta adicionalmente un plásmido (5,6 kBp, Lee *et al.*, 1987). Actualmente no se han publicado técnicas para modificar genéticamente estos organismos.

El grupo de bacterias acetógenas pertenece a las procariotas anaerobias, que pueden utilizar CO₂ como aceptor de electrones terminal y forman acetato en este caso. Actualmente se cuentan 21 especies diferentes entre los acetógenos (Drake *et al.*, 2006), a las que pertenecen también algunos Clostridios (Drake & Küsel, 2005). Éstas son aptas para utilizar dióxido de carbono más hidrógeno, o también monóxido de carbono, como fuente de carbono y energía (Wood, 1991). Además, también se pueden utilizar alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos, así como numerosas hexosas como fuente de carbono (Drake *et al.*, 2004). La vía metabólica reductiva, que conduce a la formación de acetato, se denomina acetil-CoA-o vía de Wood-Ljungdahl.

Era tarea de la invención poner a disposición un procedimiento con el que se pudiera producir acetona a partir de fuentes de carbono disponibles de manera ubicua.

Descripción de la invención

Sorprendentemente se descubrió que el procedimiento descrito a continuación soluciona la tarea de la invención.

Es objeto de la presente invención un procedimiento para la producción de acetona como se describe en la reivindicación 1.

Una ventaja de la invención consiste en que las células se pueden cultivar en condiciones anaerobias y, por lo tanto, de modo especialmente conveniente desde el punto de vista energético.

Otra ventaja de la invención consiste en que las células según la invención contribuyen a una reducción de dióxido de carbono, nocivo para el clima.

Otra ventaja de células según la invención es un aumento de rendimiento mediante producción de acetona a partir de dióxido de carbono e hidrógeno.

Es objeto de la presente invención una célula acetógena que sea capaz de formar acetona.

En relación con la presente invención, bajo el concepto "células acetógenas" se entiende células que son aptas para formar acetato por medio de respiración anaerobia.

Todos los porcentajes indicados son porcentajes en peso si no se indica lo contrario.

5 En el caso de las células acetógenas se trata preferentemente de una célula aislada, en especial de una célula modificada mediante técnica génica. Según la invención es preferente una célula que es capaz de formar acetona a partir de al menos una fuente de carbono seleccionada a partir del grupo que comprende dióxido de carbono y monóxido de carbono. De modo especialmente preferente, la célula acetógena según la invención es capaz de formar acetona a partir de monóxido de carbono y dióxido de carbono.

10 Es suficientemente sabido por el especialista que, con ayuda de técnica génica recombinante, se pueden mejorar rendimientos de producto en sistemas biológicos. Por lo tanto, según la invención es además preferente que la célula acetógena se modificara frente a su tipo salvaje mediante técnica génica, de modo que sea capaz de formar más acetona en comparación con su tipo salvaje.

La formulación "que sea capaz de formar más acetona en comparación con su tipo salvaje" se refiere también al caso en el que el tipo salvaje de la célula modificada mediante técnica génica no sea capaz de formar acetona en absoluto, al menos cantidades identificables de este compuesto, y solo tras la modificación mediante técnica génica se pueden formar cantidades identificables de este componente.

15 Se denomina un "tipo salvaje" de una célula preferentemente una célula cuyo genoma se presenta en un estado como es objeto de la presente invención. Un procedimiento para la producción de acetona, que comprende los pasos de procedimiento:

- 20 A) puesta en contacto de una célula acetógena, que es capaz de formar acetona, con un medio nutriente que contiene al menos una fuente de carbono seleccionada a partir del grupo que comprende dióxido de carbono y monóxido de carbono;
B) cultivo de la célula bajo condiciones que posibiliten formar acetona a la célula;
C) en caso dado aislamiento de la acetona formada,

caracterizado por que la célula presenta una actividad acrecentada en comparación con su tipo salvaje de al menos uno de los siguientes enzimas:

25 un enzima E1, que cataliza la reacción de acetil-coenzima A para dar acetoacetil-coenzima A;

un enzima E2, que cataliza la reacción de acetoacetil-coenzima A para dar acetoacetato;

un enzima E3, que cataliza la reacción de acetoacetato para dar acetona,

por que la célula procedente de al menos una fuente de carbono, seleccionada a partir del grupo que contiene dióxido de carbono y monóxido de carbono, es capaz de formar acetona, y

30 por que la célula se modificó mediante técnica génica frente a su tipo salvaje, de modo que sea capaz de formar más acetona en comparación con su tipo salvaje.

En relación con la presente invención, bajo el concepto "células acetógenas" se entiende células que son aptas para formar acetato por medio de respiración anaerobia. Todos los porcentajes indicados son porcentajes en peso si no se indica lo contrario.

35 En el caso de las células acetógenas se trata preferentemente de una célula aislada, en especial de una célula modificada mediante técnica génica. Según la invención es preferente una célula que es capaz de formar acetona a partir de al menos una fuente de carbono seleccionada a partir del grupo que comprende dióxido de carbono y monóxido de carbono. De modo especialmente preferente, la célula acetógena según la invención es capaz de formar acetona a partir de monóxido de carbono y dióxido de carbono.

40 Es suficientemente sabido por el especialista que, con ayuda de técnica génica recombinante, se pueden mejorar rendimientos de producto en sistemas biológicos. La célula acetógena se modificó mediante técnica génica frente a su tipo salvaje, de modo que sea capaz de formar más acetona en comparación con su tipo salvaje.

45 La formulación "que sea capaz de formar más acetona en comparación con su tipo salvaje" se refiere también al caso en el que el tipo salvaje de la célula modificada mediante técnica génica no sea capaz de formar acetona en absoluto, al menos cantidades identificables de este compuesto, y solo tras la modificación mediante técnica génica se pueden formar cantidades identificables de este componente.

Se denomina un “tipo salvaje” de una célula preferentemente una célula cuyo genoma se presenta en un estado como se ha producido naturalmente debido a la evolución. El concepto se emplea tanto para la célula total, como también para algunos genes. Por lo tanto, no corresponden al concepto “tipo salvaje” en especial aquellas células, o bien aquellos genes cuyas secuencias génicas se han modificado al menos parcialmente por el hombre mediante procedimientos recombinantes.

Estas células son modificadas mediante técnica génica, de modo que puedan formar más acetona a partir de una fuente de carbono en comparación con su tipo salvaje.

Es este caso, según la invención es preferente que la célula acetógena sea modificada mediante técnica génica, de modo que, en un intervalo de tiempo definido, preferentemente en el intervalo de 2 horas, de modo aún más preferente en el intervalo de 8 horas, y en el más preferente de los casos en el intervalo de 24 horas, forme al menos el doble, de modo especialmente preferente al menos 10 veces, además preferentemente al menos 100 veces, además de modo aún más preferente al menos 1000 veces, y en el más preferente de los casos al menos 10 000 veces más acetona que el tipo salvaje de la célula. En este caso, el aumento de la formación de producto se puede determinar, a modo de ejemplo, cultivándose en un medio nutriente apropiado la célula según la invención y la célula de tipo salvaje, respectivamente por separado bajo las mismas condiciones (misma densidad celular, mismo medio nutriente, mismas condiciones de cultivo) durante un intervalo de tiempo determinado, y determinándose a continuación la cantidad de producto objetivo (acetona) en el medio nutriente.

La célula presenta una actividad acrecentada en comparación con su tipo salvaje de al menos uno de los siguientes enzimas:

un enzima E_1 , que cataliza la reacción de acetil-coenzima A para dar acetoacetil-coenzima A;

un enzima E_2 , que cataliza la reacción de acetoacetil-coenzima A para dar acetoacetato;

un enzima E_3 , que cataliza la reacción de acetoacetato para dar acetona.

Bajo la formulación empleada anteriormente y en las explicaciones siguientes “una actividad de un enzima E_x acrecentada en comparación con su tipo salvaje” siempre se debe entender preferentemente una actividad del respectivo enzima E_x acrecentada en un factor de al menos 2, de modo especialmente preferente de al menos 10, además preferentemente de al menos 100, además de modo aún más preferente de al menos 1000, y en el más preferente de los casos de al menos 10 000. Además, la célula según la invención, que presenta “una actividad de un enzima E_x acrecentada en comparación con su tipo salvaje”, comprende en especial también una célula cuyo tipo salvaje no presenta una actividad, o al menos una actividad identificable, de este enzima E_x , y que muestra una actividad identificable de este enzima E_x solo tras aumento de la actividad enzimática, a modo de ejemplo debido a sobreexpresión. En este contexto, el concepto “sobreexpresión”, o la formulación “aumento de la expresión” empleada en las siguientes explicaciones, comprende también el caso en el que una célula de partida, a modo de ejemplo una célula de tipo salvaje, no presente una expresión, o al menos una expresión identificable, y se induzca una expresión identificable del enzima E_x solo mediante procedimientos recombinantes.

En este contexto, son células especialmente preferente aquellas en las que está aumentada la actividad del siguiente enzima, o bien de los siguientes enzimas: E_1 , E_2 , E_3 , $E_1 + E_2$, $E_1 + E_3$, $E_2 + E_3$, $E_1 + E_2 + E_3$, siendo especialmente preferente $E_1 + E_2 + E_3$.

Además, según la invención es preferente que en el caso del enzima E_1 se trate de una acetil-CoA-C-acetiltransferasa (EC 2.3.1.9); en el caso del enzima E_2 se trata de una butirato-acetoacetato-CoA-Transferase (EC 2.8.3.9) o de una acil-CoA-hidrolasa (EC 3.1.2.20); en el caso del enzima E_3 se trata de una acetoacetato-decarboxilasa (EC 4.1.1.4);

el enzima empleado como enzima E_1 de modo especialmente preferente es *thlA* de *Clostridium acetobutylicum*.

Butirato-acetoacetato-CoA-transferasas empleadas de modo especialmente preferente como enzima E_2 son *ctfA* y *ctfB* de *Clostridium acetobutylicum* y *atoD* y *atoA* de *Escherichia coli*. Acil-CoA hidrolasas empleadas de modo especialmente preferente como enzima E_2 son *tell* de *B. subtilis*, o bien *ybgC* de *Haemophilus influenzae*. El enzima empleado de modo especialmente preferente como enzima E_3 es *adc* de *Clostridium acetobutylicum*.

Una célula acetógena según la invención es preferentemente un microorganismo, preferentemente una bacteria, y de modo especialmente preferente una bacteria anaerobia, en especial una bacteria en forma de vara, grampositiva.

De modo muy especialmente preferente se emplean células acetógenas seleccionadas a partir del grupo que comprende *Thermoanaerobacter kivui*, *Acetobacterium woodii*, *Acetoanaerobium notera*, *Clostridium aceticum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Moorella thermoacetica*, *Eubacterium limosum*, *Peptostreptococcus productus*, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium carboxidivorans*. Una bacteria especialmente apropiada es *Clostridium carboxidivorans*, en especial aquellas cepas como "P7" y "P11". Tales células se describen, a modo de ejemplo, en los documentos US 2007/0275447 y US 2008/0057554.

Otra bacteria especialmente apropiada es *Clostridium ljungdahlii*, en especial cepas seleccionadas a partir del grupo que comprende *Clostridium ljungdahlii* PETC, *Clostridium ljungdahlii* ER12, *Clostridium ljungdahlii* C01 y *Clostridium ljungdahlii* O-52 y se describen en los documentos WO 98/00558 y WO 00/68407.

La célula acetógena según la invención es capaz de formar acetona a partir de al menos una fuente de carbono seleccionada a partir del grupo que contiene dióxido de carbono y monóxido de carbono, preferentemente bajo condiciones anaerobias.

Respecto a la fuente de estos sustratos es evidente que existen muchas posibles fuentes para la puesta a disposición de CO, o bien CO₂, como fuente de carbono. Es obvio que en la práctica se puede emplear como fuente de carbono de la presente invención cualquier gas, o bien cualquier mezcla gaseosa que sea apta para abastecer la célula acetógena de cantidades suficientes de carbono, para que ésta sea capaz de realizar esta respiración anaerobia y formar acetona.

En el procedimiento según la invención es preferente que la fuente de carbono se ponga a disposición mediante gases de escape, como por ejemplo gas de síntesis, gas de humo, gases de escape de refinerías de petróleo, gases producidos mediante fermentación de levaduras o fermentación clostridiana, gases de escape de la gasificación de materiales que contienen celulosa, o de la gasificación de carbono.

Estos gases de escape no se tienen que haber producido necesariamente como fenómenos secundarios de otros procesos, sino que se pueden producir adicionalmente para el empleo en el procedimiento según la invención.

Es evidente que en la práctica se puede emplear como fuente de carbono de la presente invención cualquier gas de escape que sea apto para abastecer la célula acetógena con cantidades suficientes de carbono, para que ésta pueda realizar su respiración anaerobia.

En un acondicionamiento preferente del procedimiento según la invención, la fuente de carbono es gas de síntesis.

Se puede poner a disposición gas de síntesis, por ejemplo, a partir del producto secundario de gasificación de carbono. Por consiguiente, la célula acetógena transforma una sustancia, que es un producto de desecho, en una valiosa materia prima.

Alternativamente, se puede poner a disposición gas de síntesis mediante la gasificación de materias primas bastante disponibles, económicas, agrícolas, para el procedimiento según la invención.

Existen numerosos ejemplos de materias primas que se pueden transformar en gas de síntesis, ya que casi todas las formas de vegetación se pueden utilizar con este fin. Se seleccionan materias primas preferentes a partir del grupo que comprende hierbas perennes, como Chinaschilf, residuos de cereales, desechos de elaboración, como serrín.

En general se obtiene gas de síntesis en una instalación de gasificación a partir de biomasa desecada, en principio mediante pirólisis, oxidación parcial y reformado con vapor, siendo los productos primarios CO, H₂ y CO₂.

Normalmente se elabora una parte del gas producto para optimizar rendimientos de producto y evitar la formación de alquitrán. El craqueado de alquitran no deseado en gas de síntesis y CO se puede llevar a cabo bajo empleo de cal y/o dolomita. Estos procesos se describen en detalle, por ejemplo, en Reed, 1981 (Reed, T.B., 1981, Biomass gasification: principles and technology, Noves Data Corporation, Park Ridge, NJ.)

También se pueden emplear mezclas de diversas fuentes como fuente de carbono.

Los medios nutrientes empleados en el procedimiento según la invención deben cumplir de modo apropiado los requisitos de la respectiva cepa. Se incluyen descripciones de medios nutrientes de diversos microorganismos en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981).

Además de las fuentes de carbono, el medio nutriente contiene en especial nitrógeno y fuentes de fósforo, sales, así como agentes para el control de pH.

5 Como fuente de nitrógeno se pueden emplear compuestos orgánicos nitrogenados, como peptonas, extracto de levadura, extracto de pescado, extracto de malta, agua de remojo de maíz, harina de habas de soja y urea, o compuestos inorgánicos, como sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico y nitrato amónico. Las fuentes de nitrógeno se pueden emplear por separado o como mezcla.

10 Como fuente de fósforo pueden estar contenidos ácido fosfórico, dihidrogenofosfato potásico o hidrogenofosfato dipotásico, o las correspondientes sales que contienen sodio, en el medio nutriente. El medio de cultivo debe contener además sales de metales, como por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarios para el crecimiento. Finalmente se pueden emplear sustancias de crecimiento esenciales, como aminoácidos y vitaminas, adicionalmente a las sustancias citadas anteriormente.

Las citadas sustancias de empleo se pueden añadir al cultivo en forma de una única carga, o alimentar de modo apropiado durante el cultivo.

15 Para el control de pH del cultivo se emplean compuestos básicos, como hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoníaco, o bien agua amoniacal, o compuestos ácidos, como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, de modo apropiado. Para el control del espumado se pueden emplear agentes antiespumantes, como por ejemplo poliglicolésteres de ácidos grasos. Para el mantenimiento de la estabilidad de plásmidos se pueden añadir al medio sustancias de acción selectiva apropiadas, como por ejemplo antibióticos.

20 En el paso de procedimiento B) del procedimiento según la invención se cultivan las células acetógenas bajo condiciones que posibilitan formar acetona. Este cultivo tiene lugar preferentemente bajo condiciones anaerobias.

En este caso, las células según la invención, modificadas mediante técnica génica, se pueden poner en contacto, y por consiguiente cultivar con el medio nutriente continua o discontinuamente en procedimiento por cargas (cultivo discontinuo) o en procedimiento de cargas de alimentación (procedimiento de alimentación), o procedimiento de carga de alimentación reiterada (procedimiento de alimentación repetitiva) para la producción de acetona.

25 También es concebible un procedimiento semicontinuo, como se describe en el GB-A-1009370. Se describe una sinopsis sobre métodos de cultivo conocidos en el manual de Chmiel ("Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik" (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el manual de Storhas ("Bioreaktoren und periphere Einrichtungen", editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994).

30 Se describen otros procedimientos convenientemente apropiados para el cultivo de la célula acetógena en el paso de procedimiento b), por ejemplo, en el informe DOE "Bench-scale Demonstration of Biological Production of Ethanol from Coal Synthesis Gas", Topical Report 5, Noviembre 1995 (DOE Contract Number DE-AC22-92PC92118) y en los documentos WO 98/00558, WO 00/68407 y WO 02/08438.

35 En el paso C) del procedimiento según la invención se puede aislar la acetona formada mediante las células, en caso dado a partir de las células y/o del medio nutriente, entrando en consideración para el aislamiento todos los métodos conocidos por el especialista para el aislamiento de sustancias de bajo peso molecular a partir de composiciones complejas.

40 En este punto cítense de manera ejemplar la precipitación por medio de disolventes apropiados, la extracción por medio de disolventes apropiados, la complejación, a modo de ejemplo por medio de ciclodextrinas o derivados de ciclodextrina, la cristalización, la purificación, o bien aislamiento por medio de métodos cromatográficos, o la transformación de acetona en derivados fácilmente separables.

Para el empleo en el paso de procedimiento C) son apropiados en especial procedimientos de separación destilativos.

45 La invención se describe de manera ejemplar en los ejemplos indicados a continuación, sin que la invención, cuya amplitud de aplicación resulta de la descripción total y las reivindicaciones, deba estar limitada a las formas de realización citadas en los ejemplos.

Las siguientes figuras son componente de la manifestación:

Figura 1: vía biosintética del proceso ABE clásico, clostridiano.

Figura 2: vía biosintética de acetona en *C. acetobutylicum*

Figura 3: mapa plasmídico pUC_adc_ctfAB_thIA:

Figura 4: mapa plasmídico pIMP_adc_ctfAB_thIA:

Ejemplos:

5 Ejemplo 1. Clonación de vectores de expresión

Para la producción de acetona en células acetógenas se llevaron a cabo las clonaciones en *E. coli* XL2 blue. A tal efecto se elaboraron los genes *ctfA* y *ctfB* de *Clostridium acetobutylicum*, o bien *atoA* y *atoD* de *E. coli*, o bien *tell* de *B. subtilis*, así como, o bien *ybgC* de *Heamophilus influenzae* junto con los genes *thIA* y *adc* de *C. acetobutylicum* sobre el plásmido pIMP1 (Mermelstein et al., 1992).

10 En la tabla 1 se recoge una sinopsis sobre los correspondientes plásmidos de expresión.

Tabla 1: plásmidos

Plásmido	CoA-transferasa/tioesterasa de	Seq ID No
pIMP_adc_ctfAB_thIA	<i>C. acetobutylicum</i>	13
pIMP_adc_atoDA_thIA	<i>E. coli</i>	14
pIMP_adc_tell_thIA	<i>B. subtilis</i>	15
pIMP_adc_ybgC_thIA	<i>H. influenzae</i>	16

La clonación de los genes se efectuó secuencialmente. A tal efecto, en primer lugar se diseñaron oligonucleótidos (tabla 2) para la amplificación de los genes, bajo introducción de puntos de corte correspondiente, y a continuación se amplificaron todos los fragmentos.

15

Tabla 1: oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5' → 3')*	Punto de corte	Seq ID No
adc fw	GGAAGGTACCTTTTATG	Acc65I	1
adc rev	GTAACCTCTGAATTCTATTACTTAAG	EcoRI	2
atoDA fw	CACAACGGTGGATCCAAGAG	BamHI	3
atoDA rev	CGCGATATGGTACCAATCAT	Acc65I	4
ctfAB fw	GAATTTAAAAGGAGGGATCCAAATGAAC	BamHI	5
ctfAB rev	GTTTCATAGTATTGGTACCTAAACAGC	Acc65I	6

Nombre	Secuencia (5' → 3')*	Punto de corte	Seq ID No
<i>thl fw</i>	CTCAGG TCTGACT TTCAAGAAG	<i>Sall</i>	7
<i>thl rev</i>	CAGAGTTATTTTAA GGATCCT TTTCTAGC	<i>BamHI</i>	8
<i>tell fw</i>	CAATTGG GATCC GATAACAATTTACACAG	<i>BamHI</i>	9
<i>tell rev</i>	GAGATCT GGTACCC GGTTAAATGATCGGA	<i>Acc65I</i>	10
<i>ybgc fw</i>	CTCTAGA AGGATCCT GTTTAACTTTAAG	<i>BamHI</i>	11
<i>ybgc rev</i>	ATTGG GTACCT CATTGCATACTCCG	<i>Acc65I</i>	12

Los fragmentos correspondientes se amplificaron del ADN genómico por medio de métodos PCR convencionales, se separaron por electroforesis y se purificaron.

Generación de pUC_adc_ctfAB_thIA:

- 5 En el primer paso se clonó *adc* a través de los puntos de corte *Acc65I* y *EcoRI* en el vector pUC18 y a continuación se añadió *thIA* a través de *Sall* y *BamHI*. En el último paso se clonaron *ctfA* y *ctfB* en un paso, ya que está organizado como operón en *C. acetobutylicum*, a través de los puntos de corte *BamHI* y *Acc65I*. En el vector resultante de ello pUC_adc_ctfAB_thIA se presentan ahora los genes necesarios para la producción de acetona en un operón.
- 10 La figura 3 muestra el plásmido pUC resultante.

Generación de pIMP_adc_ctfAB_thIA:

A continuación se efectuó la reclonación del cassette génico en el vector pIMP1 a través de la endonucleasa de restricción *Sall* y *EcoRI*, de lo que resultó el plásmido de expresión pIMP_adc_ctfAB_thIA, véase la figura 4.

Generación de pIMP_adc_atoDA_thIA, pIMP_adc_tell_thIA y pIMP_adc_ybgC_thIA:

- 15 Para la generación de los vectores pIMP_adc_atoDA_thIA, pIMP_adc_tell_thIA y pIMP_adc_ybgC_thIA se cortaron los genes *ctfA* y *ctfB* a partir del vector pIMP_adc_ctfAB_thIA a través de los puntos de corte *BamHI* y *Acc65I*. Se amplificaron *atoD* y *atoA*, que están organizados en *E. coli* en un operón, y del mismo modo los genes *tell* de *B. subtilis* y *ybgC* de *H. influenzae*, generándose los puntos de corte *BamHI* y *Acc65I*.
- 20 Estos fragmentos se clonaron en primer lugar de este modo en el vector pDrive (*atoDA*), o bien pUC19 (*tell* y *ybgC*). A continuación se efectuó la reclonación de estos genes a partir de los vectores pDrive, o bien pUC, para lo cual se cortaron los cassettes génicos a través de los puntos de corte *BamHI* y *Acc65I*, se purificaron y se ligaron en el esqueleto vectorial restringido como se describe anteriormente (*Acc65I* y *BamHI*) y purificado de pIMP_adc_ctfAB_thIA.

Ejemplo 2: síntesis de acetona en *E. Coli*

- 25 Todas las variantes de plásmido obtenidas (véase tabla 1) se examinaron sobre la formación de acetona para el control sobre funcionalidad en la cepa de clonación de *E. coli* XL2-blue. Los análisis se efectuaron en escala de 100 ml en medio TY con ampicilina (100 µg/ml). Tras inoculación a partir de cultivos previos correspondientes a una densidad óptica (600 nm) de 0,1 se efectuó una incubación a 37 °C y 150 Upm. La densidad óptica se siguió mediante fotometría, y en determinados momentos se extrajeron muestras durante un intervalo de tiempo de
- 30 aproximadamente 50 h, y se determinó la concentración de acetona y acetato en el exceso de medio exento de

células mediante cromatografía de gases. En este caso se mostró que, con la combinación de genes clostridianos (*thlA* y *adc*) con *atoDA* de *E. coli* se produjeron hasta 80 mM de acetona. Con genes puramente clostridianos (*thlA*, *ctfAB*, *adc*) se produjeron 5 mM de acetona y con las combinaciones genes clostridianos (*thlA* y *adc*) con *tell* de *B. subtilis*, o bien *ybgC* de *H. influenzae* se produjo 1 mM de acetona.

5 Ejemplo 3: producción de acetona acetógena

Según cepa de clostridio empleada se emplearon diferentes medios:

Para la producción de los medios para *C. Carboxidivorans*, o bien *C. ljungdhalii* se pesaron los productos químicos, se disolvieron en agua y a continuación se ajustó el valor de pH. Adicionalmente se añadió el indicador redox resazurina (1 mg/l), para poder examinar finalmente el potencial redox, y por consiguiente el contenido en oxígeno. A continuación se llevaron los medios a ebullición en una estufa y se enfriaron los mismos en baño de hielo. Entre tanto se efectuó la gasificación con nitrógeno para eliminar el oxígeno disuelto. A continuación se introdujeron los medios en la cámara anaerobia, se ajustó el volumen final con agua anaerobia, se envasó y se cerró herméticamente. Si hubo que emplear una fase gaseosa diferente a nitrógeno, a continuación se efectuó un intercambio de gas, gasificándose el medio con el correspondiente gas por medio de una cánula larga, y aplicándose en último término una ligera sobrepresión de alrededor de 0,8 bar.

Para el medio para *C. aceticum* se pesaron todos los componentes, se disolvieron y se envasaron. A continuación se añadió el indicador redox resazurina (1 mg/l), para poder examinar más tarde el potencial redox, y por consiguiente el contenido en oxígeno. A continuación se efectuó la gasificación a través de cánulas con una mezcla constituida por un 80 % de N₂ y un 20 % de CO₂, hasta que se alcanzó un pH de 7,4. También en este caso se aplicó una ligera sobrepresión. Tras el tratamiento en autoclave se añadió en medio estéril Na₂CO₃ en forma de una disolución de Na₂CO₃ anaerobia al 5 %, para alcanzar un pH de 8,2. Adicionalmente se añadió fructosa en medio estéril para dar una concentración final de un 1 %. Para crecimiento autótrofo se generó una atmósfera gaseosa de un 80 % de H₂ y un 20 % de CO₂.

Todos los medios se trataron en autoclave a 121 °C y 1,2 bar durante 15 min. Algunos componentes de medio se trataron en autoclave por separado para impedir reacciones químicas de los componentes entre sí. Los componentes termolábiles se disolvieron, se filtraron en medio estéril y se añadieron al medio enfriado, tratado en autoclave, antes de la utilización.

Para la producción de medios sólidos se añadió un 1,5 % (w/v) de agar antes del tratamiento en autoclave, y directamente a continuación se vertieron éstos en placas de Petri en la cámara anaerobia. Tras el vertido se secaron las placas durante algunos días, y se almacenaron hasta empleo a 4°C.

Medio para *C. aceticum*

NH ₄ Cl	1,00 g	18,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,33 g	2,4 mM
K ₂ HPO ₄	0,45 g	2,6 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g	0,4 mM
Disolución de oligoelementos (s.u.)	20, 00 ml	2 % (v/v)
Disolución de vitaminas de Wolfe (véase más abajo)	20, 00 ml	2 % (v/v)
Extracto de levadura	2,00 g	0,2 % (w/v)
NaHCO ₃	10,00 g	0,1 M

ES 2 639 224 T3

Cisteína-HCl x H ₂ O	0,50 g	2,8 mM
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,50 g	2,1 mM
Agua	hasta 1000 ml	

- 5 Tras el tratamiento en autoclave se añadieron en medio estéril 25 ml 1-1 de una disolución de Na₂CO₃ al 5 % en peso, para alcanzar un pH de 8,2. Adicionalmente se añadió fructosa en medio estéril para dar una concentración final de un 1 % en peso, referido al medio total. Para crecimiento autótrofo se generó antes del tratamiento en autoclave una atmósfera gaseosa de un 80 % en volumen de H₂ y un 20 % en volumen de CO₂.

Medio para *C. carboxidivorans* – medio de Wilkins-Chalgren

Caldo anaerobio de Wilkins-Chalgren (OXOID CM0643)	33 g	3,3 %
NaHCO ₃	1 g	12 mM
Agua	hasta 1000 ml	

El pH se ajustó a 5,6 antes de la ebullición y la anaerobización, y tras el tratamiento en autoclave se añadieron 10 ml de agente reductor 1 (véase más abajo), tras lo cual el pH se debía situar en 6,0.

- 10 Medio para *C. ljungdahlii* - ATCC 1754 (medio PETC)

NH ₄ Cl	1,0 g	19 mM
KCl	0,1 g	1,35 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g	0,8 mM
NaCl	0,8 g	14 mM
KH ₂ PO ₄	0,1 g	0,7 mM
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	20,0 mg	0,15 mM
Extracto de levadura	1,0 g	0,1 % (w/v)
Disolución de oligoelementos	10,0 ml	1 % (v/v)
Disolución de vitaminas de Wolfe	10,0 ml	1 % (v/v)
NaHCO ₃	2,0 g	24 mM
Agua	hasta 1000 ml	pH 5,5

Antes de la ebullición y la anaerobización se ajustó el pH a 5,5. Tras el tratamiento en autoclave se añadieron 20 ml con una disolución de fructosa estéril (250 g/l) respectivamente 5 ml de agente reductor 1 y 2 (véase más abajo), a continuación el pH se debía situar en 5,9.

5 Agente reductor 1

Se disuelven 1,8 g de NaOH en 200 ml de agua, se llevan a ebullición y se enfrían bajo gasificación de nitrógeno. En la cámara anaerobia se disuelven en 100 ml de NaOH anaerobio en primer lugar 4 g de L-cisteína-HCl, y seguidamente 4 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, y a continuación se tratan los mismos en autoclave.

Agente reductor 2

- 10 Se disuelven 1,8 g de NaOH en 200 ml de agua, se llevan a ebullición y se enfrían bajo gasificación de nitrógeno. En la cámara anaerobia se disuelven en 100 ml de NaOH anaerobio 4 g de L-cisteína-HCl, y a continuación se tratan los mismos en autoclave.

Disolución de oligoelementos para el medio ATCC 1754 y para el medio *C. aceticum*

Ácido nitrilotriacético	2 g	10,5 mM
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 g	6 mM
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,8 g	2 mM
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g	0,86 mM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 mg	0,7 μM
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	20 mg	0,12 mM
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	20 mg	80 μM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	20 mg	80 μM
Na_2SeO_4	20 mg	80 μM
Na_2WO_4	20 mg	60 μM
Agua	hasta 1000 ml	

- 15 En primer lugar se disolvió el ácido nitrilotriacético en agua por completo, se ajustó el valor de pH con hidróxido potásico a 6,0 y después se disolvieron los otros componentes.

Disolución de vitaminas de Wolfe para el medio ATCC 1754 y para el medio *C. aceticum*

Biotina (Vitamina H)	2,0 mg	8 µM
Ácido fólico (Vitamina B9)	2,0 mg	4,5 µM
Piridoxina-HCl (Vitamina B6)	10,0 mg	49 µM
Tiamina-HCl (Vitamina B1)	5,0 mg	15 µM
Riboflavina (Vitamina B2)	5,0 mg	13 µM
Amida de ácido nicotínico (Vitamina PP)	5,0 mg	41 µM
Pantotenato de calcio D-(+)	5,0 mg	10,5 µM
Cianocobalmina (Vitamina B12)	0,1 mg	74 µM
Ácido p-aminobenzoico	5,0 mg	36 µM
Ácido lipónico	5,0 mg	24 µM
Agua	hasta 1000 ml	pH 4,3

Los plásmidos contruidos en *E. coli* X12-blue se introdujeron a continuación en clostridios acetógenos por medio de conjugación (Purdy et al., 2002), o bien transformación (Zhu *et al.*, 2004), mediante lo cual la cepa recombinante adquiere la capacidad de producir acetona.

- 5 Para los experimentos de conjugación se cultivó la cepa donadora de *E. coli* CA434 con el plásmido a transferir en medio LB, en condiciones aerobias durante la noche. Se centrifugó una alícuota de 1 ml 1 min a 1000 x g, y el sedimento celular se suspendió cuidadosamente en la cámara anaerobia en 1 ml de tampón PBS estéril, anaerobio (1,5 mM KH₂PO₄, 4,2 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl), para impedir un corte de pilinas conjugativas. Las células se centrifugaron de nuevo y se absorbieron en 200 µl de un cultivo de clostridio cultivado en medio correspondiente. En la cámara anaerobia se distribuyó esta mezcla sobre placas de agar convenientemente desecadas en gotas de 10 µl, y se incubó a 37°C durante 6 horas en condiciones anaerobias. A continuación se lavaron las células 2 a 3 veces respectivamente con 0,5 ml de tampón PBS estéril, anaerobio, de la placa de agar. La mezcla de conjugación se plaqueó sobre placas de agar selectivas (claritromicina) y se incubó en condiciones anaerobias a 37°C.
- 10
- 15 Para la transformación se cultivaron las células clostridianas en 50 ml de medio C. Aceticum con 40 mM DL-treonina a 30 °C hasta una densidad óptica de 0,3 - 0,4. Los siguientes pasos se efectuaron en la cámara anaerobia. En ésta se cosecharon las células (6000 Upm, 10 min, RT), se lavaron dos veces con tampón SMP (270 mM Saccharose, 1 mM MgCl₂, 7 mM NaH₂PO₄), y en último lugar se absorbieron en 500 a 700 µl de tampón SMP, y se emplearon las mismas en la transformación. A tal efecto se transfirieron las células a cubetas de electroporación (4 mm) y se mezclaron con 0,5 a 1,5 µg de ADN plasmídico. Después de incubación de 5 minutos se efectuó la electroporación a 25 µF, 600 Ω y 2,5 kV en un pulsador génico (Bio-Rad Laboratories GmbH; München) con cubetas 4 mM (Biozym Scientific GmbH). A continuación se añadieron las células inmediatamente a 5 ml de medio precalentado. Siguió una incubación para el desarrollo de resistencia a 37°C durante la noche hasta cuatro días, tras lo cual se inocularon 5 ml de medio con claritromicina (5 µg ml⁻¹) y se incubaron durante 3 a 5 días a 37°C.
- 20
- 25 Para verificar la transformación siguió un aislamiento de plásmidos por medio de "peqGOLD® Plasmid Miniprep Kit II" (Peqlab, Erlangen). La preparación se efectuó según los datos del fabricante, llevándose a cabo todos los pasos opcionales. A continuación se efectuó una "recuperación de plásmido", empleándose la cepa de *E. Coli* XL2-blue y a continuación una digestión de restricción.

Todas las variantes de plásmido obtenidas (véase la tabla 1) se investigaron sobre formación de acetona en los clostridios autótrofos. Los análisis se efectuaron en escala de 50 ml en medio correspondiente con claritromicina (5 µg/ml). Tras inoculación a partir de cultivos previos correspondientes se efectuó una incubación a 37 °C. La gasificación necesaria del medio se efectuó en la producción del medio. En este caso se emplearon gas de síntesis o una mezcla de CO₂-H₂ en proporción 1:2. La densidad óptica se siguió mediante fotometría y en determinados momentos se extrajeron muestras durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 100 a 200 h, y se determinó la concentración de acetona y acetato en el exceso de medio exento de células mediante cromatografía de gases. En este caso se mostró que, con la combinación genes clostridianos (*thlA* y *adc*) con *atoDA* de *E. coli* y con las combinaciones genes clostridianos (*thlA* y *adc*) con *tell* de *B. subtilis*, o bien *ybgC* de *H. influenzae* se produce hasta 1 mM de acetona. Con genes puramente clostridianos (*thlA*, *ctfAB*, *adc*) se produjeron hasta 0,24 mM de acetona.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Evonik Degussa

<120> Células y procedimiento para la producción de acetona

<130> 200900033

15 <160> 16

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

< 211> 17

< 212> DNA

20 < 213> Artificial

<220>

< 223> Cebador

<400> 1

ggaaggtacc ttttatg 17

25 <210> 2

< 211> 25

< 212> DNA

< 213> Artificial

<220>

30 < 223> Cebador

<400> 2

gtaactctga attctattac ttaag 25

<210> 3

< 211> 20

35 < 212> DNA

< 213> Artificial

<220>

< 223> Cebador

<400> 3

40 cacaacggtg gatccaagag 20

<210> 4

< 211> 20

< 212> DNA
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> Cebador

 5 <400> 4
 cgcgatatgg taccaatcat 20

 <210> 5
 < 211> 28
 < 212> DNA
 10 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> Cebador

 <400> 5
 gaatttaaaa ggagggatcc aaatgaac 28

 15 <210> 6
 < 211> 27
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

 <220>
 20 < 223> Cebador

 <400> 6
 gtttcatagt attggtacct aaacagc 27

 <210> 7
 < 211> 20
 25 < 212> DNA
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> Cebador

 <400> 7
 30 ctcaggtcga ctcaagaag 20

 <210> 8
 < 211> 29
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

 35 <220>
 < 223> Cebador

 <400> 8
 cagagttatt ttaaggatc ctttctagc 29

 <210> 9
 40 < 211> 30
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador

<400> 9
caattgggat ccgataacaa ttccacacag 30

5 <210> 10
< 211> 29
< 212> DNA
< 213> Artificial

10 <220>
< 223> Cebador

<400> 10
gagatctggt acccggttaa atgacgga 29

15 <210> 11
< 211> 28
< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador

20 <400> 11
ctctagaagg atcctgttta actttaag 28

<210> 12
< 211> 25
< 212> DNA
< 213> Artificial

25 <220>
< 223> Cebador

<400> 12
attgggtacc tcattgcata ctccg 25

30 <210> 13
< 211> 8559
< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> Plásmido

<400> 13

accltggqla	caagctcgacl	ccaaqaazaa	ccacclcctc	tlqaaaccc	lqlactlcll	60
llaaqaqala	llactqaasa	acaaqaaga	qltqaacaa	qaacqgaaa	allagaaqa	120
actgatatta	aaaagattgt	agaagaagcc	tataaaata	tgaagatga	agaagaatat	180
qaaaaaala	qlaaqaacal	aaalccclal	qqlaalqaa	agqcllcaaa	laaaaalqtl	240
gagcotatat	tgatccattt	tgagatttta	aaggatagac	cagatgaatt	tcacactaaa	300
aaqtaataca	ccacattttt	aaaaqaattt	acaatcaact	ttcttatcca	caactatttt	360
ttattacatt	aatatagtta	aatataaac	ttatgtattt	atgotaaac	agatttttaa	420
qggqgttagc	atatccata	qtttaatttt	tttqttaaaa	aatattaac	tttqgttttt	480
llllaacaaa	alalallcal	aaaaalaia	alaciqqta	laallaacll	cllaqaqaaa	540
acqlalaaal	laqaalaaa	clalqaaccl	lalcaaalac	allcaaalqa	lllatclcll	600
accocgata	aaaatttagg	aggttagtta	gaatgaaga	agttgtata	gotagtgacg	660
taagaacaga	gattggatct	tatggaagt	ctcttaagga	tgtaccaga	gtagatttag	720
gagctacaga	tataaagga	gcagttaaaa	aagcaggaat	aaaacagag	gatgttaag	780
aagtcatttt	aggaattgct	cttcaagcag	gthtaggaca	gaatccaga	agacaggaat	840
ctttcaagc	aggactacca	gttgaatttc	cagctatgac	tattaaatag	gcttggggt	900

caagacclaa	aaacqllaaq	llaaacqaaq	aaatllaaaa	aaacaaacaa	caacaaqllaa	960
taataagcagg	tggtatggaa	aataagccta	gagctcctta	cttagcgaat	aacgcctagat	1020
ggggatatag	aaggggaaa	gctaaacttg	ttgatgaaat	gatcaactgac	ggattgtggg	1080
atgcatttaa	tgattaccac	atgggaataa	cagcagaaaa	catagctgag	agatggaaac	1140
ttccaagaga	agaacaagat	gagtttgcgc	ttgcacacac	aaaaaaagct	gaagaagcta	1200
taaaatcagg	ccaacttaaa	gatgaaatag	ttcctgtagt	aattaaaggc	agaaagggag	1260
aaactgtagt	tgatacagat	gagcaaccta	gatttggatc	aactatagaa	ggacttgcaa	1320
aactaaaaac	tgccctcaaa	aaagatggaa	cagttacagc	tggtaatgca	tcaggattaa	1380
atgactgtgc	agcagtacct	gtaacacatg	gtgcagaaaa	agctaaagag	cttgaggtaa	1440
aaaccaattgc	taagatagtt	tcttatgggt	cagcaggagt	tgcccaagca	ataatgggat	1500
atggacottt	ctatgcacac	aaagcagcta	ttgaaaaagc	aggttggaca	gttgatgaat	1560
tagatttaat	agaatcaaat	gaagcttttg	cagctcaaaq	tttagacgta	gcaaaagatt	1620
taaaatttga	tatgaataaa	gtaaatgtaa	atggaggagc	tattgcacct	ggtcatcaaa	1680
ttggagcacc	aggtgcacga	atactcgtta	ctcttgtaac	cgcactgcaa	aaaagagatg	1740
caaaaaaagg	cttagcactt	ttatgtatag	gtggcggaca	aggaaacgca	atattgctag	1800
aaaagtgcga	gaaggagtc	aatggaacct	taaaataaatt	agattttgaa	atttaaggtc	1860
attccttaaa	gacgggatga	caattatgat	tgaggtttct	ttaaaacttg	gcactccaac	1920
caaaactaatt	gattttttag	ttaaattaaa	tataaagaat	ttacagatta	taagtaatga	1980
taacatllal	caaaalacac	qlallcqlaa	qlaaalaca	aalaalcaaa	taaaaaagcl	2040
tattgtttca	tatatagcca	gcaacccaga	tactggcaaa	aaaattttta	ataatgaact	2100
tcacatcaaa	ctctctccac	aaqgaactct	agtcgaacac	atcactlcaa	ccqcatclaa	2160
cttaactgct	qlactaaact	aaacacqltl	aqaaactllc	allcaaaaaa	caaaqaaaaa	2220
aatatctata	aatacaaacq	aalatllqtl	aqaaactaac	cttaacaaac	atatacaatl	2280
aattlaaaqcl	aattatllaa	atlaaaacaa	aaacaccttc	tataaaagca	ctactaaaaa	2340
cttlaattccc	tataagccaa	tggaagctaa	aaacglaata	gttgaagctg	aaaatttagt	2400
tagctgtgaa	aaactagaaa	aggaaaaagc	aatgaccccc	ggagttctta	taaaatttat	2460
aaataaaqaa	caacacataa	atantlaaa	ataaaaaccl	aaacaaacaa	atantlaaaa	2520
aaagagttgc	aagagaatta	aaaaatgggc	aacttgcata	cttaggtgta	ggtcttccta	2580
ccatggttgc	agatttatata	ccaaaaaatt	tcaaaattac	tttcaactca	gaaaaaggaa	2640
laqltgaatl	qaaqcaatql	caaaaatlaa	ataaqcaaaa	taaaqcaaaa	ctaaaatqaa	2700
gaggagacata	tacaacagta	cttccctgaq	gcacatlltl	cgtatagctc	gttctglltl	2760
caclaatccq	caclagclaa	qlaatclata	qlatlllaag	caclctccaa	ctagatcaaa	2820
aaqtaataat	agcaatllaa	atctctccta	caaaantaacl	ctctagctaa	cgtcgaagca	2880
tcgaatltacl	aaatgaaccl	aaqaaqlaa	taatlccaacl	caaacataca	aaataaaqtc	2940
aaactaaaaat	tttaaaaaaa	tctaacacttc	ccctcagggc	aaaactctca	caaaaatctaa	3000
tlqtaaaqaa	actlgaacata	atlgaaclta	llaaatcaac	lllaactctc	actgaacata	3060
ataaaaaacac	aaactllaat	caaaataaql	cttlaactcc	tcgaatllta	ctcataacca	3120
atgaactttag	aaacttggtc	gttttaggtac	cttttatggt	aaaggatgaa	gtaattaaac	3180
aaatlgaacac	gcacataaact	tcacclcaat	tlccclgaac	aaactataaa	tlccataaact	3240
qlaacatlltl	taacatllata	tatcclcaaa	atacgaatcc	actlgaacaa	cttctcaca	3300
agcctttaga	aattgatgag	cccttagtca	ggcttgaaat	tatggcaatg	catgatanga	3360
gtggacttgg	ttgttatata	gaaagoggac	agctatctcc	cgtaaagcttt	aatggagctta	3420
aaqqaacatta	tcttcaatata	atatacltaa	ataatcaaac	tcgaatllca	ctagcaaaqa	3480
aaataagttgc	atatacctaaa	aaactcgggt	atcaaaagct	ttttgtggat	tcagataaatt	3540
tagtaggaaac	tttagactat	ggaacactta	gagttgcgac	agctaaatng	gggtacaaac	3600
ataaagcctt	agatgctaat	gaagcaaaag	atcaaatctg	tgcacctaat	tatatgttga	3660

aaalaanacc	aaallatcaal	aaanqocora	aaatalqlen	aallalanaal	aaanaalen	3720
agatagttac	agatattgaa	gottggacag	gaocaaactog	aotgcagtta	tottgatcaag	3780
ctatggogoc	aottaatgat	ttgocagtaa	aagagattgt	ttotagctot	cacattcttg	3840
agatataaat	atggootaga	gctgaagtta	tatatgatta	tottaagtaa	tagaactaac	3900
tgocogtct	ttacaaagt	cgtgaatggg	aaaacootgg	cgttaoccaa	cottaatogoc	3960
ttgcagocaa	cccccccttc	gcagctgggc	gtaatatoga	agaggococg	acogatogoc	4020
cttcccaaca	gttgocgagc	ctgaatggcg	aatggogoot	gatgcogtat	ttttctctta	4080
ogcatctgtg	cgttatctta	caacgatctat	ggcgcactct	cagtaacata	tgotctgatg	4140
cgcatagttt	aagccagccc	cgaacccocg	caacacccocg	tgacogococ	tgacggggctt	4200
gtctgtccoc	ggcatccogt	tacagacaag	ctgtgacoot	ctccgggagc	tgcatgtgtc	4260
agaggttttt	acccgcatca	cagaaacogc	cagacagaaa	gggcctcttg	atacgcctat	4320
ttttataggt	taattgtcatg	ataataatgg	tttcttagac	gttaggtggc	aottttcogg	4380
gaatgtggc	cagaaacoot	atttgtttat	tttctaaat	acattcaaat	atgtatcogc	4440
taatgagaca	ataacootga	tacatgcttc	aatatatttg	aaaaaggag	agtatgagta	4500
ttcaacattt	cgtgtgtocg	cttactccot	tttttgogcc	attttgcott	cotgtttttg	4560
ctcaccocga	aacgtgtgtg	aaagtaaaag	atgctgaaga	tcagttggtg	gcacgagtg	4620
gttacatoga	acgggatctc	aacagcggta	agacccctga	gagttttcgc	ccgaagaaac	4680
gtttccaaat	gagagacact	tttaaggttc	tgcatgtgtg	cgggttatta	tcocgtatg	4740
accccgqqa	agacaaactc	qclccqqa	tacaccltc	tcacaaactc	tlagtlqaql	4800
actcaccagt	cacagaaaag	cactctacgg	atggcatgac	agtaagagaa	taatgcagtg	4860
ctccataaac	cacacclcat	aaccltccg	ccaccltcat	tcacacaaq	atccqccgac	4920
cgaacgaact	aaccccltll	tlacacaaq	tcacacclca	tcacacclcc	ccltcatcll	4980
qqaacccqa	qclaaclcaa	qccataccaa	acacacaccc	tcacacaccc	atcccltcll	5040
caatccgaac	aaccltccgc	aaactatcaa	ctccacaacl	acltactcta	ccltccccgc	5100
acacatlaal	agactggatg	gagcgcgata	aagtlcgagg	acaccltctg	ccltccggcc	5160
ttccggctgg	ctggcttact	gctgataaat	ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcgcta	5220
tccltccnac	actccqccca	qclccclaac	cclcccltcl	ccltcltctc	tcacacaccc	5280
ggagtccagg	aactatggat	gaacgaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcaactga	5340
ttacgcatgt	gtaactgtca	gaacagtttt	actcatatat	aottttagatt	gatttaaaac	5400
tlcatlltlla	atllanaaag	atclacqlaa	aatcccltll	tccltctctc	atgacacaaa	5460
tccltlaaag	tcagtlcttg	tlccactggg	cgtcagcccc	cgtlagaana	atcaagggat	5520
cttcltlaaa	tccltlltll	ctccacclaa	tcclclclcl	ccacacacaa	aaacacccgc	5580
tlccagcccl	qcltcltllt	cgccltcaaa	acclacacaa	tccltlltcc	aaqclaaatg	5640
qcltccqca	accccaagata	ccaaalactg	tccltcltcl	clacccclaa	tlagccacac	5700
aottcaagaa	ctctgtacaa	ccgcctacat	acccctctct	actaatctcg	tlacacagta	5760
ctcccgccaa	tcgcclaaag	tccltcltcl	ccgccltccg	clacagacaa	tccltccaa	5820
atlaagccaa	qccclccgc	tcacacccaa	qcltcltcc	acacccaccc	tlagacccaa	5880
cgacactaac	cgaactgaga	taactacagc	gtgagctatg	agaaagccgc	acgcttcccg	5940
aaqcaqaaa	qcccaacaa	talccclcaa	qcccaaccl	cgaacacaa	cgaacacaa	6000
qgaaccltc	accccaaaac	qccclctatc	tlctcltcl	tcclcccltll	qcccaacclt	6060
gacttcagag	tcgatttttg	tcgctgctgt	cagggggggc	gagcctatgg	aaaaagccaa	6120
gaaacggcgc	ctttttacgg	ttccctggct	tttctggcc	ttttgtctcc	atgttcttct	6180
ctcccltctc	cccltcltcl	cltcaclaac	cltcltcccc	ccltcltclaa	ccltcltclaa	6240
ctgcgcgcg	cgaactogac	gagcgcgcg	agtcagtcg	cgaagcgcg	gagagcgcg	6300
caatacgcga	acccgcctct	ccgcgcgcgt	ggaagcttca	ttatgtcagc	tggaacgcga	6360
ggttccocga	ctggaagcgc	ggcagtgagc	gcaacgcaat	taatgtgagt	tagctcaact	6420

ES 2 639 224 T3

atlaacacac ccacagcttla caclllalac llaacagctc talctctat qaantlqla 6430
gagatatac atttccacac ggaacacag atgacatga ttaagccag ctttggttaa 6540
cacacacagc attccacac atagcttctt cggcacaag ccatgctctg agcttcaat 6630
qcaactatc ctaaaaaa cactaaqtc taacacata caattattta cttcgtatc 6660
aagtcattaa acccgtctc ctaacacaa aagtcataa ccttcaaaa cttctctttt 6720
lctllaaaaa aaaaaaala qataaactc lctllctllt tallectaaa cgcatacaca 6730
ttcagatata aatttaacga tcaatcaca tcttcatac tatcaagct cctcgtatac 6840
llalactaal llalaaaga qaaaaaata aaaaqqlla taalgaaga qaaaaata 6930
aacacacac aaaaclllal tactlcaaa cactataac alaaataat qacaaata 6960
agattatac aacatcaaa tctcttcaa atcagctcag qaaaaacac ttttaccctt 7020
gaattagtag agaggtgaa tttcgtaac gccattgaa tagacacaa attatgcaa 7080
actacagaaa ataaactctg tcatcacag aatttccag ttttaacaa ggtatatttg 7140
cactllaaal llaataaaa ccatcctat aaaaatllc qtaataaac llalaaata 7230
agtaaggata taataagcaa aattgtttt gatagttag ctgatgagc ttatttaac 7260
gtggaatac ggttctgtaa agattatta aatacaaac gctcattgga attatttta 7320
atggcagag ctgattatc tatattaag atggctcac gagaatactt cctcctaaa 7380
cctaaagtag atagctcact tctcagctta atagaaaaa atcagagat atcacacaa 7440
qataaacaca actataatta tttcgtata aatcagctta acaaaqata cacaacata 7530
tttcaaaaa atcaatttaa caatcctta aaacatgag gaattgaga ttaaacacat 7560
attagctttg acaattctt atctctttt aatagctata aattatttaa taactaagct 7620
aaggagtag caaacctcct ccttaactt gtttctgag taccatctt tctggaatag 7680
attatgcttt ctgagcctc actctcttt tatataata ttagcagaag gaataagctt 7740
cgaaaaaac qaaaaaagt tctcttttc tcttqaaac tggcagctta cggcagctc 7830
lactacact caalgaaga ccaaacacac ccaagctta caalctacat taqataaac 7860
cctaatctc cccacagctt tataacaaa acaaatlca actagctaaa atcttaata 7920
agcttcaat qataagctll ataaqaacl tctllctllt aatlllctc cctlllctt 7980
ctaattllt llaacaaat lctlllctt llaagacag llaalataa qllaqaata 8040
tttaaaata gaggtagaa aagatgaa gaagatag gacagctta taaggctct 8100
cagagctctc tagacagaa agtgagaa gctatagag tagacagctt atcagctaa 8160
caaacgtctg gtaactctg aaggcctat atagtgcaat taataagct gttatagct 8220
attggcgga aaaaacttaa atcgttaac tatatctag ataactgca ctaagctaac 8280
aatcaatac taqatacac aagaaata qcaaaacta cagaaacac tcaacacac 8340
gtaatatac cacttaaat cttagaaga ggaatatta taaaaagaaa aactggagta 8400
ttaactgtaa acccgaact actaatgaga ggcagcagc aaaaaaaaa atactctta 8460
ctgaacttg ggaacttga gcaagagga aatgaatag attgaactc caataacac 8520
acgtagctat tgggagctc atctatgaa atgagata 8552

<210> 14
< 211> 8563
< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> Plásmido

<400> 14
agcttggctg caggctgact tcaagaagag gcaactcact ttggaagac tgaactggt 60
llaagagatg llaactgaag accagaagca gltgaggcag gaaaggtaaa atlactagga 120

acgaatatta	aaaagataat	acacgaacac	taaaaaataa	taaaacataa	aaagaaatata	180
gaaaaaatga	gtaaggcaat	aaatccatat	gggatggaa	aggttcaga	tagaatagtt	240
gacgatatat	tgatccattt	tgaggtatta	aaggatagac	cagatgaatt	ttacacataa	300
aagtaacaca	tgagcatttt	aaaagaattt	agaatgaagt	ttttatagca	caagtatttt	360
ttattacatt	aaatagttca	aaatataaac	ttatgtattt	atgctaaaaa	atgattttta	420
gggggttagc	atatgcataa	gttttaattt	ttgtttaaaa	aatattaaac	tttgggtttt	480
ttttaacaaa	atatattgat	aaaaataata	atagtgggtt	taattaagtt	gttagagaaa	540
acgtataaat	tagggtataa	ctatggcaat	tatgaatat	attgaaatgg	tttatctggt	600
accccgatc	aaaatttagg	aggttagtta	gaatgaaga	agttgtataa	gctagtgcag	660
taagaacaga	gattggattt	tatggcaagt	ctcttaagga	tgtacacaga	gtagatttag	720
gagctacaga	tataaaggaa	gcagttaaaa	aagcaggcaat	aaaacacag	gatgttaatg	780
aagtcatttt	aggaatagtt	cttcaagcag	gtttaggaca	gaatcacaga	agacaggnat	840
cttttaagca	aggattacaa	gttgcaattc	cagctatgac	tattataaag	gtttgtggtt	900
caggcaattg	aacagtttag	ttagcagcac	aaattataaa	agcaggagat	gctgaagtaa	960
taatagcagg	tgggtatgaa	aatatgtcta	gagctcctta	cttagcgaat	aacgtatgat	1020
ggggatatag	aatgggaac	gctaaatttg	ttgatgaaat	gatcaattgac	ggattgtggg	1080
atgcatttaa	tgattacacc	atgggaataa	cagcagaaaa	catagctgag	agatgggaaca	1140
tttcaagaga	agaacaagat	gagtttgttc	ttgcataaca	aaaaaaagt	gaagaagcta	1200
taaaatcaga	tcaatllaaa	galgaataga	ttcctgtatc	aallaaacac	aqaaacqga	1260
aaactgtagt	tgatcacagt	gagcaaccta	gatttggatc	aactatagaa	ggactgtgaa	1320
aallaaacac	tgcctllcaa	aaagatgaa	caatllacac	tcctaataga	tcagatllaa	1380
atgaatllac	acgaatllac	atlaaataga	atgaagaaaa	acatlaaac	cttgcagtaa	1440
aaacatllac	taacatllac	tttllatggt	caagcaagat	taacacacac	ataatggaat	1500
atgaatllac	ctlaacacac	aaagcaagta	tttaaaaaac	acatllacac	cttgcagtaa	1560
tagattllac	agaatlaaac	gaagctlltg	gagctcaaac	tttagcagta	gcaaacagat	1620
taaaatttga	tatgaataaa	gtaaatgtta	atggaggaga	tatttgccctt	ggctaatcaca	1680
tttaagcaga	acatllacac	atlaaataga	ctctllacac	cccatllacac	aaagcaagta	1740
caaaaaagg	cttagcaaat	ttatgtatag	gtggcggaca	aggaacacga	atattgtctag	1800
aaaagtgtca	gaaggatcac	aagagggata	aaaaatgaaa	acaaaattga	tgacattaca	1860
acacacacac	acatllacac	atgaagcaat	acacacacac	atgaagcaat	ttatllacac	1920
tgacacacac	acacacacac	ttgaagcaat	acacacacac	gtgtllacac	acacacacac	1980
atgaacacac	atgaacacac	ttatllacac	acacacacac	acacacacac	acacacacac	2040
acacacacac	atgaacacac	atgaacacac	acacacacac	acacacacac	acacacacac	2100
atgaacacac	atgaacacac	atgaacacac	acacacacac	acacacacac	acacacacac	2160
tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	2220
acacacacac	acacacacac	acacacacac	acacacacac	acacacacac	acacacacac	2280
tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	2340
tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	2400
tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	2460
tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	2520
tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	2580
tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	2640
tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	2700
tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	2760
tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	2820
tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	tgatgaacac	2880

alaaacqaal. aaaaaaaal. aalaaacaa. alaaacaa. alaaacaa. lqaalaaacaa 2940
 aaaattttgc. ggggttgca. catgcaactc. aatgggcaac. atgggggca. tatgttggtt 3000
 aatgaactgg. ctgtttttgc. ttttatggac. ggcaaaatgt. ggttcacaga. aattggcagc 3060
 ggggtgtgatt. tagcaacagt. ggggtgcaca. acagaagctc. ggtttgaagt. ggcggcagat 3120
 ctgaatacgc. aacgggggtga. tttatgatgg. gtaactttta. tgttaaagga. tgaagtaatt 3180
 aaaaaaatta. gcaagcaact. aacttgcct. gcaatttcta. gaggaccta. taaatttcat 3240
 aatcgtgagt. attttaacat. tgtatatagt. aacgatatgg. atgcaatttg. taagtgtgtg 3300
 caagagcctt. tagcaattga. tgaagcctta. gtcagggttg. aatttatggc. aatgcattgat 3360
 aagagtggac. ttgggtgtta. taagaaagc. ggaacaggca. ttcccgtaag. ctttaattga 3420
 gttaagggag. atttacttca. tatgtgttat. ttgatcaatg. agcctgcact. tgcagttaga 3480
 agggcaattc. gtgcattatc. taacacagct. gggatccaa. agttttttgt. ggttcagat 3540
 aatttagtag. gaaactttga. ctatggcaaa. cttagagttg. gcaagctac. aatggggtae 3600
 aacatacag. ctttagatgc. taatgaagca. aaggatcaaa. tttgttcgca. taatttatatg 3660
 ttgaaataa. taacaaatta. tgaagggaag. cctagaatat. gtgagcttat. aatggcaga 3720
 atcacagatg. ttacagtaca. tgaagcttgg. acaggaccaa. ctgcagctga. gttatttgat 3780
 caagctatgg. ggcacattca. tgaatttgca. gtaaaagaga. ttgtttttatg. ctctacact 3840
 ctgcagata. taattattgc. tagagctgaa. gttatatatg. attattttta. gtaatagaat 3900
 tcaatggcag. tctgttttca. acgttgtgac. tgggaaaacc. ctggcgttac. caaacttaat 3960
 ggggtlcaac. caatccccc. tlllccccc. tggcclata. caaagagac. caaagagag 4020
 ggccttccc. aacagtttg. cagcctgaat. ggggaatggc. gctgatggg. gttatttttc 4080
 ctlaagcgc. tctccagat. tllccacac. atctatgca. ctctcaatc. aatctatct 4140
 gtlacacat. aatlaagca. caacacac. caacacac. caacacac. caacacac 4200
 gcttctctc. tcccaagc. caclacac. caacclac. caclctcc. caacclac 4260
 tctcaagat. tllccacac. clccacac. caacacac. caacacac. caclctcc 4320
 ctattttat. aggttattg. ctatgata. atgttctt. agcgttcag. tggccttll 4380
 gggggaatg. tggcgggac. cctctttgt. ttatttttt. aactacctc. aatctgtat 4440
 caacclac. caaataaac. claatata. claatata. aatlaaaa. caaataata 4500
 agtatcaac. atttctgt. ggccttct. ccttttttg. ggcattttg. ccttctgt 4560
 ttctgtccc. cagaacagt. ggtgaagta. aagctgtgt. aagctgtgt. ggggtgcaga 4620
 clagcttaca. tcaacclca. tclcaacac. caataacac. tcaagagat. tcaagagat 4680
 gacgttllc. caatgatgg. cacltttca. gtlctgtat. gtlggcgggt. attatccgt 4740
 alllcaacac. caaagacac. caclctcc. caclctcc. alllcaacac. tcaatctat 4800
 caclctcc. caclctcc. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 4860
 caclctcc. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 4920
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 4980
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 5040
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 5100
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 5160
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 5220
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 5280
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 5340
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 5400
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 5460
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 5520
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 5580
 caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac. caaataac 5640

ES 2 639 224 T3

[illegible]

<210> 15
< 211> 8004
< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>

< 223> Plásmido

<400> 15

accltggcclg	cagctccagcl	ccaaqaacaa	ccacclccatc	clccaaagcc	ccacclcccl	60
ttaagagatg	ctactgaag	accagaagca	gttgaggcag	gaacggtaaa	attagtagga	120
actgatatta	aaaagatagt	agaagaagcc	tataaataa	cgaaagatga	agaagaatat	180
gaaaaaatga	gtaaggcaat	aaatccctat	gggatggaa	aggctccaga	tagaatagtt	240
gagctctat	cgatccctat	gggagtata	aaggatagac	cagatgaatt	tcacccataa	300
aaataataca	ccaccattcl	aaaagaattl	aaatccactl	clcltatcaa	caatattlcl	360
clcltatccll	aaatagclta	aaatataaac	clcltatcll	clccataaac	atgattclta	420
gggggttagc	atatgcata	gttttaattt	tttgttaaaa	aaataataac	tttgtgtttt	480
clcltaacaa	atatacllcl	aaaaataa	ataclgqta	taattaacll	qltaagaqaa	540
agctataaat	taggatata	ctatggcaat	tatgaatatg	attgaatatg	tttatctgtt	600
acccctata	aaattllaga	accltaqlta	aaataaaca	aatqlaata	ccatclgca	660
taagaacaga	gatlggactl	atlggaagcl	clcltaagga	tgtaacaga	gtatgcllag	720
ccctacac	tataagcaa	ccactltaaa	aaacacaa	aaacacaa	catclltaaa	780
aaclcatlll	agcaaatcll	clltaagcaa	qltlaagaca	aaatccagca	aaacacaa	840
clltaaac	aaatataca	qltaaatcl	caactatga	taataataa	atllclgcll	900
caggacttag	aaagcltag	tlagcagca	aaatataa	agcaggagat	gtgagcltag	960
taatacagg	cggtatgaa	aatatgcta	gagctccata	cttagcgaat	aaagctagat	1020
gggcatatag	aatgggaac	gtcaaatctg	ttgatgaat	gatccctgac	ggattgtggg	1080
atcatcllta	tgatccac	atccaaata	caacagaata	catatccac	aaatccaa	1140
tlcaagaga	agaacaaat	gagtltgct	tlgcatcaca	aaaaaaagct	gaagaagcta	1200
taaaatcag	ccatcllta	gatgaatag	tlcccltagl	aatlaaagcc	agaaaggag	1260
aaactgtagt	tgatccagat	gagccacata	gatttgga	aaatataaa	ggacttgcaa	1320
aatataaac	tgccctcaaa	aaagatggaa	cagttacaga	tggtaatgca	ccaggattaa	1380
atgaactgtc	agcagtaact	gtaactatga	gtgcagaaaa	agctaaagag	ctggagataa	1440
aaacactgtc	taagatagtt	ctttatgggt	cagcaggagt	tgacccagca	ataatgggat	1500
atggacottt	ctatgcacaa	aaagcagcta	ttgaaaaagc	aggttggaca	gttgatgaat	1560
tagacttaat	agcaataaat	gaagcttttg	cagctcaag	cttagcagta	gcataagatt	1620
taaaatttga	tatgaatcaa	gtaaatgtan	atggaggaga	tattgcctct	ggctatccaa	1680
ttggagcctc	aggtgcaga	ataatcgta	ctcttgtaaa	cgcaatgcna	aaagagatg	1740
caaaaaaagg	cttagcaaat	ctatgtatag	gtgggggaca	aggaacagca	atattgctag	1800
aaaagtgcata	gaaggatcc	gataacaaat	tcacacagaa	ctcattaaag	aggagaaatt	1860
aaacatccc	caactcllca	aatcatcllca	ccclccaa	aaaaaacccc	ccclclcll	1920
tcggcttgcc	ggcgctatct	ggcgctgctt	tcgcctctct	catgctctct	tcgcggggga	1980
gtgcgagatg	ctcgctgccc	agccgcgggg	aaaggccag	aatcaaacgt	cagcctatga	2040
ggatctcgaa	gagctgaagg	atttgtacaa	gcagaaactg	aaacttcgac	ctgactggcc	2100

atltlqlqla	tlloqqaqaa	qlalqeqqaa	aaalcalcaaa	tlloqqqlaa	qqaqaaqal	2160
tgaggggaa	ggacatttcc	ggcagggggt	tacattttct	gaaatccaga	ggctccatat	2220
tcaggggagg	aaaggtccc	acctgcctga	tgaccagtct	ctogataata	ttatccaat	2280
agggggaatg	ccggcagaga	ttgttgaaaa	taaggaggtc	atgtcccttt	ccctgccttc	2340
ttcccgatca	gattacccgg	ctcttgaaaa	atttgagctt	tacgatctgg	cccgatccaa	2400
gtcgccgttt	cagtccttca	acgggcctga	tgataaaaa	tgcatacgag	atgggggaag	2460
gtggaagaag	tgggcaaaag	ccatccactt	ccatccattt	gaagggggga	ccatgttcc	2520
gcgtccacaa	acgggaagaag	tggcagaaag	gacttttggg	ctcttgactc	ggcatccgat	2580
catttaacag	ggtaaccttt	atgttaaaag	atgaagtaat	taaaacaaat	agcagcccat	2640
taccttggcc	tgccatttcc	agagggaacc	ataacttcca	taactgttag	tatttttcaa	2700
ttgtatctcg	tacagataag	gatgcacttc	gtcaagttct	ggcggagcc	ttgaaatttg	2760
atgagccctt	agtcagggtt	gaatttatgg	caatgcctga	taagggttga	cttgggttgt	2820
atccagcaag	cggaacagct	attcccgtaa	gcttctatgg	agttcaggga	gattatcttc	2880
atctgatgta	tttagataat	gagcctgcaa	ttgcagtagg	aagggaatta	agtgcatatc	2940
ctaaaaagct	ccggctatcca	aagcttttgg	tggattcaga	tactttagta	ggacttttag	3000
actatggaaa	cccttagagtt	ggcagagcta	caatggggta	caaacataaa	gccttagatg	3060
ctaaccgaag	aaaggatcaa	atttgtcgcc	ctaattatat	gttgaaaaata	atacccaatt	3120
atgatgggaag	ccctagaata	tgtagagctta	taaatgggaa	aaccacagat	gttaccgtac	3180
atlaaaqlll	qacaaqaaa	acloqaqlq	agllalllla	lcaqqlata	ccqcaqllla	3240
atgacttgcc	agtaaaagag	attgtttcta	gcctccacat	ccctgcagat	ataatattgc	3300
ctlaqqctca	agllalllall	qalllctlla	aglaalaaa	tlccclccaa	qlcqltllac	3360
aaqqlcqlca	ctlaqaalaa	clcqqcllla	cccaqllla	lcccllcaa	qacalccaa	3420
clllcccaag	ctlaqaalaa	cccaqaqaa	cccaqccaa	lcccllcaa	caacatllc	3480
qaaqalaaa	lcaqaalaa	ccclcaalq	qclallllcl	ccclacccat	clqlccqla	3540
lllcaaacag	cataaggtgc	ccclccagta	caatclgctc	tgatgcggca	tagtlaagcc	3600
agcccgagaa	cccgccaaaa	cccgctgaag	ggccctgaag	ggcttgcctg	cccccgccat	3660
ccactlcaaa	aaagqclata	acactccaa	qaaclqaal	qlclcaaaq	llllccccc	3720
catcaacgaa	acggcgagaa	cgaaaggccc	tcttgataag	ccatctttta	taggtttaat	3780
ccctgataat	aaggttttct	tgaagctga	gtgcaccttt	ccggggcaat	gtgcggggaa	3840
ccctatlll	lllallllll	taaatatall	caaalatata	lccclcaalq	acacaaatac	3900
ccgalaalal	gcllcaalaa	tallgaaaaa	ggaagaglat	gaclallcaa	catllccgtg	3960
lcccccclal	lcccllllll	qaaacalll	qclllclcll	llllclclaa	ccaaaaaccc	4020
lcllcaaacl	aaaaqalcll	qaaalcaal	lccclccaa	acclcaclaa	atccaaclaa	4080
atclcaaaag	ccclcaqata	cllcaaacll	llcccccacc	aaacqalll	ccclcaclaa	4140
qaacltttaa	agttctgcta	tctgcagcga	tatttatccc	tattgaagcc	qcccaagacc	4200
aaclcgatca	cccaclcaac	lalllccaaa	atqacllcll	taaaclatca	ccclccaaq	4260
aaacqclcll	tacccatcc	atqaacclaa	qaaalclata	ccclccclaa	atccccclaa	4320
gtgataaac	tgccgcaaac	ttacttctga	caacagatcg	aggaacgaag	gagctaacag	4380
cllllllcaa	caacclgcaa	qalclcllca	clcccccclaa	lccclcaaaa	cccaacclaa	4440
atlaaaqcccl	cccaaaccc	qaacllcaaa	cccaclcc	lcllcaaaata	cccaaaccll	4500
tgagcaaaact	atlaacttgc	gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	4560
ggatgggagg	ggataaaagt	gcaggaccc	ttctggcctc	ggcccttcag	gctggctgg	4620
lllcllccclaa	taaatclcaa	qcccllcaaa	qlaaclclaa	ccclclclll	qaaacclclaa	4680
ggcagagatg	taagccctcc	cgtaactgag	ttatctacaa	gaaggggagt	caggcaacta	4740
tgatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	actgattaa	cattggtaac	4800
tgcagacaa	agtttactta	tataacttt	agattgatct	aaaactccat	ttttaattta	4860

aaagaaata	aaagaaata	aaagaaata	aaagaaata	aaagaaata	aaagaaata	4920
tttgtgttca	tttgtgttca	tttgtgttca	tttgtgttca	tttgtgttca	tttgtgttca	4980
tttgtgttgg	tttgtgttgg	tttgtgttgg	tttgtgttgg	tttgtgttgg	tttgtgttgg	5040
gttgtgttga	gttgtgttga	gttgtgttga	gttgtgttga	gttgtgttga	gttgtgttga	5100
agatagcaaa	agatagcaaa	agatagcaaa	agatagcaaa	agatagcaaa	agatagcaaa	5160
tagcaacggc	tagcaacggc	tagcaacggc	tagcaacggc	tagcaacggc	tagcaacggc	5220
ataagtgttg	ataagtgttg	ataagtgttg	ataagtgttg	ataagtgttg	ataagtgttg	5280
gggtgtgaa	gggtgtgaa	gggtgtgaa	gggtgtgaa	gggtgtgaa	gggtgtgaa	5340
tgagatagct	tgagatagct	tgagatagct	tgagatagct	tgagatagct	tgagatagct	5400
acaggtatcc	acaggtatcc	acaggtatcc	acaggtatcc	acaggtatcc	acaggtatcc	5460
gaaagggctg	gaaagggctg	gaaagggctg	gaaagggctg	gaaagggctg	gaaagggctg	5520
tttgtgtgat	tttgtgtgat	tttgtgtgat	tttgtgtgat	tttgtgtgat	tttgtgtgat	5580
taaggttcc	taaggttcc	taaggttcc	taaggttcc	taaggttcc	taaggttcc	5640
atttgtgtga	atttgtgtga	atttgtgtga	atttgtgtga	atttgtgtga	atttgtgtga	5700
cgacggagag	cgacggagag	cgacggagag	cgacggagag	cgacggagag	cgacggagag	5760
ctctccggc	ctctccggc	ctctccggc	ctctccggc	ctctccggc	ctctccggc	5820
aagcggggag	aagcggggag	aagcggggag	aagcggggag	aagcggggag	aagcggggag	5880
ctttacactt	ctttacactt	ctttacactt	ctttacactt	ctttacactt	ctttacactt	5940
acacagaaa	acacagaaa	acacagaaa	acacagaaa	acacagaaa	acacagaaa	6000
aacaaatagt	aacaaatagt	aacaaatagt	aacaaatagt	aacaaatagt	aacaaatagt	6060
aaaaacalla	aaaaacalla	aaaaacalla	aaaaacalla	aaaaacalla	aaaaacalla	6120
qlqcttcaac	qlqcttcaac	qlqcttcaac	qlqcttcaac	qlqcttcaac	qlqcttcaac	6180
aactagataa	aactagataa	aactagataa	aactagataa	aactagataa	aactagataa	6240
aacqatcaat	aacqatcaat	aacqatcaat	aacqatcaat	aacqatcaat	aacqatcaat	6300
aaggaggaaa	aaggaggaaa	aaggaggaaa	aaggaggaaa	aaggaggaaa	aaggaggaaa	6360
tttattactt	tttattactt	tttattactt	tttattactt	tttattactt	tttattactt	6420
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	6480
tgaaattttg	tgaaattttg	tgaaattttg	tgaaattttg	tgaaattttg	tgaaattttg	6540
cttgtgtgat	cttgtgtgat	cttgtgtgat	cttgtgtgat	cttgtgtgat	cttgtgtgat	6600
aaaaacaaat	aaaaacaaat	aaaaacaaat	aaaaacaaat	aaaaacaaat	aaaaacaaat	6660
ggaaattttg	ggaaattttg	ggaaattttg	ggaaattttg	ggaaattttg	ggaaattttg	6720
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	6780
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	6840
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	6900
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	6960
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7020
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7080
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7140
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7200
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7260
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7320
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7380
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7440
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7500
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7560
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7620
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7680
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7740
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7800
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7860
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7920
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	7980
aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	aaataatatt	8040

<210> 16
< 211> 7693
< 212> DNA
< 213> Artificial

5 <220>
< 223> Plásmido

<400> 16
accltggqla cagcctcgacl tcaaqaaqaa qacccclcacl tlcqaaagcc tctaccltqlt 60
tllaacagala tllaacaaag acccaaaqaa qltcaacqaa qaacqqlaaa altacclagaa 120
ac'qalalalla aaaaqalalql acaacaaqaa lalaaaalaa lcaaaqalaa aqaacalal 180
qaaaaaalaa glaaagcaal aaalccclal qclqalqaa aqccclcaaa taqaalcaclt 240
qa'qclalal tclatcaclt tcaqalalaa aqcalagaa caqatqaalt tlcacclaaa 300
aagtaataca cgaagattct aaaaagaattt agaatgaagt ttcttatgca caagtatttt 360
tlatlcaclt aatataqlta aatataaac tlatqlclt clqctaaac atqatllcaa 420
qqacltcaac atlcaclaa qltclatllt tltcltcaaa aatataaac tltatcllt 480
ttttaaaaa atataattct aaaaataata atactgqaa taattcaagt qttagaaaa 540
acclataaat taqaalaaa clatcaaccl talcaaalaa attcaaalaa tltatclt 600
accccltata aacclttagg aggttagtla gaatgaaga agttglacta gctagtgca 660
taagaacaga gattggatct tatggaaagt ctcttaagga tctccacaga gtagatttag 720
gaactacaga tataaagcaa gaagttaaaa aagcaggaat caaacacaga gatgttaatg 780
aagtcatttt aggaatggt ctccacagag gtttaggaca gaatccacga agacaggaat 840
cttttaacaga aggattacaa gttgaaatc cagctatgca tattaatag gtttgtggt 900
caggaattag aacagttaga ctgcagcaac aactataaa agcaggagat gctgaagtaa 960
laalagcaac tclcltqaaa aalataclaa qacclcltla cltlaqaaal aaccltcaal 1020
ggggatctag aatgggaac gctaaattg ttgatgaat gacactgac gatttgctgg 1080
atgcatttaa cgaatccac atgggaataa cagcagaaaa catagctgag agatggcaaa 1140
tllcaagaga agaacagat gagtllgct tlgcaalcaa aaaaagagcl gaagaagcl 1200
taaaatcagg caaatttaa gatgaatag ttctgtagt aactaaagga agaaaggag 1260
aaactgtagt cgaacagat gagcaccata gatttgatc aactatagaa ggaattgcaa 1320
aactaaaaa cgcctcaaa aaagatggaa cagttacaga tggtaatgca ccaggattaa 1380
atgaactgtc agcagtaact gtaactga gtgcagaaaa agctaaagag ctggagtaa 1440
aaccaattgc caagatagct ttctatgggt cagcaggagt tgaacacaga ataatggat 1500
atggacattt ctatgcaaaa aaagcagaa ttgaaaaaga aggttggaac gttgatgaat 1560
tagattcaat agaatcaat gaagctctg cagctcaag tttagcagta gcaaaagatt 1620
taaaatttga cagcaataa gtaaatgtaa atggaggaga tcttgcaat ggtcatcaa 1680
ttggagcaat aggtgcaaga atactgtha ctcttgtaa cgaatgcaa aaagagatg 1740
caaaaaaagg cttagcaact ttatgtatag gtggcggaca agaacacaga atattgctag 1800
aaaagtgtc gaaaggatcc tgttaactt taagaaggag atatacatat gttggataat 1860

ES 2 639 224 T3

[illegible]

lgaagggagaa	accccaagaa	aaaaacaaa	gaatctctt	gaatctctt	lcttctctt	4680
gtaactctgt	gcttgcacaa	aaaaaaaca	cgctacacag	cgctggtgtg	tttgcgggat	4740
caagagctac	caactctctt	tcgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	4800
actgctctt	tagtgtagcc	gtagttaggc	caacacttca	agactctgt	aggacgcct	4860
acatactctg	ctctgctaat	ctgtttacca	gtggtgtgtg	ccagtgggga	taagtctgt	4920
ctaacgggt	cgactcaag	acgatagtta	cggataagg	cgcagcggtc	gggtcgaag	4980
ggggtctgt	gcacacagcc	cagcttggag	gcaacgcct	accccgacct	gagatactc	5040
cagcgtgagc	tatgagaag	cgccacgctt	cccgaggga	gaacggggga	caggtatcgg	5100
gtaagcgga	gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	5160
tactcttata	gtccgttggg	gtttcgccac	ctctgaactg	agcgtcgact	ttgtgctgc	5220
tgttcgggg	ggcgagcct	atggcaaac	gcagccaac	ggccttttt	acgttctctg	5280
gcctcttct	ggccttttgc	tcacatgttc	tttctctgt	tatccctga	ttctgtggat	5340
aacctcttta	cgccttttgc	gtgagctgt	acgctctgac	gcagccgac	gacgcgagc	5400
aggagctcag	tcaggagaga	agcggaagag	cgcccaatac	gcaaacgac	tcctcccgcg	5460
cgttcggcgc	ttcattaatg	cagctggcac	gacaggttcc	cgcctggaa	agcgggcagt	5520
gagcgcaacg	caattaatgt	gagttagctc	actcaatagg	cccccaggg	tttaacttt	5580
atgcttcagg	ctgctatgtt	gtgtggaatt	gtgagcggat	caaatctca	cacaggaaac	5640
agctatgac	atgattacgc	caagcttctg	ctaacacaca	cgcctttcca	accaatagtt	5700
lctctgcat	aaacccatcc	tcctgcatct	aaatgacata	atcccttcaa	aaacattaa	5760
agtctaacac	actagactta	tttaactctg	aattaaagtc	ttaaacgctg	tgctctacga	5820
cccaacatct	aaacccctta	aaacctttct	lcttctctct	aaacacaaa	actagataaa	5880
tcctctcat	cttcttctca	atactcctct	cagattccac	tataattta	cagatcactc	5940
atcctcttca	tattctctca	ccctctctct	ataatttctc	taatttttca	ccacacaaa	6000
aaacacacac	gttataatca	cccaacaaa	tataaacac	aatcaaacct	ttattctctc	6060
aaacacata	atagataaaa	taatgcacac	tataagatta	aatgaacctg	ataatctctt	6120
tgcaatcggc	tcgggaacag	ggcattttac	ctctgaattta	gtacagaggt	gtaatttctg	6180
aaclcccatl	aaaaatagac	ataatctata	caaaactaca	qaaalaaa	tlqllctatc	6240
cgtaaatctt	caagctttta	ccaggtatct	atgcagcttt	aaattttcta	caaacacata	6300
ctataaata	tttggttaata	tcactttata	ctaaagctag	gatacaatac	gcacaaatgt	6360
lctctcatct	atagctgata	acattctctt	aatcctgaaa	taaggtctct	ctaaaagatt	6420
atlaaatata	aaacgcctct	tggaattatt	lcttaagcca	gaagtlgata	ttctctatct	6480
aaclatctct	cccaagaaat	atllctctct	taaacctaaa	atcaataact	cacllatcac	6540
atlaaataga	aaaaaatata	aaatctatac	caaaactaaa	caaaatata	atattctct	6600
lctaaactga	gttaacacag	aatcaacaaa	aatatttaca	aaaaatcaat	taaacattct	6660
cttaaacact	gaaggaattg	agcttttaaa	caattataga	tttaaacact	tcctatctct	6720
lctcaataga	tataaattct	taataagata	agtaagcca	taataaacct	caclccctta	6780
actctctctt	ctctctctta	lcttctctga	atcgaattta	tccttctgac	attctctct	6840
ttctctata	aatatgagcg	aaggaataaa	ggctcggaaa	agcagcaaaa	agtttctctt	6900
lctctctctg	agcatagcca	lctcagccct	acclatctct	acclcaatcc	ccaccccaac	6960
ccaccccaac	gctacatctt	acclatagata	acccctcgtt	acclcccaac	accltatata	7020
gaaagcaaga	ttcaactagg	taaaatctta	atataggttg	agatgataag	gtctataagg	7080
aatctgcttg	ttctaatctt	taactcattt	tgctctaat	tccttttaaa	aatgttctct	7140
lcttcttata	accltatata	tataatagga	ataclttaa	atacgaatga	cccaaaagat	7200
gaaagcaaga	tatggaacag	tcataaagg	ctctcagagg	ctcctagaag	aagaaagtg	7260
agaagctata	gaggtagaca	agttatacgg	taaacacac	tcgtgtaact	tcgtaaagga	7320
atatatactg	caattaataa	gtatgttaga	tatgattggc	ggaaaaaac	ttaaaatgt	7380
taactatata	ctagataatg	tcacttaag	taacataaca	atgatagata	caacacagga	7440
aatagcaaac	gctacacgaa	caactctaca	acacataata	acacacttta	aatctctaga	7500
agaaggaat	attataaaaa	gaaaaactgg	agtaataatg	ttaaacccgt	aatctataat	7560
gagaggggac	gaacaaacac	aaacacaccl	cttaaclogaa	tlgggaactl	tlgagcaaga	7620
ggcaaatgaa	atagattgac	ctcccaataa	caacacgtag	ttatggggag	gtcaatctat	7680
gaaatlgaga	lta					7693

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Evonik Degussa

<120> Células y procedimiento para la producción de acetona

<130> 200900033

5 <160> 16

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

< 211> 17

< 212> DNA

10 < 213> Artificial

<220>

< 223> Cebador

<400> 1

ggaaggtacc ttttatg 17

15 <210> 2

< 211> 25

< 212> DNA

< 213> Artificial

<220>

20 < 223> Cebador

<400> 2

gtaactctga attctattac ttaag 25

<210> 3

< 211> 20

25 < 212> DNA

< 213> Artificial

<220>

< 223> Cebador

<400> 3

30 cacaacggtg gatccaagag 20

<210> 4

< 211> 20

< 212> DNA

< 213> Artificial

35 <220>

< 223> Cebador

<400> 4

cgcgatatgg taccaatcat 20

<210> 5
 < 211> 28
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

5 <220>
 < 223> Cebador

<400> 5
 gaatttaaaa ggagggatcc aaatgaac 28

10 <210> 6
 < 211> 27
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cebador

15 <400> 6
 gtttcatagt attggtacct aaacagc 27

20 <210> 7
 < 211> 20
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cebador

<400> 7
 ctgaggtcga ctcaagaag 20

25 <210> 8
 < 211> 29
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

30 <220>
 < 223> Cebador

<400> 8
 cagagttatt ttaaggatc cttttagc 29

35 <210> 9
 < 211> 30
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cebador

40 <400> 9
 caattgggat ccgataacaa ttccacacag 30

<210> 10
 < 211> 29

< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador

5 <400> 10
gagatctggt acccggttaa atgacgga 29

<210> 11
< 211> 28
< 212> DNA
10 < 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador

<400> 11
ctctagaagg atcctgttta actttaag 28

15 <210> 12
< 211> 25
< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
20 < 223> Cebador

<400> 12
attgggtacc tcattgcata ctccg 25

<210> 13
< 211> 8559
25 < 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> Plásmido

ES 2 639 224 T3

<400> 13
agcttggctg caggtcgact tcaagaagag gcacctcatc ttggaaagcc tgtacttggt 60
ttaagagatg ttactgaaag accagaagca gttgaggcag gaacggtaaa attagtagga 120
actgatatta aaaagatagt agacgaagcc tataaaataa tgaaagatga agaagaatat 180
gaaaaaatga gtaaggcaat aaatccatat ggtgatggaa aggccttcaga tagaatagtt 240
gatgctatat tgtatcattt tggagtatta aaggatagac cagatgaatt ttcacctaaa 300
aagtaataca tgagcattct aaaagaattt agaatgaagt ttcttatgca caagtatttt 360
ttattacatt aatatagtta aaatataaac ttatgtattt atgctaaaac atgattttta 420
gggggttagc atatgcataa gtttaatttt ttgttaaaa aatattaaac tttgtgtttt 480
ttttaacaaa atatattgat aaaaataata atagtgggta taattaagtt gttagagaaa 540
acgtataaat tagggataaa ctatggaact tatgaaatag attgaaatgg tttatctggt 600
accccgatc aaaatttagg aggttagtta gaatgaaaga agttgtaata gctagtgcag 660
taagaacagc gattggatct tatggaaagt ctcttaagga tgtaccagca gtagatttag 720

ES 2 639 224 T3

gagctacagc tataaaggaa gcagttaaaa aagcaggaat aaaaccagag gatgttaatg 780
 aagtcatttt aggaaatgtt cttcaagcag gtttaggaca gaatccagca agacaggcat 840
 cttttaaagc aggattacca gttgaaattc cagctatgac tattaataag gtttgtgggt 900
 caggacttag aacagttagc ttagcagcac aaattataaa agcaggagat gctgacgtaa 960
 taatagcagg tggatatgaa aatatgtcta gagctcctta cttagcgaat aacgctagat 1020
 ggggatatag aatgggaaac gctaaatttg ttgatgaaat gatcactgac ggattgtggg 1080
 atgcatttaa tgattaccac atgggaataa cagcagaaaa catagctgag agatggaaca 1140
 tttcaagaga agaacaagat gagtttgctc ttgcatcaca aaaaaaagct gaagaagcta 1200
 taaaatcagg tcaattttaa gatgaaatag ttctgtagt aattaaaggc agaaaggag 1260
 aaactgtagt tgatacagat gagcacccta gatttgatc aactatagaa ggacttgcaa 1320
 aattaaacc tgccttcaaa aaagatggaa cagttacagc tggtaatgca tcaggattaa 1380
 atgactgtgc agcagtactt gtaatcatga gtgcagaaaa agctaaagag cttggagtaa 1440
 aaccacttgc taagatagtt tcttatgggt cagcaggagt tgaccagca ataatgggat 1500
 atggaccttt ctatgcaaca aaagcagcta ttgaaaaagc aggttgagca gttgatgaat 1560
 tagatttaat agaatacaat gaagcttttg cagctcaaag tttagcagta gcaaaagatt 1620
 taaaatttga tatgaataaa gtaaatgtaa atggaggagc tattgccctt ggtcatccaa 1680
 ttggagcatc aggtgcaaga atactcgtaa ctctgtaca cgcaatgcaa aaaagagatg 1740
 caaaaaaagg cttagcaact ttatgtatag gtggcggaca aggaacagca atattgctag 1800
 aaaagtgcta gaaaggatcc aaatgaactc taaaataatt agatttgaaa atttaaggtc 1860
 attcttttaa gatgggatga caattatgat tggaggtttt ttaaactgtg gcaactccaac 1920
 caaattaatt gatttttttag ttaattttaa tataaagaat ttaacgatta taagtaatga 1980
 tacatgttat cctaatacag gtatttgtaa gttaatatca aataatcaag taaaaaagct 2040
 tattgcttca tatataggca gcaaccaga tactggcaaa aaacttttta ataatgaact 2100
 tgaagtagag ctctctcccc aaggaaactc agtggaaaga atacgtgcag gcggatctgg 2160
 cttaggtggt gtactaacta aaacagggtt aggaactttg attgaaaaag gaaagaaaaa 2220
 aatatctata aatggaacgg aatatttggt agagctacct cttacagccg atgtagcatt 2280
 aattaaagg agtattgtag atgagccgg aaacaccttc tataaaggta ctactaaaaa 2340
 ctttaatccc tatatggcaa tggcagctaa aaccgtaata gttgaagctg aaaatttagt 2400
 tagctgtgaa aaactagaaa aggaaaaagc aatgaccccc ggagttctta taaattatat 2460
 agtaaaggag cctgcataaa atgattaatg ataaaaacct agcgaagaa ataatagcca 2520
 aaagagttgc aagagaatta aaaaatggtc aacttgtaaa cttaggtgta ggtcttctta 2580
 ccatggttgc agattatata ccaaaaaatt tcaaaattac tttccaatca gaaaacggaa 2640

ES 2 639 224 T3

tagttggaat gggcgctagt cctaaaataa atgaggcaga taaagatgta gtaaatgcag	2700
gaggagacta tacaacagta cttcctgacg gcacattttt cgatagctca gtttcgtttt	2760
cactaatccg tgggtggtcac gtagatgtta ctgttttagg ggctctccag gtagatgaaa	2820
agggtaatat agccaattgg attgttcctg gaaaaatgct ctctgggatg ggtggagcta	2880
tggatttagt aaatggagct aagaaagtaa taattgcaat gagacataca aataaaggtc	2940
aacctaaaat tttaaaaaaa tgtacacttc ccctcacggc aaagtctcaa gcaaatctaa	3000
ttgtaacaga acttgagta attgagggtta ttaatgatgg tttacttctc actgaaatta	3060
ataaaaacac aaccattgat gaaataaggt ctttaactgc tgcagattta ctcatatcca	3120
atgaacttag acccatggct gtttaggtac cttttatggt aaaggatgaa gtaattaaac	3180
aaattagcac gccattaact tcgcctgcat ttcttagagg accctataaa tttcataatc	3240
gtgagtattt taacattgta tatcgtacag atatggatgc acttcgtaaa gttgtgccag	3300
agcctttaga aattgatgag cccttagtca ggtttgaaat tatggcaatg catgatacga	3360
gtggacttgg ttgttataca gaaagcggac aggctattcc cgtaagcttt aatggagtta	3420
agggagatta tcttcatatg atgtatttag ataatgagcc tgcaattgca gtaggaaggg	3480
aattaagtgc atatcctaaa aagctcgggt atccaaagct ttttgtggat tcagatactt	3540
tagtaggaac tttagactat ggaaaactta gagttgcgac agctacaatg gggtaaaaac	3600
ataaagcctt agatgctaata gaagcaaagg atcaaatttg tcgccctaata tatatgttga	3660
aaataataacc caattatgat ggaagcccta gaatatgtga gcttataaat gcgaaaatca	3720
cagatgttac cgtacatgaa gcttggacag gaccaactcg actgcagtta tttgatcacg	3780
ctatggcgcc acttaatgat ttgccagtaa aagagattgt ttctagctct cacattcttg	3840
cagatataat attgcctaga gctgaagtta tatatgatta tcttaagtaa tagaattcac	3900
tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc	3960
ttgcagcaca tcccccttcc gccagctggc gtaatagcga agaggcccg accgatcgcc	4020
cttccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgccct gatgcggtat tttctcctta	4080
cgcactctgt cggtatttca caccgcataat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg	4140
ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt	4200
gtctgtctcc ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc	4260
agaggttttc accgtcatca ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat	4320
ttttataggt taatgtcatg ataataatgg tttcttagac gtcagggtggc acttttcggg	4380
gaaatgtgcg cggaaccctt atttgtttat ttttctaaat acattcaaata atgtatccgc	4440
tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataaatattg aaaaaggaag agtatgagta	4500

ES 2 639 224 T3

ttcaacattt cegtgtcgcc ettattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg	4560
ctcaccacaga aacgctgggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg	4620
gttacatcga actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc ccggaagaac	4680
gttttccaat gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcgggtatta tcccgattg	4740
acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt	4800
actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg	4860
ctgccataac catgagtgat aacactcggg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac	4920
cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt	4980
gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag	5040
caatggcaac aacgttgccg aaactattaa ctggcgaaact acttactcta gcttcccggc	5100
aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgtcggcccc	5160
ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggtg	5220
tcattgcagc actggggcca gatggtgaag cctcccgat cgtagttatc tacacgacgg	5280
ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga	5340
ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaaac	5400
ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacccaaa	5460
tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat	5520
cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc	5580
taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggttaactg	5640
gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc	5700
acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgtctt gctaactctg ttaccagtgg	5760
ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg	5820
ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa	5880
cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg	5940
aaggagagaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggg cggaacagga gagcgcacga	6000
gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cggcacctct	6060
gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca	6120
gcaacgcggc ctttttacgg ttcttgccct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc	6180
ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg	6240
ctcgcgcgag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc	6300
caatacgcaa accgcctctc ccgcgcggtt ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca	6360
ggtttcccgga ctggaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc	6420

ES 2 639 224 T3

attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga	6480
gcggataaca atttcacaca ggaaacagct atgaccatga ttacgccaaag ctttggctaa	6540
cacacacgcc attccaacca atagttttct cggcataaag ccatgctctg acgcttaaat	6600
gcactaatgc cttaaaaaaa cattaaagtc taacacacta gacttattta cttcgttaatt	6660
aagtcgttaa accgtgtgct ctacgaccaa aagtataaaa cctttaagaa ctttcttttt	6720
tcttgtaaaa aaagaaacta gataaatctc tcatatcttt tattcaataa tcgcatcaga	6780
ttgcagtata aatttaacga tcactcatca tgttcatatt tatcagagct cgtgctataa	6840
ttataactaat ttataagga ggaaaaaata aagagggtta taatgaacga gaaaaatata	6900
aaacacagtc aaaactttat tacttcaaaa cataatatag ataaaataat gacaaatata	6960
agattaaatg aacatgataa tatctttgaa atcggctcag gaaaaggga ttttaccctt	7020
gaattagtac agagggtgaa tttcgttaact gccattgaaa tagaccataa attatgcaa	7080
actacagaaa ataaacttgt tgatcacgat aatttccaag ttttaacaa ggatatattg	7140
cagtttaaat ttccataaaa ccaatcctat aaaatatttg gtaatatacc ttataacata	7200
agtacggata taatacga aattgttttt gatagtatag ctgatgagat ttatttaatc	7260
gtggaatacg ggtttgctaa aagattatta aatacaaaac gctcattggc attattttta	7320
atggcagaag ttgatatttc tatattaagt atggttccaa gagaatattt tcatcctaaa	7380
cctaaagtga atagctcact tatcagatta aatagaaaaa aatcaagaat atcacacaaa	7440
gataaacaga agtataatta tttcgttatg aaatgggtta acaaagaata caagaaaata	7500
tttacaaaaa atcaatttaa caattcctta aaacatgcag gaattgacga tttaaacaat	7560
attagctttg aacaattcct atctcttttc aatagctata aattatttaa taagtaagtt	7620
aagggtgca taaactgcat cccttaactt gtttttcgtg tacctatttt ttgtgaatcg	7680
attatgtctt ttgcgcattc acttcttttc tatataaata tgagcgaagc gaataagcgt	7740
cggaaaagca gcaaaaagtt tcctttttgc tgttgagca tgggggttca gggggtgcag	7800
tatctgacgt caatgccgag cgaaagcgag cogaagggtta gcatttacgt tagataaccc	7860
cctgatatgc tccgacgctt tatatagaaa agaagattca actaggtaaa atcttaatat	7920
agggtgagat gataaggttt ataaggaatt tgtttgtct aatttttcac tcattttgtt	7980
ctaatttctt ttaacaaatg ttcttttttt tttagaacag ttatgatata gttagaatag	8040
tttaaaataa ggagtgagaa aaagatgaaa gaaagatatg gaacagtcta taaaggctct	8100
cagaggctca tagacgaaga aagtggagaa gtcatagagg tagacaagtt ataccgtaa	8160
caaacgtctg gtaacttcgt aaaggcatat atagtgcaat taataagtat gttagatatg	8220
attggcgga aaaaacttaa aatcgtaac tatatcctag ataatgtcca ctttaagtaac	8280

aatacaatga tagctacaac aagagaaata gcaaaagcta caggaacaag tctacaaaca	8340
gtaataacaa cacttaaaat cttagaagaa ggaaatatta taaaaagaaa aactggagta	8400
ttaatgttaa accctgaact actaatgaga ggcgacgacc aaaaacaaaa atacctctta	8460
ctcgaatttg ggaactttga gcaagaggca aatgaaatag attgacctcc caataacacc	8520
acgtagtatt tgggaggtca atctatgaaa atgcgatta	8559

<210> 14
 < 211> 8563
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

5

<220>
 < 223> Plásmido

<400> 14 agcttggtcg caggtcgact tcaagaagag gcacctcatc ttggaaagcc tgtacttggt	60
ttaagagatg ttactgaaag accagaagca gttgaggcag gaacggtaaa attagtagga	120
actgatatta aaaagatagt agacgaagcc tataaaataa tgaaagatga agaagaatat	180
gaaaaaatga gtaaggcaat aaatccatat ggtgatggaa aggcttcaga tagaatagtt	240
gatgctatat tgtatcattt tggagtatta aaggatagac cagatgaatt ttcacctaaa	300
aagtaatata tgagcattct aaaagaattt agaatgaagt ttcttatgca caagtatttt	360
ttattacatt aatatagtta aaatataaac ttatgtattt atgctaaaac atgattttta	420
ggggggttagc atatgcataa gtttaatttt tttgttaaaa aatattaaac tttgtgtttt	480
ttttaacaaa atatattgat aaaaataata atagtgggta taattaagtt gttagagaaa	540
acgtataaat tagggataaa ctatggaact tatgaaatag attgaaatgg tttatctggt	600
accccgatc aaaatttagg aggttagtta gaatgaaaga agttgtaata gctagtgcag	660
taagaacagc gattggatct tatggaaagt ctcttaagga tgtaccagca gtagatttag	720
gagctacagc tataaaggaa gcagttaaaa aagcaggaat aaaaccagag gatgttaatg	780
aagtcatttt aggaaatggt cttcaagcag gtttaggaca gaatccagca agacaggcat	840
cttttaaaagc aggattacca gttgaaattc cagctatgac tattaataag gtttgtggtt	900
caggacttag aacagttagc ttagcagcac aaattataaa agcaggagat gctgacgtaa	960
taatagcagg tggatatgaa aatatgtcta gagctcctta cttagcgaat aacgctagat	1020
ggggatatag aatgggaaac gctaaatttg ttgatgaaat gatcactgac ggattgtggg	1080
atgcatttaa tgattaccac atgggaataa cagcagaaaa catagctgag agatggaaca	1140
tttcaagaga agaacaagat gagtttgctc ttgcatcaca aaaaaagct gaagaagcta	1200
taaaatcagg tcaatttaaa gatgaaatag ttcctgtagt aattaaaggc agaaaggag	1260
aaactgtagt tgatacagat gagcacccta gatttggatc aactatagaa ggacttgcaa	1320

10

ES 2 639 224 T3

aattaaaacc tgccttcaaa aaagatggaa cagttacagc tggtaatgca tcaggattaa	1380
atgactgtgc agcagtactt gtaatcatga gtgcagaaaa agctaaagag cttggagtaa	1440
aaccacttgc taagatagtt tcttatgggt cagcaggagt tgaccagca ataatgggat	1500
atggaccttt ctatgcaaca aaagcagcta ttgaaaaagc aggttggaca gttgatgaat	1560
tagatttaat agaatcaaat gaagcttttg cagctcaaag tttagcagta gcaaaagatt	1620
taaaatttga tatgaataaa gtaaatgtaa atggaggagc tattgccctt ggtcatccaa	1680
ttggagcatc aggtgcaaga atactcgtta ctcttgtaga cgcaatgcaa aaaagagatg	1740
caaaaaaagg cttagcaact ttatgtatag gtggcggaca aggaacagca atattgctag	1800
aaaagtgcta gaaaggatcc aagagggata aaaaatgaaa acaaaattga tgacattaca	1860
agacgccacc ggcttctttc gtgacggcat gaccatcatg gtggcgggat ttatggggat	1920
tggcactcca tccgccttgg ttgaagcatt actggaatct ggtgttcgag acctgacatt	1980
gatagccaat gataccgcgt ttgttgatac cggcatcggg ccgctcatcg tcaatggtcg	2040
agtccgcaaa gtgattgctt cacaatcagg caccaccccg gaaacaggtc ggcgcgatg	2100
atctggtgag atggacgtcg ttctggtgcc gcaaggtagc ctaatcgagc aaattcgtcg	2160
tgggtggagct ggacttggtg gttttctcac cccaacgggt gtcggcaccg tcgtagagga	2220
aggcaaacag aactgacac tcgacggtaa aacctggctg ctggaacgcc cactgcgcgc	2280
cgacctggcg ctaattcgcg ctcatcgttg cgacacactt ggcaacctga cctatcaact	2340
tagcgcgccg aactttaacc ccctgatagc ccttgccggt gatatcacgc tggtagagcc	2400
agatgaactg gtcgaaaccg gcgagctgca acctgaccat attgtcaccg ctggtgccgt	2460
tatcgaccac atcatcgttt cacaggagag caaataatgg atgcgaaaca acgtattgcg	2520
cgccgtgtgg cgcaagagct tcgtgatggg gacatcgtta acttagggat cggtttaccg	2580
acaatggctg ccaattatgt accggagggt attcatatca ctctgcaatc ggaaaacggc	2640
ttcctcgggt taggcccggg cagcagagcg catccagatc tggtagaacg tggcgggcaa	2700
ccgtgcgggt ttttaccggg tgcagccatg tttgatagcg ccatgtcatt tgcgctaac	2760
cgtggcgggt atattgatgc ctgcgtgctc ggcggtttgc aagtagacga agaagcaaac	2820
ctcgcgaact gggtagtgcc tgggaaaatg gtgcccggta tgggtggcgc gatggatctg	2880
gtgaccgggt cgcgcaaagt gatcatcgcc atggaacatt gcgccaaaga tggttcagca	2940
aaaattttgc gccgctgcac catgccactc actgcgcaac atgcgggtgca tatgctggtt	3000
actgaactgg ctgtctttcg ttttattgac ggcaaaatgt ggctcaccga aattgccgac	3060
gggtgtgatt tagccaccgt gcgtgccaaa acagaagctc ggtttgaagt cgccgccgat	3120
ctgaatacgc aacgggggtga tttatgattg gtacctttta tgttaaagga tgaagtaatt	3180

ES 2 639 224 T3

aaacaaatta	gcacgccatt	aacttcgcct	gcatttccta	gaggacccta	taaatttcac	3240
aatcgtgagt	attttaacat	tgtatatcgt	acagatatgg	atgcacttcg	taaagttgtg	3300
ccagagccctt	tagaaattga	tgagccctta	gtcaggtttg	aaattatggc	aatgcatgat	3360
acgagtggac	ttggttggtta	tacagaaagc	ggacaggcta	ttcccgttaag	ctttaatgga	3420
gttaaggagg	attatcttca	tatgatgtat	ttagataatg	agcctgcaat	tgacagtagga	3480
aggaattaa	gtgcatatcc	taaaaagctc	gggtatccaa	agctttttgt	ggattcagat	3540
actttagtag	gaactttaga	ctatggaaaa	cttagagttg	cgacagctac	aatggggtag	3600
aaacataaag	ccttagatgc	taatgaagca	aaggatcaaa	tttgtcgccc	taattatatg	3660
ttgaaaataa	tacccaatta	tgatggaagc	cctagaatat	gtgagcttat	aaatgcgaaa	3720
atcacagatg	ttaccgtaca	tgaagcttgg	acaggaccaa	ctcgactgca	gttatttgat	3780
cacgctatgg	cgccacttaa	tgatttgcca	gtaaaagaga	ttgtttctag	ctctcacatt	3840
cttgacagata	taatatggcc	tagagctgaa	gttatatatg	attatcttaa	gtaatagaat	3900
tcactggccg	tcgttttaca	acgtcgtgac	tgggaaaacc	ctggcggtac	ccaacttaat	3960
cgccttgacg	cacatccccc	tttcgccagc	tggcgtaata	gcgaagaggc	ccgcaccgat	4020
cgcctctccc	aacagttgcg	cagcctgaat	ggcgaatggc	gcctgatgcg	gtattttctc	4080
cttacgcctc	tgtgcggtat	ttcacaccgc	atatggtgca	ctctcagtag	aatctgctct	4140
gatgcgcgat	agttaagcca	gccccgacac	ccgccaacac	ccgtgacgc	gccctgacgg	4200
gcttgtctgc	tcccggcctc	cgcttacaga	caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	4260
tgtcagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	cgcgcgagac	gaaagggcct	cgtgatacgc	4320
ctatttttat	aggttaatgt	catgataata	atggtttctt	agacgtcagg	tggcactttt	4380
cggggaaatg	tgccgcggaac	ccctatttgt	ttatttttct	aaatacattc	aaatatgtat	4440
ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	attgaaaaag	gaagagtatg	4500
agtattcaac	atttcctgtg	cgccttattt	cccttttttg	cggcattttg	ccttcctggt	4560
tttgcctacc	cagaaaacgt	ggtgaaagta	aaagatgctg	aagatcagtt	gggtgcacga	4620
gtgggttaca	tcgaaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	ttgagagttt	tcgccccgaa	4680
gaacgttttc	caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	gtggcgcggt	attatcccg	4740
attgacgcgg	ggcaagagca	actcggtcgc	cgcatacact	attctcagaa	tgacttggtt	4800
gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	tgacagtaag	agaattatgc	4860
agtgcctcca	taaccatgag	tgataaacct	gcggccaact	tacttctgac	aacgatcgga	4920
ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	atcatgtaac	tcgccttgat	4980
cgttggaac	cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	agcgtgacac	cacgatgcct	5040
gtagcaatgg	caacaacggt	gcgcaaaact	ttaactggcg	aactacttac	tctagcttcc	5100

ES 2 639 224 T3

cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg 5160
 gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag cgggtgagcg tgggtctcgc 5220
 ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg 5280
 acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca 5340
 ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta 5400
 aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc 5460
 aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa 5520
 ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca 5580
 ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta 5640
 actggttca gcagagcgca gataccaaat actgtcctt tagttagacc gtagttaggc 5700
 caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgcta at cctgttacca 5760
 gtggctgctg ccagtggcga taagtctgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta 5820
 ccggataagg cgcagcggtc ggggtgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag 5880
 cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt 5940
 cccgaagggg gaaaggcgga caggtatccg gtaagcgga gggtcggaac aggagagcgc 6000
 acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac 6060
 ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac 6120
 gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttctg ggccttttgc tcacatgttc 6180
 tttctcgct tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat 6240
 accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcagtcag tgagcgagga agcggaagag 6300
 cgcccaatac gcaaacgcc tctcccgcg cgttgccga ttcattaatg cagctggcac 6360
 gacaggttcc cgcactggaa agcgggcagt gagcgcaac caattaatgt gagttagctc 6420
 actcattagg caccocagc tttacacttt atgcttccgg ctcgatggt gtgtggaatt 6480
 gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagctttgg 6540
 ctaacacaca cgccattcca accaatagtt ttctcgcat aaagccatgc tctgacgctt 6600
 aaatgcacta atgccttaaa aaaacattaa agtctaacac actagactta tttacttcgt 6660
 aattaagtcg ttaaaccgtg tgctctacga ccaaaagtat aaaaccttta agaactttct 6720
 tttttctgt aaaaaagaa actagataaa tctctcatat cttttattca ataatcgcat 6780
 cagattgcag tataaattta acgatcactc atcatgttca tttttatcag agctcgtgct 6840
 ataattatac taattttata aggaggaaaa aataaagagg gttataatga acgagaaaaa 6900
 tataaaacac agtcaaaact ttattacttc aaaacataat atagataaaa taatgacaaa 6960

ES 2 639 224 T3

tataagatta aatgaacatg ataatatctt tgaaatcggc tcaggaaaag ggcattttac	7020
ccttgaatta gtacagaggt gtaatttcgt aactgccatt gaaatagacc ataaattatg	7080
caaaactaca gaaaataaac ttgttgatca cgataatttc caagttttaa acaaggatat	7140
attgcagttt aaatttccta aaaaccaatc ctataaaata tttggtaata taccttataa	7200
cataagtacg gatataatac gcaaaattgt ttttgatagt atagctgatg agatttattt	7260
aatcgtggaa tacgggtttg ctaaaagatt attaaatata aaacgctcat tggcattatt	7320
tttaatggca gaagttgata tttctatatt aagtatgggt ccaagagaat attttcatcc	7380
taaacctaaa gtgaatagct cacttatcag attaaataga aaaaaatcaa gaatatcaca	7440
caaagataaa cagaagtata attatttcgt tatgaaatgg gttaacaaag aatacaagaa	7500
aatatttaca aaaaatcaat ttaacaattc cttaaaacat gcaggaattg acgatttaaa	7560
caatattagc tttgaacaat tcttatctct tttcaatagc tataaattat ttaataagta	7620
agttaagggg tgcataaaact gcattccctta acttggtttt cgtgtacctt tttttgtga	7680
atcgattatg tcttttgcgc attcacttct tttctatata aatatgagcg aagcgaataa	7740
gcgtcggaaa agcagcaaaa agtttccttt ttgctgttg agcatggggg ttcagggggg	7800
gcagtatctg acgtcaatgc cgagcgaaag cgagccgaag ggtagcattt acgttagata	7860
acccctgat atgctccgac gctttatata gaaaagaaga ttcaactagg taaaatctta	7920
atataggttg agatgataag gtttataagg aatttgtttg ttctaatttt tcaactcattt	7980
tgttctaatt tcttttaaca aatgttcttt tttttttaga acagttatga tatagttaga	8040
atagtttaaa ataaggagtg agaaaaagat gaaagaaaga tatggaacag tctataaagg	8100
ctctcagagg ctcatagacg aagaaagtgg agaagtcata gaggtagaca agttataccg	8160
taaacaaacg tctggtaact tcgtaaaggc atatatagtg caattaataa gtatgttaga	8220
tatgattggc ggaaaaaac ttaaaatcgt taactatatc ctagataatg tccacttaag	8280
taacaatata atgatagcta caacaagaga aatagcaaaa gctacaggaa caagtctaca	8340
aacagtaata acaacactta aaatcttaga agaaggaaat attataaaaa gaaaaactgg	8400
agtattaatg ttaaaccctg aactactaat gagaggcgac gaccaaaaac aaaaatacct	8460
cttactcgaa tttgggaact ttgagcaaga ggcaaatgaa atagattgac ctcccaataa	8520
caccacgtag ttattgggag gtcaatctat gaaaatgcga tta	8563

<210> 15
 <211> 8004
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido

ES 2 639 224 T3

<400> 15
agcttggctg caggtcgact tcaagaagag gcacctcatc ttggaaagcc tgtacttggt 60
ttaagagatg ttactgaaag accagaagca gttgaggcag gaacggtaaa attagtagga 120
actgatatta aaaagatagt agacgaagcc tataaaataa tgaaagatga agaagaatat 180
gaaaaaatga gtaaggcaat aaatccatat ggtgatggaa aggcttcaga tagaatagtt 240
gatgctatat tgtatcattt tggagtatta aaggatagac cagatgaatt ttcacctaaa 300
aagtaataca tgagcattct aaaagaattt agaatgaagt ttcttatgca caagtatttt 360
ttattacatt aatatagtta aaatataaac ttatgtattt atgctaaaac atgattttta 420
ggggggttagc atatgcataa gtttaatttt ttgttataaa aatattaaac tttgtgtttt 480
ttttaacaaa atatattgat aaaaataata atagtgggta taattaagtt gttagagaaa 540
acgtataaat tagggataaa ctatggaact tatgaaatag attgaaatgg tttatctggt 600
accccgatc aaaatttagg aggttagtta gaatgaaaga agttgtaata gctagtgcag 660
taagaacagc gattggatct tatggaaagt ctcttaagga tgtaccagca gtagatttag 720
gagctacagc tataaaggaa gcagttaaaa aagcaggaat aaaaccagag gatgttaatg 780
aagtcatttt aggaaatggt cttcaagcag gtttaggaca gaatccagca agacaggcat 840
cttttaagc aggattacca gttgaaattc cagctatgac tattaataag gtttgtggtt 900
caggacttag aacagttagc ttagcagcac aaattataaa agcaggagat gctgacgtaa 960
taatagcagg tggataggaa aatatgtcta gagctcctta cttagcgaat aacgctagat 1020
ggggatatag aatgggaaac gctaaatttg ttgatgaaat gatcactgac ggattgtggg 1080
atgcatttaa tgattaccac atgggaataa cagcagaaaa catagctgag agatggaaca 1140
tttcaagaga agaacaagat gagtttgctc ttgcatcaca aaaaaagct gaagaagcta 1200
taaaatcagg tcaattttaa gatgaaatag ttctgtagt aattaaaggc agaaaggag 1260
aaactgtagt tgatacagat gagcacccta gatttggatc aactatagaa ggacttcaa 1320
aattaaaacc tgccttcaaa aaagatggaa cagttacagc tggtaatgca tcaggattaa 1380
atgactgtgc agcagtactt gtaatcatga gtgcagaaaa agctaaagag cttggagtaa 1440
aaccacttgc taagatagtt tcttatggtt cagcaggagt tgaccagca ataatgggat 1500
atggaccttt ctatgcaaca aaagcagcta ttgaaaaagc aggttggaca gttgatgaat 1560
tagatttaat agaatcaaat gaagcttttg cagctcaaag tttagcagta gcaaaagatt 1620
taaaatttga tatgaataaa gtaaatgtaa atggaggagc tattgccctt ggcatccaa 1680
ttggagcatc aggtgcaaga atactcgta ctctgtaca cgcaatgcaa aaaagagatg 1740
caaaaaaagg cttagcaact ttatgtatag gtggcgaca aggaacagca atattgctag 1800
aaaagtgcta gaaaggatcc gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag aggagaaatt 1860

ES 2 639 224 T3

aaccatgggc	caactcttca	aatcatttga	tgcgtcggaa	aaaacaccgc	tcacctgttt	1920
tccgtttgcc	ggcggctatt	cggcgtcggt	togccctctc	catgcttttt	tgcaggggga	1980
gtgcgagatg	ctcgtgccc	agccgcggg	acacggcacg	aatcaaacgt	cagccattga	2040
ggatctcgaa	gagctgacgg	atttgtaaa	gcaagaactg	aaccttcgcc	ctgatcggcc	2100
gtttgtgctg	ttcggacaca	gtatggcg	aatgatcacc	ttcaggctgg	cgcaaaagct	2160
tgagcgtgaa	ggcatctttc	cgcaggcggt	tatcatttct	gcaatccagc	cgcctcatat	2220
tcagcggagg	aaagtgtccc	acctgcctga	tgatcagttt	ctcgatcata	ttatccaatt	2280
aggcggaatg	cccgcagagc	ttgttgaaaa	taaggaggtc	atgtcctttt	tcctgccttc	2340
tttccgatca	gattaccggg	ctcttgaaac	atttgagctt	tacgatctgg	cccagatcca	2400
gtcgcctgtt	catgtcttta	acgggcttga	tgataaaaaa	tgcatacgag	atgcggaagg	2460
gtggaagaag	tgggcaaaag	acatcacatt	ccatcaattt	gacggcgggc	acatgttcct	2520
gctgtcacia	acggaagaag	tgcagaacg	gatttttgcg	atcttgaatc	agcatccgat	2580
catttaaccg	ggtacctttt	atgttaaagg	atgaagtaat	taaacaaatt	agcacgccat	2640
taacttcgcc	tgcatcttct	agaggacct	ataaatttca	taatcgtgag	tattttaaca	2700
ttgtatatcg	tacagatatg	gatgcacttc	gtaaagtgtg	gccagagcct	ttagaaattg	2760
atgagccctt	agtcagggtt	gaaattatgg	caatgcata	tacgagtggg	cttgggtgtt	2820
atacagaaag	cggacaggct	attcccgtaa	gctttaatgg	agttaaggga	gattatcttc	2880
atatgatgta	tttagataat	gagcctgcaa	ttgcagtagg	aagggaatta	agtgcataac	2940
ctaaaaagct	cgggtatcca	aagctttttg	tggattcaga	tacttttagta	ggaactttag	3000
actatggaaa	acttagagtt	gcgacagcta	caatggggta	caaacataaa	gccttagatg	3060
ctaatagaag	aaaggatcaa	atttgctgcc	ctaattatat	gttgaaaata	ataccaattt	3120
atgatggaag	ccctagaata	tgtgagctta	taaatgcgaa	aatcacagat	gttaccgtac	3180
atgaagcttg	gacaggacca	actcgactgc	agttatttga	tcacgctatg	gcgccactta	3240
atgatttgcc	agtaaaagag	attgtttcta	gctctcacat	tcttgcatat	ataatattgc	3300
ctagagctga	agttatatat	gattatctta	agtaatagaa	ttcactggcc	gtcgttttac	3360
aacgtcgtga	ctgggaaaac	cctggcggtta	cccaacttaa	tcgccttgca	gcacatcccc	3420
ctttcgccag	ctggcgtaat	agcgaagagg	ccgcaccga	tcgccttccc	caacagttgc	3480
gcagcctgaa	tggcgaatgg	cgcctgatgc	ggtattttct	ccttacgcat	ctgtgcggta	3540
tttcacaccg	catatggtgc	actctcagta	caatctgctc	tgatgccgca	tagttaagcc	3600
agccccgaca	cccgccaaac	cccgtgacg	cgcctgacg	ggcttgtctg	ctcccggcat	3660
ccgcttacag	acaagctgtg	accgtctccg	ggagctgcat	gtgtcagagg	ttttcacctg	3720
catcaccgaa	acgcgcgaga	cgaaggggcc	tcgtgatagc	cctattttta	taggttaatg	3780

ES 2 639 224 T3

tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa	3840
cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac	3900
cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg	3960
tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc	4020
tgggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg	4080
atctcaacag cggtgaagtc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga	4140
gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccc tattgacgcc gggcaagagc	4200
aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag	4260
aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgcc ataaccatga	4320
gtgataaacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg	4380
cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga	4440
atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt	4500
tgcgcaaact attaaactgc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact	4560
ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt	4620
ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg	4680
ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta	4740
tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac	4800
tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta	4860
aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt	4920
tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt	4980
ttttctgctg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaac accgctacca gcggtggttt	5040
gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc	5100
agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg	5160
tagcacgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg	5220
ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg	5280
cgggtgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga gcgaacgacc tacaccgaac	5340
tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaagg agaaaggcgg	5400
acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg	5460
gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat	5520
ttttgtgatg ctcgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt	5580
tacggttctt ggccttttgc tggccttttgc ctacatggt ctttcctgcg ttatccctg	5640

ES 2 639 224 T3

attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 5700
 cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcgggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc 5760
 ctctccccgc gcgttgcccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga 5820
 aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagc 5880
 ctttacctt tatgcttcg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc 5940
 acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagctttg gctaacacac acgccattcc 6000
 aaccaatagt tttctcggca taaagccatg ctctgacgct taaatgcact aatgccttaa 6060
 aaaaacatta aagtctaaca cactagactt atttacttcg taattaagtc gttaaaccgt 6120
 gtgctctacg accaaaagta taaaaccttt aagaactttc ttttttcttg taaaaaaga 6180
 aactagataa atctctcata ttttttattc aataatcgca tcagattgca gtataaattt 6240
 aacgatcact catcatgttc atatttatca gagctcgtgc tataattata ctaattttat 6300
 aaggaggaaa aaataaagag ggttataatg aacgagaaaa atataaaaca cagtcaaaac 6360
 tttattactt caaaacataa tatagataaa ataatgacaa atataagatt aaatgaacat 6420
 gataatatct ttgaaatcgg ctacagaaaa gggcatttta ccottgaatt agtacagagg 6480
 tgtaatttcg taactgccat tgaaatagac cataaattat gcaaaactac agaaaataaa 6540
 cttgttgatc acgataattt ccaagtttta aacaaggata tattgcagtt taaatttcct 6600
 aaaaaccaat cctataaaat atttggtaat ataccttata acataagtac ggatataata 6660
 cgcaaaattg tttttgatag tatagctgat gagatttatt taatcgtgga atacggggtt 6720
 gctaaaagat tattaataac aaaacgctca ttggcattat ttttaatggc agaagttgat 6780
 atttctatat taagtatggt tccaagagaa tattttcatc ctaaacctaa agtgaatagc 6840
 tcacttatca gattaaatag aaaaaaatca agaatatcac acaaagataa acagaagtat 6900
 aattatttcg ttatgaaatg ggtaacaaa gaatacaaga aaatatttac aaaaaatcaa 6960
 tttacaatt ccttaaaaca tgcaggaatt gacgatttaa acaatattag ctttgaacaa 7020
 ttcttatctc ttttcaatag ctataaatta tttataagt aagttaaggg atgcataaac 7080
 tgcacccctt aacttgtttt tcgtgtacct attttttgtg aatcgattat gtcttttgcg 7140
 cattcacttc ttttctatat aaatatgagc gaagcgaata agcgtcggaa aagcagcaaa 7200
 aagtttcctt tttgctgttg gagcatggg gttcagggg tgcagtatct gacgtcaatg 7260
 ccgagcgaaa gcgagccgaa gggtagcatt tacgttagat aacccctga tatgctccga 7320
 cgctttatat agaaaagaag attcaactag gtaaaatctt aatataggtt gagatgataa 7380
 gggtttataag gaatttggtt gttctaattt ttcactcatt ttgttctaatt ttcttttaac 7440
 aatgttctt ttttttttag aacagttatg atatagttag aatagtttaa aataaggagt 7500
 gagaaaaaga tgaaagaaag atatggaaca gtctataaag gctctcagag gctcatagac 7560

ES 2 639 224 T3

gaagaaagtg	gagaagtcac	agaggtagac	aagttatacc	gtaaacaac	gtctggtaac	7620
ttcgtaaagg	catatatagt	gcaattaata	agtatgtag	atatgattgg	cggaaaaaaa	7680
cttaaaatcg	ttaactatat	cctagataat	gtccacttaa	gtaacaatac	aatgatagct	7740
acaacaagag	aaatagcaaa	agctacagga	acaagtctac	aaacagtaat	aacaacactt	7800
aaaatcttag	aagaaggaaa	tattataaaa	agaaaaactg	gagtattaat	gttaaaccct	7860
gaactactaa	tgagaggcga	cgaccaaaaa	caaaaatacc	tcttactcga	atttggggaa	7920
tttgagcaag	aggcaaatga	aatagattga	cctcccaata	acaccacgta	gttattggga	7980
ggtcaatcta	tgaaaatgcg	atta				8004

<210> 16
 < 211> 7693
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

5

<220>
 < 223> Plásmido

<400> 16						
agcttggtg	caggtcgact	tcaagaagag	gcacctcatc	ttggaaagcc	tgtacttggt	60
ttaagagatg	ttactgaaag	accagaagca	gttgaggcag	gaacggtaaa	attagtagga	120
actgatatta	aaaagatagt	agacgaagcc	tataaaataa	tgaaagatga	agaagaatat	180
gaaaaaatga	gtaaggcaat	aatccatat	ggtgatggaa	aggcttcaga	tagaatagtt	240
gatgctatat	tgtatcattt	tggagtatta	aaggatagac	cagatgaatt	ttcacctaaa	300
aagtaataca	tgagcattct	aaaagaattt	agaatgaagt	ttcttatgca	caagtatttt	360
ttattacatt	aatatagtta	aatataaac	ttatgtattt	atgctaaaac	atgattttta	420
ggggggttagc	atatgcataa	gtttaatttt	tttgtaaaa	aatattaaac	tttgtgtttt	480
ttttaacaaa	atatattgat	aaaaataata	atagtgggta	taattaagtt	gtagagaaa	540
acgtataaat	tagggataaa	ctatggaact	tatgaaatag	attgaaatgg	tttatctggt	600
accccgatc	aaaatttagg	aggtagtta	gaatgaaaga	agttgtaata	gctagtgcag	660
taagaacagc	gattggatct	tatggaaagt	ctcttaagga	tgtaccagca	gtagatttag	720
gagctacagc	tataaaggaa	gcagttaaaa	aagcaggaat	aaaaccagag	gatgttaatg	780
aagtcatttt	aggaaatggt	cttcaagcag	gtttaggaca	gaatccagca	agacaggcat	840
cttttaaaagc	aggattacca	gttgaaattc	cagctatgac	tattaataag	gtttgtgggt	900
caggacttag	aacagttagc	ttagcagcac	aaattataaa	agcaggagat	gctgacgtaa	960
taatagcagg	tggtatggaa	aatatgtcta	gagctcctta	cttagcgaat	aacgctagat	1020
ggggatatag	aatgggaaac	gctaaatttg	ttgatgaaat	gatcactgac	ggattgtggg	1080

10

ES 2 639 224 T3

atgcatttaa tgattaccac atgggaataa cagcagaaaa catagctgag agatggaaca	1140
tttcaagaga agaacaagat gagtttgctc ttgcatcaca aaaaaaagct gaagaagcta	1200
taaaatcagg tcaattttaaa gatgaaatag ttccctgtagt aattaaaaggc agaaagggag	1260
aaactgtagt tgatacagat gagcacccta gatttggtac aactatagaa ggacttgcaa	1320
aattaaaacc tgccttcaaa aaagatggaa cagttacagc tggtaatgca tcaggattaa	1380
atgactgtgc agcagtactt gtaatcatga gtgcagaaaa agctaaagag cttggagtaa	1440
aaccacttgc taagatagtt tcttatgggt cagcaggagt tgaccagca ataatgggat	1500
atggaccttt ctatgcaaca aaagcagcta ttgaaaaagc aggttgagca gttgatgaat	1560
tagatttaat agaatacaat gaagcttttg cagctcaaag tttagcagta gcaaaagatt	1620
taaaatttga tatgaataaa gtaaatgtaa atggaggagc tattgccctt ggtcatccaa	1680
ttggagcatc aggtgcaaga atactcgtaa ctcttgtaca cgcaatgcaa aaaagagatg	1740
caaaaaaagg cttagcaact ttatgtatag gtggcggaca aggaacagca atattgctag	1800
aaaagtgcta gaaaggatcc tgtttaactt taagaaggag atatacatat gttggataat	1860
ggcttttctt ttccctgttcg tgtgtattat gaagatactg atgcagggtg cgtagtgtat	1920
cacgctcgct atttgcattt ttttgaacga gcaagaacag aatatttgcg tacattaaat	1980
tttacgcaac aaaccttact agaggaacaa caactcgcat ttgttgtcaa aacgctcgcc	2040
attgattatt gcgtggcagc aaaattggat gatttactta tgggtggaac agaggtttca	2100
gaagtaaaag gggctacaat cctttttgaa cagagactga tgcgcaacac cctgatgtta	2160
tcaaaggcta ctgttaaggt agcctgtgtt gatctaggca agatgaaacc agtggcgttt	2220
cccaaagaag ttaaagcggc gtttcatcac ttaaaataat ttttcggagt atgcaatgag	2280
gtacctttta tgttaaaagga tgaagtaatt aaacaaatta gcacgccatt aacttcgcct	2340
gcatttcccta gaggacccta taaatttcat aatcgtgagt attttaacat tgtatatcgt	2400
acagatatgg atgcacttcg taaagtgtg ccagagcctt tagaaattga tgagccctta	2460
gtcaggtttg aaattatggc aatgcatgat acgagtggac ttggttgtta tacagaaagc	2520
ggacaggcta ttcccgtaaag ctttaaatgga gttaaggag attatcttca tatgatgtat	2580
ttagataatg agcctgcaat tgcagtagga agggaattaa gtgcatatcc taaaaagctc	2640
gggtatccaa agctttttgt ggattcagat acttttagtag gaactttaga ctatggaaaa	2700
cttagagttg cgacagctac aatgggttac aaacataaag ccttagatgc taatgaagca	2760
aaggatcaaa tttgtcgccc taattatatg ttgaaaataa taccoatta tgatggaagc	2820
cctagaatat gtgagcttat aaatgcgaaa atcacagatg ttaccgtaca tgaagcttgg	2880
acaggaccaa ctcgactgca gttatttgat cacgctatgg cgccacttaa tgatttgcca	2940
gtaaaagaga ttgtttctag ctctcacatt cttgcagata taatattgcc tagagctgaa	3000

ES 2 639 224 T3

gttatatatg attatcttaa gtaatagaat tcaactggccg tcgtttttaca acgtcgtgac	3060
tgggaaaacc ctggcggttac ccaacttaat cgccttgacg cacatcccc tttcgccagc	3120
tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat	3180
ggcgaatggc gcctgatgag gtatttttctc cttacgcacg tgtgcggtat ttcacaccgc	3240
atatggtgca ctctcagtag aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac	3300
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgctctgc tcccggcagc cgcttacaga	3360
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcacgcgc atcacgaaa	3420
cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaaatgt catgataata	3480
atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt	3540
ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg	3600
cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttcggtgt cgcccttatt	3660
cccttttttg cggcattttg ccttctctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta	3720
aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc	3780
ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa	3840
gttctgctat gtggcgcggt attatcccggt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc	3900
cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt	3960
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact	4020
gcggccaact tacttctgac aacgatcggg ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac	4080
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggggaa cggagctgaa tgaagccata	4140
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaaacta	4200
ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg	4260
gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctgggt tattgtgat	4320
aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt	4380
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga	4440
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa	4500
gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttaatttaa aaggatctag	4560
gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac	4620
tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc	4680
gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat	4740
caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaa	4800
actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct	4860

ES 2 639 224 T3

acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt 4920
 cttacogggg tggactcaag acgatagtta coggataaag cgcagcggc gggctgaacg 4980
 ggggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta 5040
 cagcgtgagc tatgagaaaag cggccagcctt cccgaaggga gaaaggcggga caggtatccg 5100
 gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg 5160
 tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 5220
 tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg 5280
 gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatccctga tttctgtgat 5340
 aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc 5400
 agcaggtcag tgagcgagga agcggagag cggccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg 5460
 cgttgccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt 5520
 gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg caccocaggc tttacacttt 5580
 atgcttccgg ctctgtatgt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac 5640
 agctatgacc atgattacgc caagcttttg ctaacacaca cgccattcca accaatagtt 5700
 ttctcggcat aaagccatgc totgacgctt aaatgcacta atgccttaa aaaacattaa 5760
 agtctaacac actagactta tttacttcgt aattaagtgc ttaaaccgtg tgctctacga 5820
 ccaaaagtat aaaacottta agaactttct tttttcttgt aaaaaagaa actagataaa 5880
 tctctcatat cttttattca ataatcgcat cagattgcag tataaattta acgatcactc 5940
 atcatgttca tatttatcag agctcgtgct ataattatac taattttata aggaggaaaa 6000
 aataaagagg gttataatga acgagaaaaa tataaaacac agtcaaaact ttattacttc 6060
 aaaacataat atagataaaa taatgacaaa tataagatta aatgaacatg ataatatctt 6120
 tgaaatcggc tcaggaaaag ggcattttac ccttgaatta gtacagaggt gtaatttcgt 6180
 aactgccatt gaaatagacc ataaattatg caaaactaca gaaaataaac ttgttgatca 6240
 cgataatttc caagtittta acaaggatat attgcagttt aaatttccta aaaaccaatc 6300
 ctataaaata tttggttaata taccttataa cataagtagc gatataatac gcaaaattgt 6360
 ttttgatagt atagctgatg agatttattt aatcgtggaa tacgggtttg ctaaaagatt 6420
 attaaataga aaacgctcat tggcattatt tttaatggca gaagttgata tttctatatt 6480
 aagtatggtt ccaagagaat attttcatcc taaacctaaa gtgaatagct cacttatcag 6540
 attaaataga aaaaaatcaa gaatatcaca caaagataaa cagaagtata attatttcgt 6600
 tatgaaatgg gttacaaaag aatacaagaa aatatttaca aaaaatcaat ttaacaattc 6660
 cttaaaacat gcaggaattg acgattttaa caatattagc tttgaacaat tcttatctct 6720
 tttcaatagc tataaattat ttaataagta agttaaggga tgcataaact gcacccctta 6780

ES 2 639 224 T3

acttgTTTT cgtgtaccta ttttttgtga atcgattatg ttttttgcgc attcacttct	6840
tttctatata aatatgagcg aagcgaataa gcgtcggaaa agcagcaaaa agtttccttt	6900
ttgctgttg agcatggggg ttcagggggt gcagtatctg acgtcaatgc cgagcgaaag	6960
cgagccgaag ggtagcattt acgttagata accccctgat atgctccgac gctttatata	7020
gaaaagaaga ttcaactagg taaaatctta atatagggtg agatgataag gtttataagg	7080
aatttgtttg ttctaatttt tcaactcattt tgttctaatt ttttttaaca aatgttcttt	7140
tttttttaga acagttatga tatagttaga atagtttaaa ataaggagtg agaaaaagat	7200
gaaagaaaga tatggaacag tctataaagg ctctcagagg ctcatagacg aagaaagtgg	7260
agaagtcata gaggtagaca agttataccg taaacaaacg tctggtaact tcgtaaaggc	7320
atatatagtg caattaataa gtatgttaga tatgattggc ggaaaaaac ttaaatcgt	7380
taactatatc ctagataatg tccacttaag taacaataca atgatagcta caacaagaga	7440
aatagcaaaa gctacaggaa caagtctaca aacagtaata acaacactta aaatcttaga	7500
agaaggaaat attataaaaa gaaaaactgg agtattaatg ttaaaccctg aactactaat	7560
gagaggcgac gacccaaaac aaaaatacct cttactcgaa tttgggaact ttgagcaaga	7620
ggcaaatgaa atagattgac ctccaataa caccacgtag ttattgggag gtcaatctat	7680
gaaaatgcga tta	7693

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la producción de acetona, que comprende los pasos de procedimiento:

- 5 A) puesta en contacto de una célula acetógena, que es capaz de formar acetona, con un medio nutriente que contiene al menos una fuente de carbono seleccionada a partir del grupo que comprende dióxido de carbono y monóxido de carbono;
- B) cultivo de la célula bajo condiciones que posibiliten formar acetona a la célula;
- C) en caso dado aislamiento de la acetona formada,

caracterizado por que la célula presenta una actividad acrecentada en comparación con su tipo salvaje de al menos uno de los siguientes enzimas mediante sobreexpresión:

- 10 de un enzima E₁, que cataliza la reacción de acetil-coenzima A para dar acetoacetil-coenzima A;

de un enzima E₂, que cataliza la reacción de acetoacetil-coenzima A para dar acetoacetato;

de un enzima E₃, que cataliza la reacción de acetoacetato para dar acetona,

y por que la célula procedente de al menos una fuente de carbono seleccionada a partir del grupo que contiene dióxido de carbono y monóxido de carbono es capaz de formar acetona.

- 15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que

en el caso del enzima E₁ se trata de una acetil-CoA-C-acetiltransferasa (EC 2.3.1.9);

en el caso del enzima E₂ se trata de butirato-acetoacetato-CoA-transferasa (EC 2.8.3.9) o de una acil-CoA-hidrolasa (EC 3.1.2.20);

en el caso del enzima E₃ se trata de acetoacetato-decarboxilasa (EC 4.1.1.4).

- 20 3.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la célula es un microorganismo seleccionado a partir del grupo que comprende *Thermoanaerobacter kivui*, *Acetobacterium woodii*, *Acetoanaerobium notera*, *Clostridium aceticum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Moorella thermoacetica*, *Eubacterium limosum*, *Peptostreptococcus productus*, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium carboxidivorans*.

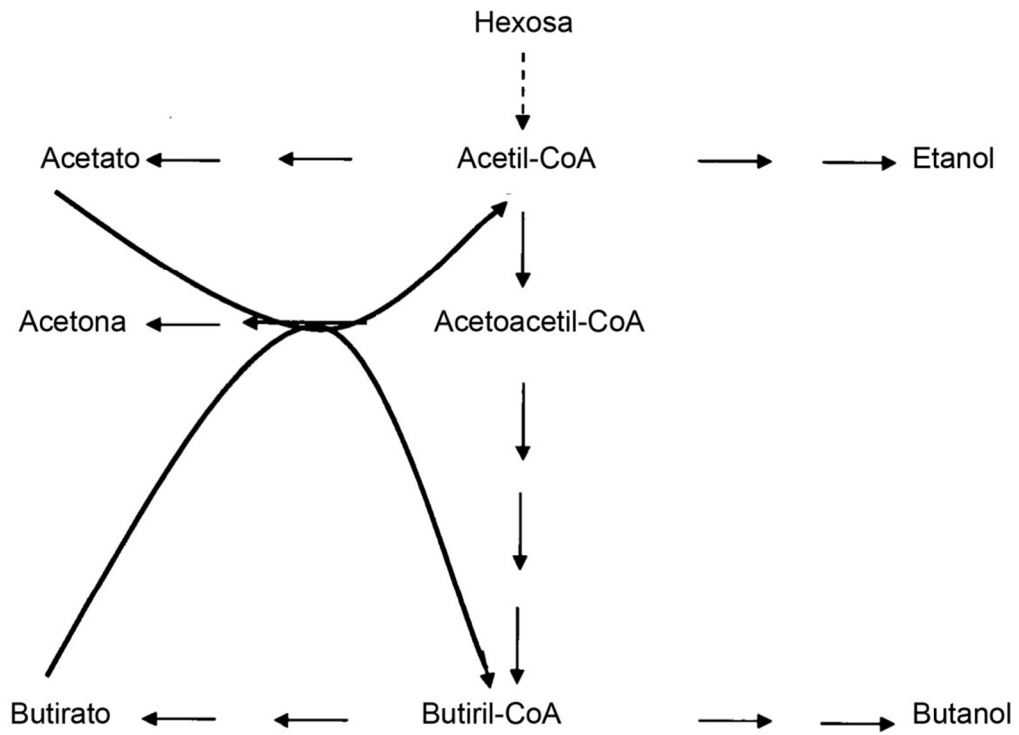


Figura 1

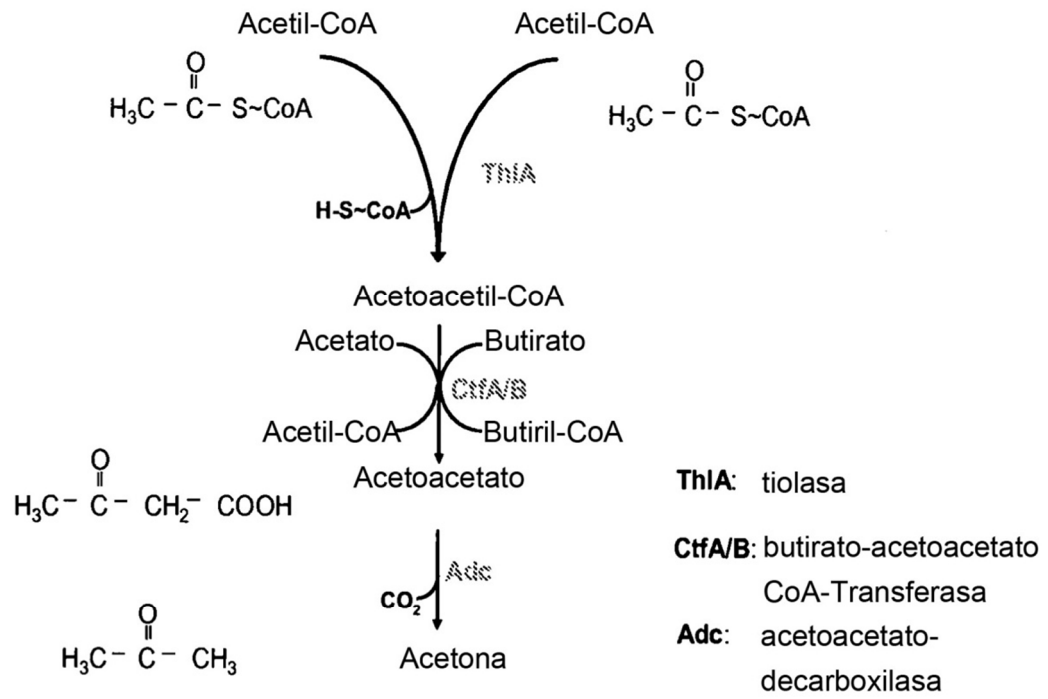


Figura 2

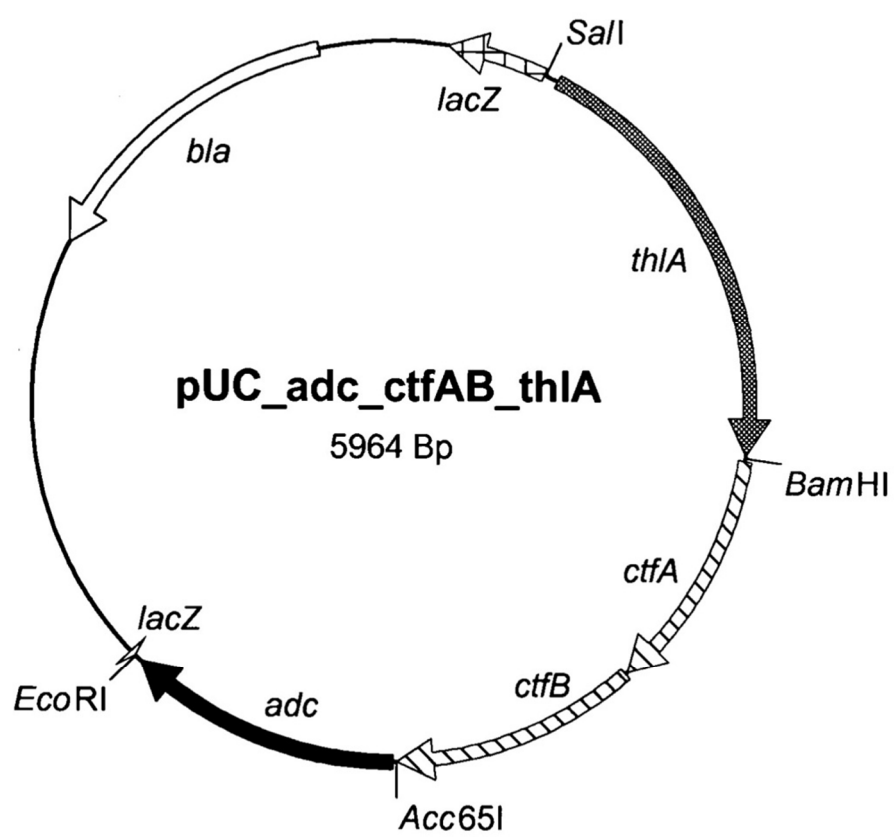


Figura 3

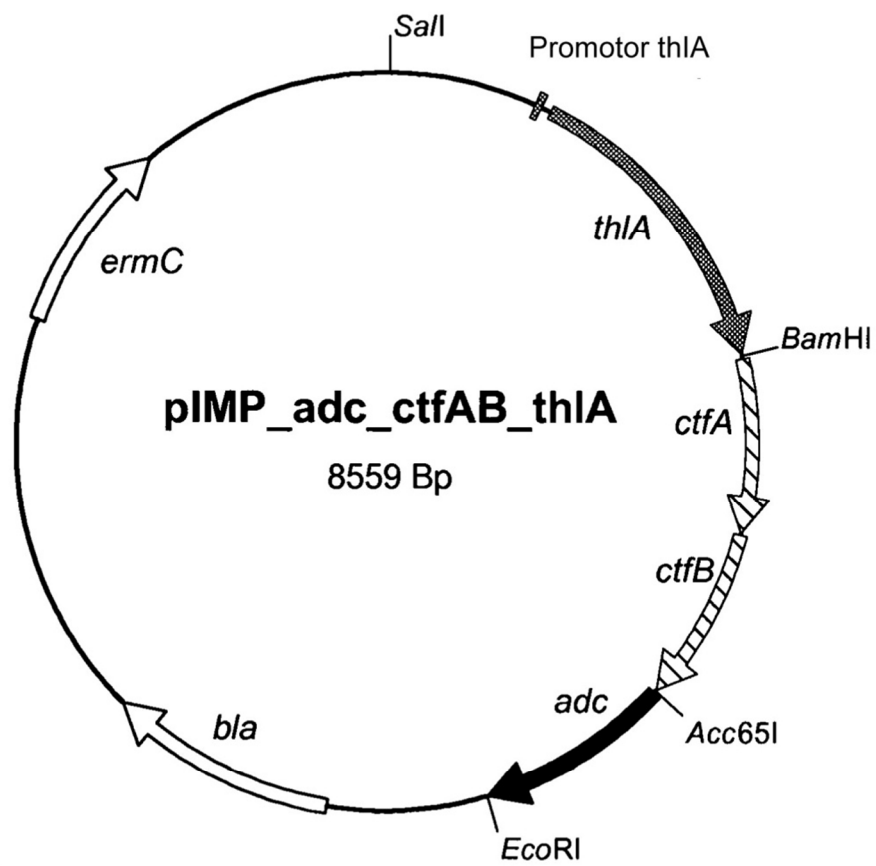


Figura 4