

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 618**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/28** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2008 E 08843755 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2181195**

54 Título: **Obtención de acetona por fermentación a partir de materias primas renovables mediante una nueva ruta metabólica**

30 Prioridad:

**02.11.2007 DE 102007052463**

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

**24.06.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VERSECK, STEFAN;  
SCHAFFER, STEFFEN;  
FREITAG, WERNER;  
SCHMIDT, FRIEDRICH GEORG;  
ORSCHER, MATTHIAS;  
GRUND, GERDA;  
SCHMIDT, WILFRIED;  
BAHL, HUBERT JOHANNES;  
FISCHER, RALF-JÖRG;  
MAY, ANTJE;  
DÜRRE, PETER y  
LEDERLE, SIMONE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 470 618 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

Obtención de acetona por fermentación a partir de materias primas renovables mediante una nueva ruta metabólica

5 Sector del invento

Son objeto del invento una nueva ruta de biosíntesis enzimática para la producción de acetona, la cual, al contrario que los procedimientos de fermentación habituales, está desacoplada de la formación de etanol y butanol, así como las enzimas y los ácidos nucleicos que se utilizan en estos casos.

10 Estado de la técnica*Proceso ABE en Clostridium*

15 El clásico proceso de fermentación ABE, es decir, la producción microbiana de acetona, butanol y etanol, fue el segundo proceso biotecnológico más grande a escala mundial durante un prolongado período de tiempo, directamente después de la fermentación de etanol con levaduras. La fermentación ABE comercial se inició en 1916 en Inglaterra, en donde, entre otros, Chaim Weizmann descubrió la capacidad de *Clostridium acetobutylicum* para la formación de los disolventes acetona, butanol y etanol. El proceso fue utilizado hasta finales de los años 50 en el mundo occidental, y en Suráfrica incluso todavía hasta 1981.

20 Dos motivos principales son responsables de que este proceso fuese desechado: por una parte, la síntesis química de acetona y butanol se hizo cada vez más barata, y, por otra parte, el precio de los substratos de la fermentación aumentó grandemente. Especialmente el precio de las melazas aumentó grandemente debido a su utilización como aditivo para piensos de animales bovinos.

25 Los costes crecientes de los productos precursores petroquímicos, así como también las nuevas posibilidades tecnológicas dentro del sector de la ingeniería de la ruta metabólica (en inglés "pathway engineering") de los microorganismos han abierto por fin nuevas opciones para el desarrollo de cepas de alto rendimiento y de procesos comerciales de fermentación para la producción de disolventes tales como la acetona.

30 La clásica fermentación ABE se basa en los organismos *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*. Ambos son gram positivos y se reproducen en condiciones estrictamente anaerobias. Estos organismos pueden convertir químicamente a mono-, di- y polisacáridos, siendo las melazas y los almidones los substratos utilizados predominantemente en la fermentación.

35 El proceso de fermentación con *C. acetobutylicum* se subdivide en dos fases. En la primera fase, la formación de biomasa va acompañada por la formación de acetato, butirato y de trazas de etanol ("fase acidogénica"). En la segunda fase, la denominada "fase solventogénica", los ácidos son aprovechados entonces para formar los productos de fermentación acetona, butanol y etanol (ABE). Los productos acetona, butanol y etanol se forman en el *C. acetobutylicum* del tipo silvestre en la relación de aproximadamente 3 : 6 : 1. Esta relación de productos puede  
40 variar en gran manera según sean las condiciones de cultivo escogidas (p.ej. el pH o la aportación de sustancias nutrientes) o los substratos empleados.

Las enzimas de la biosíntesis de los disolventes acetona, butanol y etanol están ampliamente purificadas y caracterizadas bioquímicamente (compárese la Figura 1; Duerre, P., y Bahl, H. 1996. Microbial production of acetone/butanol/isopropanol (Producción microbiana de acetona/butanol/isopropanol). En: Biotechnology, tomo 6, 2ª edición M. Roehr (compilador de edición), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Alemania. p. 229-268. Duerre, P. 1998. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation (Nuevos conocimientos y recientes desarrollos en la fermentación clostridiana de acetona/butanol/isopropanol). Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 639-648.). También se encuentra presente la secuencia genómica de *C. acetobutylicum* (Noelling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V. y otros 16 autores (2001). Genome sequence and comparative analysis of the solvent producing bacterium *Clostridium acetobutylicum* (Secuencia genómica y análisis comparativo de la bacteria productora de disolventes *Clostridium acetobutylicum*. J Bacteriol 183, 4823-4838.).

55 En los últimos años se desarrolló una serie de herramientas genéticas, que hacen posible un deliberado tratamiento ingenieril de la ruta metabólica. Hasta ahora, están a disposición tres replicones diferentes, que se conservan de una manera estable (pIM13, pCBU2 y pAMß1; Lee y colaboradores (1992). Vector construction, transformation, and gene amplification in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Construcción de vectores, transformación y amplificación génica en *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824). Ann. N. Y. Acad. Sci. 665: 39-51; Minton y colaboradores 1993). Clostridial cloning vectors (Vectores de clonación clostridiana). En: The clostridia and biotechnology (Las clostridias y su biotecnología) (D. R. Woods; compilador de edición). Butterworth-Heinemann. Stoneham, EE.UU. P. 119-150) y dos marcadores de resistencia a antibióticos frente a eritromicina y tiamfenicol (Green y Bennett (1998). Genetic manipulation of acid and solvent formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. (Manipulación genética de la formación de ácidos y disolventes en *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824). Biotechnol. Bioeng. 58: 215-21.).

65 Por el contrario, ciertos métodos tales como la desactivación por inserción o las supresiones (deleciones) de genes todavía no son realizables de una manera rutinaria, y también la inhibición de la expresión génica basada en una

orientación antisentido varía en cuanto a la efectividad en este conjunto de organismos y nunca es completa (Desai y Papoutsakis (1999). Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* (Estrategias con ARN antisentido para la ingeniería metabólica de *Clostridium acetobutylicum*). Appl. Environ. Microbiol. 65:936-45; Tummala y colaboradores (2003). Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcohologenic *Clostridium acetobutylicum* fermentations (Una regulación en sentido descendente con un ARN antisentido de la coenzima A transferasa, combinada con una sobreexpresión de la alcohol-aldehído deshidrogenasa, conduce a unas fermentaciones predominantemente alcohologénicas de *Clostridium acetobutylicum*). J. Bacteriol. 185:3644-53). Una serie de publicaciones describe la ingeniería de la ruta metabólica de biosíntesis tanto "solventogénica" como también "acidogénica". La desactivación de los genes *buk* (de la butirato cinasa) o *pta* (de la fosfotransacetilasa) condujo a unas disminuciones drásticas de las concentraciones de butirato o respectivamente de acetato (Green y colaboradores (1996); Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Manipulación genética de la rutas metabólicas de formación de ácidos mediante desactivación de genes en *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824). Microbiology. 142:2079-86; Harris y colaboradores (2000). Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? (Caracterización de cepas recombinantes del mutante con desactivación de la butirato cinasa de *Clostridium acetobutylicum*: ¿Existe una necesidad de nuevos modelos fenomenológicos para la solventogénesis y la inhibición de butanol Biotechnol. Bioeng. 67:1-11). A pesar de ello, por estos mutantes se formaban butirato y acetato, puesto que las enzimas acetato cinasa y fosfotransbutirilasa sustituían a las enzimas desactivadas butirato cinasa y fosfotransacetilasa. Ambas cepas formaban altas concentraciones de ácido láctico, el cual no se enriquece por el *C. acetobutylicum* del tipo silvestre, posiblemente como una reacción al enriquecimiento del piruvato. La desactivación de la aldehído/alcohol-deshidrogenasa *adhE/aad* conducía a un drástico hundimiento de la formación de butanol y a un simultáneo aumento de las concentraciones de butirato. Sin embargo, las concentraciones de butirato y butanol que son usuales en el tipo silvestre se ajustan de nuevo cuando el gen *adhE/aad* es expresado sobre un plásmido en este mutante. De modo interesante, ni en el mutante de *AdhE/aad* ni en la cepa con la complementación con *adhE/aad* se pudo detectar una formación de acetona. Este fenómeno se basa en unos efectos polares, que repercuten sobre dos genes localizados corriente abajo ("downstream") del *adhE/aad*. Estos dos genes codifican las dos subunidades de la coenzima A transferasa, que es esencial para la biosíntesis de acetona (Green, E.M, y Bennett, G.N. 1996. Inactivation of an aldehyde/ alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Desactivación de un gen de la aldehído/ alcohol deshidrogenasa de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824). Appl. Biochem. Biotechnol. 57/58: 213-221). Éste es el primer ejemplo descrito de que mediante un tratamiento ingenieril de una ruta metabólica en *C. acetobutylicum* se pueden desacoplar una de otra las formaciones de acetona y butirato.

En otras publicaciones se confirmó esta observación. En estos estudios se investigaron unas cepas microbianas, que han perdido la capacidad de formar acetona y butanol, puesto que a ellas les falta el megaplásmido de 192 kb pSOL1. En este plásmido están localizados la mayoría de los genes para la formación de acetona y butanol, y también algunos genes para la síntesis de etanol (Cornillot, E., Nair, R., Papoutsakis, E.T., y Soucaille, P. 1997. The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain (Los genes para la formación de butanol y acetona en *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 residen en un gran plásmido, cuya pérdida da lugar a la degeneración de la cepa). J.Bacteriol. 179: 5442-5447). Estas cepas degeneradas forman sólo la mitad de la cantidad de etanol que forman las cepas de tipo silvestre en comparación. Estas cepas, partiendo de *C. acetobutylicum* ATCC 824, fueron designadas como M5 (resultante mediante una mutagénesis química) y DG1 (obtenida mediante una cultivación múltiple del tipo silvestre). Éstas servían como receptoras de plásmidos, que llevaban las secuencias codificadoras de proteínas de las subunidades A y B de la coenzima A transferasa (*ctfA* y *ctfB*), así como el gen de la acetoacetato descarboxilasa (*adc*), o de la butiraldehído/butanol deshidrogenasa (*adhE/aad*). Las cepas resultantes producían o bien sólo acetona o sólo butanol (Mermelstein y colaboradores (1993). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic operon (Ingeniería metabólica de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 para conseguir una producción aumentada de disolventes mediante un aumento de las actividades enzimáticas para la formación de acetona utilizando un operón sintético). Biotech. Bioeng. 42:1053-1060.; Nair, R.V., y Papoutsakis, E. T. 1994. Expression of plasmid-encoded *aad* in *Clostridium acetobutylicum* M5 restores vigorous butanol production (La expresión del *aad* codificado en un plásmido en *Clostridium acetobutylicum* M5 regenera la producción vigorosa de butanol J. Bacteriol. 176: 5843-5846; Cornillot, E., Nair, R., Papoutsakis, E.T., y Soucaille, P. 1997. The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain (Los genes para la formación de butanol y acetona en *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 residen en un plásmido grande, cuya pérdida da lugar a la degeneración de la cepa). J. Bacteriol. 179: 5442-5447). Los títulos medidos para el respectivo disolvente estaban situados fundamentalmente por debajo de las concentraciones de acetona y butanol en el tipo silvestre, pudiéndose acumular acetato y butirato hasta llegar a una concentración total de 240 mM. La formación de etanol se podía restablecer de nuevo hasta el nivel del tipo silvestre con unos plásmidos, que llevaban el gen *adhE/aad*.

En la Figura 2 se representa la ruta metabólica clásica, caracterizada en *Clostridium* para la síntesis de acetona. Esta ruta metabólica parte de la acetil-CoA, que es un metabolito central primordial, que se forma en todos los

microorganismos, independientemente de cual sea la fuente de C que sea metabolizada o de cuales sean las rutas metabólicas que se hayan establecido. Las enzimas, que se requieren son: la  $\beta$ -cetotiolasa, las dos subunidades de la acetil-CoA/butiril-CoA transferasa, y la acetoacetato descarboxilasa.

5 Se pudo mostrar que la expresión heteróloga de estas enzimas de *C. acetobutylicum* en *Escherichia coli*, que catalizan la formación de acetona partiendo de la acetil-CoA (con la acetoacetato descarboxilasa, la acetil-CoA/butiril-CoA transferasa y la tiolasa) conduce en este organismo a una formación de acetona de aproximadamente 150 mM, pero resultaron también de una manera desventajosa altas cantidades de acetato (50 mM) (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 (Expresión de genes de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 en *Escherichia coli* para la producción de acetona y la desintoxicación con respecto del acetato). Appl. Env. Microbiol. 64:1079-1085). Otra ventaja consiste, en este caso, en que la acetona era producida solamente en condiciones aerobias, puesto que los equivalentes de redox, que resultan durante la metabolización de glucosa para dar acetil-CoA, no pueden ser reoxidados por *E. coli* en condiciones anaerobias. En este procedimiento, por medio de la enzima que cataliza la reacción, la CoA separada del acetoacetilo era transferida de nuevo a una molécula aceptora.

Enzimas que disocian acil-CoA

20 Unas enzimas, que pueden hidrolizar a la acil-CoA, pueden ser p.ej. acil-CoA tioesterasas o acil-CoA tiocinasa. La diferencia principal entre la hidrólisis de acil-CoA por una acil-CoA tioesterasa o una acil-CoA sintetasa / acil-CoA tiocinasa es la formación de ATP o respectivamente de GTP en el caso de las cinasas, puesto que la hidrólisis de la acetoacetil-CoA posee un más alto valor de  $\Delta G_0'$  de -44kJ en comparación con el de la hidrólisis del ATP (-31,8 kJ).

Acetoacetil-Co hidrolasa (EC 3.1.2.11)

25 Esta enzima cataliza la hidrólisis de acetoacetil-CoA para dar acetoacetato y la coenzima A, sin que en este caso la molécula CoA sea transferida simultáneamente a una molécula aceptora tal como p.ej. un ácido carboxílico.

Acil-CoA tioesterasas (EC 3.1.2.18)

30 La proteína YbgC de *Haemophilus influenzae* es una acil-CoA tioesterasa (EC 3.1.2.18) específica para moléculas de cadena corta, que acepta a butiril-CoA y  $\beta$ -hidroxibutirato-CoA como sustratos. Los valores de Km son de 24 mM o respectivamente 20 mM para estos sustratos (Zhuang y colaboradores, (2002). The YbgC protein encoded by the ybgC gene of the tol-pal gene cluster of *Haemophilus influenzae* catalyzes acyl-coenzyme A thioester hydrolysis (La proteína YbgC codificada por el gen ybgC del racimo de genes tol-pal de *Haemophilus influenzae* cataliza la hidrólisis del tioéster de la acil-coenzima A) . FEBS Lett. 516:161-3.).

35 También en *Bacillus subtilis* se ha descrito una tioesterasa II (TEII<sub>sr</sub>) con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1 y una correspondiente secuencia de ADNc SEQ ID No. 2, que se presenta asociada con las péptido sintetisas no ribosomales para la formación del antibiótico peptídico surfactina (Schwarzer D., H. D. Mootz, U. Linne, M. A. Marahiel. 2002. Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases (Regeneración de péptido sintetisas no ribosomales mal cebadas por tioesterasas del tipo II. PNAS 99:14083-14088).

Acil-CoA sintetisas / acil-CoA tiocinasa (mediando formación de AMP; EC 6.2.1.2, y mediando formación de GDP; EC 6.2.1.10))

45 La función fisiológica de estas dos enzimas mencionadas reside en la síntesis de acil-CoA, pero también se conocen unos ejemplos, en los que estas enzimas catalizan la reacción hidrolítica inversa mediando formación de ATP, tal como p.ej. la succinil-CoA tiocinasa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Hasta ahora, para las clases de enzimas más arriba mencionadas no se detectó, ni *in vitro* ni *in vivo*, que ellas sean capaces de hidrolizar a la acetoacetil-CoA mediando formación de acetoacetato y la coenzima A libre.

50 La degradación de polihidroxicarbonos por una acil-CoA sintetasa mediando formación de AMP ha sido descrita para AcsA2 procedente de *Sinorhizobium meliloti* (Aneja y colaboradores (2002). Identification of an acetoacetyl coenzyme A synthetase-dependent pathway for utilization of L-(+)-3-hydroxybutyrate in *Sinorhizobium meliloti* (Identificación de una ruta metabólica dependiente de la acetoacetil coenzima A sintetasa para la utilización de L-(+)-3-hidroxibutirato en *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 184:1571-7.).

55 En el caso de otra enzima purificada procedente de *Pseudomonas aeruginosa* se podía detectar una acil-CoA sintetasa / acil-CoA tiocinasa (mediando formación de AMP; EC. 6.2.1.2) específica para moléculas de cadena corta. Esta enzima acepta tanto a la butiril-CoA y a la  $\beta$ -hidroxibutiril-CoA así como también al 2-cetobutirato como sustrato, con unos muy bajos valores de Km de en cada caso 10, 25 y 25  $\mu$ M (Shimizu y colaboradores (1981). Butyryl-CoA synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*-purification and characterization (Purificación y caracterización de la butiril-CoA sintetasa de *Pseudomonas aeruginosa*). Biochem. Biophys. Res. Commun. 103:1231-7.).

65 Una misión del presente invento fue, por lo tanto, poner a disposición una nueva ruta metabólica simplificada para la síntesis de acetona partiendo de acetil-CoA.

Descripción del invento

El invento aquí descrito trata de la producción mejorada de acetona con ayuda de unas técnicas enzimáticas recombinantes: Partiendo de acetil-CoA, y pasando por acetoacetil-CoA, se genera acetoacetato, el cual es transformado a continuación en acetona y CO<sub>2</sub>.

5 Por lo tanto son objeto del presente invento un procedimiento para la producción de acetona tal como se describe en la reivindicación 1, así como unas secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 13.

10 El procedimiento conforme al invento tiene la ventaja de que la butirato-acetoacetato-CoA transferasa, que en los sistemas habituales transforma a la acetoacetil-CoA en acetoacetato, y que se compone de dos subunidades, es reemplazada por una enzima, que puede ejercer su actividad en forma de un monómero.

15 De esta manera, el procedimiento conforme al invento tiene la ventaja adicional de que los rendimientos de acetona en un sistema establecido son más altos que con la conocida butirato-acetoacetato-CoA transferasa. Otra ventaja consiste en que la relación del acetato a la acetona durante el proceso de producción es desplazada en favor de la acetona.

20 Todavía otra ventaja del procedimiento conforme al invento consiste en el hecho de que la síntesis de acetona está desacoplada de la de butanol y etanol, y por consiguiente, en el caso de la utilización de unos organismos productores microbianos, éstos no se intoxican por los productos secundarios alcohólicos resultantes. Esto da lugar a unas concentraciones más altas del producto en el medio y por consiguiente a unos mejorados rendimientos de espacio-tiempo.

25 Otra ventaja de la producción de acetona desacoplada de la de butanol y etanol consiste en un protocolo simplificado de fermentación, así como en un aislamiento y un tratamiento más sencillos del producto, puesto que éste ya no tiene que ser separado de los productos secundarios alcohólicos. Esto conduce también a un consumo de energía más pequeño, comparado con el de la separación del producto en el caso de la fermentación ABE clásica. Por lo demás, en el procedimiento conforme al invento es ventajoso el hecho de que él se puede llevar a cabo en diferentes microorganismos, que han sido especialmente bien caracterizados, que se pueden cultivar de manera sobresaliente de una manera tanto aerobia como también anaerobia, y para los que se conocen las más  
30 diversas posibilidades de manipulación genética y por consiguiente otras posibilidades de mejoramiento. En resumidas cuentas, la producción efectiva de acetona por fermentación a partir de unas materias primas renovables constituye una contribución adicional a una producción, respetuosa para el medio ambiente y protectora de los recursos, de un producto químico industrial.

35 El procedimiento conforme al invento para la producción de acetona y la utilización de unos polipéptidos así como de unos ácidos nucleicos indicados para la realización del procedimiento conforme al invento se describen a continuación a modo de ejemplo, sin que el invento deba de estar restringido a esta forma ejemplificativa de realización. Por el concepto de "polipéptidos" se entienden los que tienen una longitud de cadena arbitraria. Por consiguiente, por este concepto se entienden también proteínas y enzimas de cualquier tipo y en particular unas  
40 acetoacetato-CoA hidrolasas, acil-CoA tioesterasas, acil-CoA sintetasas o acil-CoA tiocinasas. Por el concepto de "una reacción que se efectúa espontáneamente" se ha de entender una reacción química exérgica.

45 Por el concepto de hibridar "en condiciones rigurosas" se han de entender unas condiciones de ensayo, como se emplean por ejemplo en la técnica de borrón de transferencia Northern, la utilización de una solución de lavado caliente a una temperatura de 50 - 70 °C, de manera preferida de 60 - 65 °C, por ejemplo un tampón 0,1x SSC con 0,1 % de SDS (20x SSC: NaCl 3 M, citrato de Na 0,3 M, pH 7,0) para la elución de unas sondas de ADNc o de unos oligonucleótidos hibridadas/os inespecíficamente. En este caso, permanecen fijados unos a otros solamente unos ácidos nucleicos, que son complementarios en alto grado. El ajuste de unas condiciones rigurosas es conocido por un experto en la especialidad y ha sido descrito en la cita de Ausubel y colaboradores, *Current Protocols in*  
50 *Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

El presente invento contiene un procedimiento para la producción de acetona partiendo de la acetil-coenzima A, que abarca las siguientes etapas: A. una reacción enzimática de acetil-CoA para dar acetoacetil-CoA, B. una reacción enzimática de acetoacetil-CoA para dar acetoacetato y CoA y C. una descarboxilación de acetoacetato para dar acetona y CO<sub>2</sub>, y que está caracterizado por que en la etapa B de procedimiento la coenzima A no es transferida a una molécula aceptora.

60 En el procedimiento conforme al invento, en la etapa A de procedimiento se emplea una β-cetotilasa para la reacción enzimática de acetil-CoA para dar acetoacetil-CoA. De manera preferida, se emplea una β-cetotilasa procedente de *Clostridium spec.*, por lo tanto, un microorganismo del género *Clostridium*, de manera especialmente preferida procedente de *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium beijerinckii*. De manera preferida, la reacción enzimática en la etapa de procedimiento A es catalizada por un polipéptido con una actividad de cetotilasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90% de manera preferida en por lo menos un 95%, y de manera más preferida en un 96, 97, 98, 99 o 100 % a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 16.

65

En el procedimiento conforme al invento, en la etapa C de procedimiento se emplea una acetoacetato descarboxilasa para la conversión química de acetoacetyl-CoA en acetona y CO<sub>2</sub>. De manera preferida, se emplea una acetoacetato descarboxilasa procedente de *Clostridium spec.*, por lo tanto un microorganismo del género *Clostridium*, de manera especialmente preferida procedente de *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium beijerinckii*.  
 5 De manera preferida, la reacción enzimática en la etapa C de procedimiento es catalizada por un polipéptido con una actividad de acetoacetato descarboxilasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 95 % y de manera más preferida en un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 18. Otra forma de realización del procedimiento conforme al invento está caracterizada por que la reacción en la etapa C de procedimiento se efectúa espontáneamente.

10 El procedimiento conforme al invento para la producción de acetona se distingue por el hecho de que en la etapa B de procedimiento, la coenzima A no es transferida a una molécula aceptora. Esto se consigue mediante el recurso de que se emplean unas enzimas con una actividad de acetoacetato-CoA hidrolasa, que tienen una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 % a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1, 3 o 5.  
 15 Sorprendentemente, unas enzimas, a las que no se había atribuido hasta ahora esta actividad, tales como p.ej. las escogidas entre el conjunto formado por las acil-CoA tioesterasas, unas acil-CoA sintetetasas o acil-CoA tiocinasas, pueden resolver asimismo el problema planteado por esta misión. Por lo tanto, en el procedimiento conforme al invento, la reacción enzimática en la etapa B de procedimiento es catalizada por una acetoacetato-CoA hidrolasa, una acil-CoA tioesterasa, una acil-CoA sintetasa o una acil-CoA tiocinasa.

20 En una forma preferida de realización del procedimiento conforme al invento, la reacción enzimática en la etapa B de procedimiento puede ser catalizada por un polipéptido con una actividad de acetoacetato-CoA hidrolasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 95 % y de manera más preferida en un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1.

25 En otra forma preferida de realización del procedimiento conforme al invento, la reacción enzimática en la etapa B de procedimiento puede ser catalizada por un polipéptido con una actividad de acetoacetato-CoA hidrolasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 95 % y de manera más preferida en un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 3.

30 En una forma especialmente preferida de realización del procedimiento conforme al invento, la reacción enzimática en la etapa B de procedimiento puede ser catalizada por un polipéptido con una actividad de acetoacetato-CoA hidrolasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 95 % y de manera más preferida en un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 5.

35 De manera preferida el procedimiento se lleva a cabo por medio de microorganismos. Los microorganismos utilizados para el procedimiento pueden poseer de por sí la capacidad de sintetizar acetona, o pueden ser capacitados para formar acetona tan sólo mediante la ingeniería genética de la ruta metabólica. Esto se puede conseguir mediante un aumento de la concentración celular o de la actividad de unas enzimas, que catalizan una síntesis de acetona independiente de la de acetato, partiendo de acetyl-CoA.

40 De manera preferida, el procedimiento conforme al invento se lleva a cabo en unos microorganismos modificados por tecnología genética. Tales microorganismos pueden proceder p.ej. de un género escogido entre el conjunto formado por *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*,  
 45 *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* y *Saccharomyces*. Unas especies de estos géneros, dadas a modo de ejemplo, son *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus macerans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas putida*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. En el procedimiento conforme al invento se prefiere un organismo, escogido entre el conjunto formado por *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Clostridium spec.*, *Clostridium acetum*,  
 50 *Acetobacterium woodii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces spec.*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, y se prefiere especialmente la cepa "E. coli pUC19ayt", compárense los Ejemplos 5 y 6.

55 Unos microorganismos recombinantes pueden ser producidos mediante los procedimientos recombinantes de tecnología genética, que son conocidos por un experto en la especialidad. Por lo general, los vectores que llevan los genes ajenos son introducidos en las células mediante unas técnicas convencionales de transformación o transfección. Unos métodos adecuados se pueden encontrar en la obra de Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación molecular: Un manual de laboratorio). 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989). En el caso de los microorganismos utilizados se puede tratar de unas cepas, que habían sido producidas mediante mutagénesis y selección, mediante unas técnicas de ADN recombinante o mediante una combinación de ambos métodos. Para la mutagénesis se pueden utilizar unos clásicos procedimientos de mutagénesis *in vivo* mediante utilización de unas sustancias mutágenas tales como, por ejemplo, la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina o luz ultravioleta. Además, para la mutagénesis se pueden utilizar unos métodos *in vitro* tales como, por ejemplo, un tratamiento con hidroxilamina (Miller; J. H.: A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria (Un breve curso de genética bacteriana. Un manual de laboratorio para *Escherichia coli* y bacterias relacionadas con ella), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold  
 65

Spring Harbor, 1992) o unos oligonucleótidos mutágenos (T. A. Brown: Gentechnologie für Einsteiger (Tecnología genética para principiantes), editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como se ha descrito en el manual de Newton y Graham (PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994).

Otras instrucciones para la producción de mutaciones se pueden deducir a partir del estado de la técnica y de unos conocidos manuales de genética y biología molecular tales como p.ej. el libro de texto de Knippers ("Molekulare Genetik" (Genética molecular), 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), el de Winnacker ("Gene und Klone" (Genes y clones), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990) o el de von Hagemann ("Allgemeine Genetik", (Genética general) Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

En el caso de la utilización de unos métodos *in vitro*, el gen descrito en el estado de la técnica, partiendo de un ADN total aislado de una cepa de tipo silvestre, se amplifica con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa, eventualmente se clona en unos vectores plasmídicos adecuados, y el ADN se somete a continuación a unos procedimientos de mutagénesis. Unas instrucciones para la amplificación de secuencias de ADN con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, acrónimo de "Polymerase Chain Reaction") las puede encontrar un experto en la especialidad, entre otros, en el manual de Gait: Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (Síntesis de oligonucleótidos: Una aproximación práctica) (IRL Press, Oxford, Reino Unido, 1984) y en la obra de Newton y Graham: PCR (editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994). De igual manera, se pueden utilizar también unos métodos de mutagénesis *in vitro* tal como se describen, por ejemplo, en el conocido manual de Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE.UU., 1989). Unos correspondientes métodos están disponibles comercialmente también en forma de unos denominados "estuches" tales como, por ejemplo, el "QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit" (estuche de mutagénesis dirigida a un sitio QuikChange) de la entidad Stratagene (La Jolla, EE.UU.) descrito por Papworth y colaboradores (Strategies 9(3), 3-4 (1996)).

Asimismo, son objeto del invento unos plásmidos, que contienen los polinucleótidos empleados conforme al invento y que se replican eventualmente en las bacterias. Asimismo se divulgan los microorganismos recombinantes, que habían sido transformados con los mencionados vectores. En este caso, los polinucleótidos pueden estar bajo el efecto de un único promotor o de varios promotores. El concepto de "refuerzo" describe en este contexto el aumento de la actividad intracelular o de la concentración de una o varias enzimas o proteínas en un microorganismo, que son codificadas por el correspondiente ADN, mediante el recurso de que, por ejemplo, se aumenta el número de copias del gen o respectivamente de los genes, del ORF o respectivamente de los ORF en por lo menos una (1) copia, un promotor fuerte está unido funcionalmente con el gen o se utiliza un gen o un alelo o un ORF, que codifica una correspondiente enzima o respectivamente proteína con una alta actividad, y eventualmente se combinan estas medidas. En *E. coli*, como promotores fuertes se mencionan ejemplificativamente *lac*, *tac* y *trp*. Por el concepto de "marco abierto de lectura" (ORF, acrónimo de "open reading frame") se designa a un segmento de una secuencia de nucleótidos, que codifica o puede codificar una proteína o respectivamente un polipéptido o un ácido ribonucleico, a la (al) que no se le puede asignar ninguna función de acuerdo con el estado de la técnica. Después de la asignación de una función al correspondiente segmento de la secuencia de nucleótidos, se habla por lo general de un gen. Por el concepto de "alelos" se entienden por lo general unas formas alternativas de un determinado gen. Las formas se distinguen por ciertas diferencias en la secuencia de nucleótidos.

Por el concepto de "producto génico" se designa, por lo general, a la proteína codificada por una secuencia de nucleótidos, es decir por un ORF, un gen o un alelo, o al ácido ribonucleico codificado. Mediante las medidas de refuerzo, en particular de sobreexpresión, se aumenta la actividad o la concentración de la correspondiente proteína por lo general en por lo menos un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, como máximo hasta un 1.000 % o 2.000 %, referido a la proteína de tipo silvestre o respectivamente a la actividad o a la concentración de la proteína en el microorganismo o en la cepa parental no recombinante para la correspondiente enzima o proteína. Por el concepto de un microorganismo o cepa parental (en inglés "parent strain") no recombinante se entiende un microorganismo, en el que se lleva a cabo el refuerzo o la sobreexpresión. Los genes o las construcciones artificiales de genes pueden presentarse o bien en unos plásmidos en diferentes números de copias o pueden ser integrados/as y amplificados/as. Alternativamente, se puede conseguir por lo demás una sobreexpresión de los correspondientes genes mediante una modificación de la composición de los medios y de la conducción del cultivo.

Es objeto del invento un procedimiento, en el que unos microorganismos modificados genéticamente expresan unos ácidos nucleicos, que codifican unas enzimas tales como las más arriba descritas, que pueden llevar a cabo las etapas A hasta C de procedimiento.

El procedimiento conforme al invento está caracterizado por que el microorganismo contiene por lo menos un ácido nucleico a, que codifica proteicamente por lo menos un polipéptido con una actividad de cetotilasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 95 % y de manera más preferida en un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 16, un ácido nucleico b, que codifica proteicamente por lo menos un polipéptido

que es una acetoacetato-CoA hidrolasa, una acil-CoA tioesterasa, una acil-CoA sintetasa o una acil-CoA tiocinasa,

o con una actividad de acetoacetato-CoA hidrolasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 95 %, de manera más preferida en un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1,

o con una actividad de acetoacetato-CoA hidrolasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 95 %, de manera más preferida en un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 3,

o con una actividad de acetoacetato-CoA hidrolasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 95 %, de manera más preferida en un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 5,

y un ácido nucleico c, que codifica proteicamente por lo menos un polipéptido

con una actividad de acetoacetato descarboxilasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 %, de manera preferida en por lo menos un 95 %, de manera más preferida en un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 18,

siendo utilizados los ácidos nucleicos a, b y c con la finalidad de asegurar la expresión del polipéptido en el microorganismo.

En este caso, se emplea de manera preferida un ácido nucleico, que se escoge entre:

aa una secuencia de ADN descrita por la secuencia 17 o por su cadena complementaria,

bb unas secuencias de ADN, que se hibridan en condiciones rigurosas para dar las secuencias de ADN descritas dentro de aa

cc unas secuencias de ADN, que sin la degeneración del código genético se hibridarían para dar las secuencias de ADN definidas en aa y bb.

Como un ácido nucleico c se emplea de manera preferida uno que se escoge entre

dd una secuencia de ADN descrita por la secuencia 19 o por su cadena complementaria,

ee unas secuencias de ADN, que se hibridan en condiciones rigurosas para dar las secuencias de ADN descritas dentro de dd,

ff unas secuencias de ADN, que sin la degeneración del código genético se hibridarían para dar las secuencias de ADN definidas en dd y ee.

Como un ácido nucleico b se emplea uno que se escoge entre:

gg una secuencia de ADN descrita por la secuencia 2 o por su cadena complementaria,

hh unas secuencias de ADN, que se hibridan en condiciones rigurosas para dar las secuencias de ADN descritas dentro de gg

ii unas secuencias de ADN, que sin la degeneración del código genético se hibridarían para dar las secuencias de ADN definidas en gg y hh.

o de manera preferida entre:

jj una secuencia de ADN descrita por la secuencia 4 o por su cadena complementaria,

kk unas secuencias de ADN, que se hibridan en condiciones rigurosas para dar las secuencias de ADN descritas dentro de jj

ll unas secuencias de ADN, que sin la degeneración del código genético se hibridarían para dar las secuencias de ADN definidas en jj y kk,

o de manera especialmente preferida entre:

mm una secuencia de ADN descrita por la secuencia 6 o por su cadena complementaria,

nn unas secuencias de ADN, que se hibridan en condiciones rigurosas para dar las secuencias de ADN descritas dentro de mm,

oo unas secuencias de ADN, que sin la degeneración del código genético se hibridarían para dar las secuencias de ADN definidas en mm y nn.

En unas formas preferidas de realización del procedimiento conforme al invento, los ácidos nucleicos a, b y c están situados en una cadena de nucleótidos, que hace posible una expresión de la totalidad de los tres productos génicos.

De manera especialmente preferida, los ácidos nucleicos a, b y c están situados en una cadena de nucleótidos y ésta se escoge entre el conjunto formado por:

el plásmido pSKatt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 7,

el plásmido pKSatt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 8,

el plásmido pUC19att, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 9,

el plásmido pUC18att, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 10,

y

el plásmido pUC19ayt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 11.



Por consiguiente, son objeto del invento también los ácidos nucleicos  
 el plásmido pSKatt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 7,  
 el plásmido pKSatt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 8,  
 el plásmido pUC19att, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 9,  
 el plásmido pUC18att, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 10,  
 y el plásmido pUC19ayt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 11.

En los Ejemplos expuestos en lo sucesivo se describe el presente invento ilustrativamente, sin que el invento, cuya  
 amplitud de uso se establece a partir de la descripción global y de las reivindicaciones, deba de ser restringido a las  
 formas de realización mencionadas en los Ejemplos.

Figura 1: Biosíntesis de acetona, butanol y etanol

Figura 2: Biosíntesis de acetona

Figura 3: Expresión de la TEIIsrf en *E. coli* M15

Figura 4: Purificación de la TEIIsrf a partir de *E. coli*

Figura 5: Diagramas de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de Km de TEIIsrf para los sustratos  
 acetil-CoA y acetoacetil-CoA

Figura 6: Expresión de AACS en *E. coli* BL21 (DE3)

Figura 7: Purificación de AACS a partir de *E. coli*

Figura 8: Expresión y purificación de YbgC

Figura 9: Representación esquemática de la clonación sucesiva de los genes *adc*, *tellrsrf* y *thIA* en el plásmido pSK.

Figura 10: Producción de las construcciones artificiales pUC19

Figura 11: Formación de acetona y acetato en cultivos de 5 ml de diferentes vectores de expresión en *E. coli* HB101

Figura 12: Formación de acetona y acetato en cultivos de 100 ml de *E. coli* HB101 con pUC19ayt (YbgC) y  
 pUC19act (testigo CtfA/B)

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Tioesterasa II (TEIIsrf) procedente de *Bacillus subtilis*

Esta enzima está asociada con las péptido sintetetas no ribosomales para la formación de surfactina (antibióticos  
 del tipo de péptidos) en *B. subtilis* ATCC 21332. Schwarzer y colaboradores pudieron clonar el correspondiente gen  
 (pTEIIsrf) en el plásmido pQE60, que proporciona la fusión de la proteína diana con una marca His situada junto al  
 extremo terminal de C, y purificar la proteína (de 28 kDa) (Schwarzer D., H. D. Mootz, U. Linne, M. A. Marahiel.  
 2002. Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases (Regeneración de  
 péptido sintetetas no ribosomales mal cebadas por tioesterasas del tipo II). PNAS 99:14083-14088). En unas  
 subsiguientes investigaciones se detectó para esta proteína una actividad hidrolítica con acetil-CoA y propionil-CoA  
 como sustratos.

El plásmido pTEIIsrf con la SEQ ID No. 13 fue producido tal como se ha descrito en la cita bibliográfica de Schwarzer  
 D, Mootz HD, Linne U, Marahiel MA. Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II  
 thioesterases. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 Oct 29; 99(22):14083-8.

La expresión de la proteína se efectuaba en *E. coli* M15 en un medio LB<sub>Amp</sub> a 30 °C y 150 rpm (revoluciones por  
 minuto), y era inducida en el caso de una densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>) de 0,6 - 0,8 con IPTG 1 mM. Después de otras  
 2 horas se cosechaba el cultivo. Unas muestras tomadas durante el crecimiento confirmaban la expresión exitosa de  
 la proteína. La Fig. 3 muestra un gel de SDS-poliacrilamida al 12 % después de una tinción según Coomassie, sobre  
 el que se habían aplicado 15 µl de extracto en bruto por cada banda; 1: antes de la inducción, 2: 1 h después de la  
 inducción, 3: 2 h después de la inducción.

La prevista medición de la actividad mediante un ensayo con DTNB [5,5'-ditiobis(ácido 2-nitro-benzoico)], con el que  
 se determinan los grupos SH libres, requería la purificación de la proteína. Esto se efectuaba de un modo apoyado  
 por una FPLC a través de la marca His fusionada de TEIIsrf mediante una cromatografía por afinidad con un quelato  
 de metal en Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa y unos gradientes crecientes de imidazol.

Para esto, primeramente las células se cosechaban (a 5.000 x g, 15 min, 4 °C), se suspendían en 3 ml/g de peso en  
 fresco de un tampón de disgregación celular (HEPES 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,8) y eventualmente se  
 almacenaban a -20 °C. Mediante un tratamiento con ultrasonidos (en un Sonicator Bandelin Sonopuls, de Bandelin  
 Berlin) se disgregaban las células y el extracto en bruto se obtenía mediante una centrifugación (a 30.000 x g, 30  
 min, 4 °C). La purificación se efectuaba en una instalación de FPLC (de Pharmacia Biotech GmbH). Sobre la  
 columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa (de Qiagen Superflow, volumen del lecho 5 ml) previamente preparada y equilibrada  
 de un modo correspondiente según los datos del fabricante (HEPES 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM, pH 7)  
 se aplicaron 3,5 ml del extracto en bruto. A continuación, la columna se lavaba con 50 ml de un tampón de  
 equilibración. La elución se efectuaba con un gradiente lineal de imidazol a lo largo de 50 ml (30 - 300 mM de  
 imidazol en HEPES 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7).

La Fig. 4 muestra en la zona superior el perfil de elución de la FPLC en presencia de Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa (de Qiagen  
 Superflow, volumen del lecho 5 ml) en el caso de un programa con: un lavado con 0-50 ml, una elución con  
 50-100 ml con imidazol 30-300 mM (gradiente lineal) y unos tamaños de las fracciones de en cada caso 1 ml; en la  
 zona inferior se representa un gel de SDS-PAGE al 12 % teñido según Coomassie, sobre el que se aplican las  
 fracciones de elución 23-31, en cada caso 1 µg de proteína/pista.

Las fracciones obtenidas se reunieron y emplearon para la determinación de la actividad. Como sustratos servían acetoacetil-CoA y como comparación acetil-CoA. En el ensayo con DTNB, el grupo sulfhidrilo situado en un extremo de la CoA, que se había puesto en libertad mediante la reacción enzimática para dar acetoacetato o respectivamente acetato, reacciona con DTNB para dar un producto coloreado, que puede ser determinado por medios fotométricos a 412 nm.

Se determinaron los siguientes valores de Km: Para la acetil-CoA éste fue de  $2 \cdot 10^{-4}$  moles  $\cdot$  l<sup>-1</sup> (0,2 mM) y para la acetoacetil-CoA éste fue de  $7,7 \cdot 10^{-4}$  moles  $\cdot$  l<sup>-1</sup> (0,77 mM). Por consiguiente, la TEI<sub>srif</sub> tiene una afinidad más alta para el sustrato acetil-CoA. La Fig. 5 muestra el diagrama de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de Km de TEI<sub>srif</sub> para los sustratos acetil-CoA y acetoacetil-CoA.

*Ejemplo 2: Acetoacetil-CoA sintetasa (AACS) procedente de Sinorhizobium meliloti*

La acetoacetil-CoA sintetasa (AACS) con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 3 y la correspondiente secuencia de ADNc SEQ ID No. 4 procedente de *S. meliloti* cataliza la reacción de acetoacetato con la coenzima A mediante consumo de ATP para dar acetoacetil-CoA y AMP. No obstante, dentro del marco del presente invento fue interesante la retroreacción.

El correspondiente gen *acsA2* fue clonado en el vector de expresión pET30 Xa/LIC tal como se ha divulgado en la cita de Aneja, P., R. Dziak, G.-Q. Cai, T. C. Charles. 2002. Identification of an Acetoacetyl Coenzyme A Synthetase-Dependent Pathway for Utilization of L-(+)-3-Hydroxybutyrate in *Sinorhizobium meliloti* (Identificación de una ruta metabólica dependiente de la acetoacetil-CoA sintetasa para la utilización de L-(+)-3-hidroxiacetato). *J. Bacteriol.* 184:1571-1577. El plásmido "pRD112" así obtenido proporciona la fusión junto al terminal de N de la proteína diana con una marcación His, que por su parte hace posible la purificación mediante cromatografía por afinidad en presencia de Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa.

La expresión de la proteína se efectuaba en células *E. coli* BL21 (DE3) a 37 °C y 180 rpm. Con una densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>) de 0,5-0,6 se inducía el cultivo con IPTG 1 mM y a continuación se incubaba durante otras 3 h. La expresión exitosa de la proteína (aproximadamente 72 kDa) la presentaron unas muestras, que se habían tomado durante el crecimiento.

La Fig. 6 muestra un gel de SDS-PAGE al 7,5 % después de una tinción según Coomassie; se aplicaron en cada caso 15 µl de un extracto en bruto/pista (disgregación celular rápida). 1: antes de la inducción, 2: 1 h después de la inducción, 3: 2 h después de la inducción

La purificación se efectuaba de una manera análoga a la de la TEI<sub>srif</sub> mediante una cromatografía por afinidad con un quelato de metal en presencia de Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa y de un gradiente de imidazol de 20-250 mM (Fig. 7A). En este caso aparecieron dos picos (1 y 2), cuyas fracciones se habían comprobado en cuanto a su contenido de proteínas. Un subsiguiente análisis en unos geles de SDS-PA al 7,5 % mostraba, en particular en el caso del primer pico, la aparición de una banda adicional a aproximadamente 55 kDa. Puesto que esta banda era manifiestamente más débil en el segundo pico o respectivamente no aparecía en absoluto, las correspondientes fracciones de este pico se reunían y empleaban para la determinación de la actividad. Como sustratos servían, de nuevo, la acetoacetil-CoA y como comparación la acetil-CoA en el ensayo de DTNB. La determinación de los valores de Km proporcionó para la acetil-CoA como sustrato un valor de  $7 \cdot 10^{-4}$  mol  $\cdot$  l<sup>-1</sup> (0,7 mM). Por el contrario, para la acetoacetil-CoA, los valores medidos no eran suficientes para la determinación de un valor de Km. Puesto que sin embargo, la actividad específica de la enzima con acetoacetil-CoA era solamente de  $0,0038 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , se prescindió de una utilización ulterior de la AACS procedente de *S. meliloti* y respectivamente de una clonación del correspondiente gen en combinación con los genes de clostridias.

La Fig. 7 muestra la purificación de AACS procedente de *E. coli*, en la zona superior se representa el perfil de elución FPLC en presencia de Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa (de Qiagen Superflow, volumen del lecho 5 ml) con el programa: lavado 0-100 ml, elución 100-150 ml con imidazol 20-250 mM (gradiente lineal) y un tamaño de las fracciones de en cada caso 1 ml; la zona inferior muestra un gel de SDS-PAGE al 7,5 % después de una tinción con plata, fracciones escogidas de elución de los picos 1 y 2, en cada caso 1 µg de proteína/banda. RE: extracto en bruto, DL: material que ha pasado.

*Ejemplo 3: Acil-CoA tioesterasa YbgC procedente de Haemophilus influenzae*

La proteína YbgC con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 5 y la correspondiente secuencia de ADNc SEQ ID No. 6 procedente de *H. influenzae* tiene algunas similitudes con una proteína correspondiente procedente de *E. coli*, en donde ésta, como una proteína citoplasmática, pertenece al denominado sistema Tol-Pal. Ésta está ampliamente propagada en bacterias gram negativas. Ella es importante para el mantenimiento de la integridad de las paredes celulares y posiblemente tiene una función en el caso del transporte de sustancias a través del periplasma. Por el contrario, la función de YbgC en *H. influenzae* y unas eventuales relaciones con unas funciones del sistema Tol-Pal no han sido publicadas hasta ahora. La publicación de Zhuang y colaboradores (2002) describe, sin embargo, unas investigaciones acerca de la función catalítica de esta proteína y el análisis de una actividad de tioesterasa. En este caso, se pudo mostrar la hidrólisis de ciertos ésteres de acil-CoA alifáticos de cadenas cortas, tales como p.ej. propionil-CoA y butiril-CoA (valores de Km 11-24 mM) mediante la YbgC (Zhuang Z., F. Song, B. M.

Martin, D. Dunaway-Mariano. 2002. The YbgC protein encoded by the ybgC gene of the tol-pal gene cluster of *Haemophilus influenzae* catalyzes acyl-coenzyme A thioester hydrolysis (La proteína YbgC, codificada por el gen ybgC del racimo de genes tol-pal de *Haemophilus influenzae* cataliza la hidrólisis de la función tioéster de la acil-coenzima A). FEBS Lett. 516:161-163). Una detección *in vitro* de una actividad con acetil-CoA y acetoacetil-CoA dentro del marco de este proyecto suponía de nuevo la purificación de la proteína. Partiendo del ADN genómico, el gen se incorporaba por clonación dentro de otro sistema de expresión, el IMPACT™ (sistema de purificación mediado por una inteína con una marcación de fijación por afinidad a quitina) (en inglés "Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding-Tag) de la entidad Firma NEB (Francfort a. M.). Su ventaja reside en que este método hace posible una sencilla purificación de una proteína recombinante en su forma natural, es decir sin ninguna marcación.

La clonación de ybgc en el vector pTYB1 (NEB Francfort a. M.) hacía posible la expresión y la subsiguiente purificación de la acil-CoA tioesterasa YbgC a partir de *E. coli*.

El gen ybgc se amplificó mediante una PCR de un ADN genómico con los cebadores ybgcTYB1Ndefw (ATA TAC ATA TGT TGG ATA ATG GCT TTT C) e ybgcTYB1Xhorev (TCC GAA CTC GAG TTT TAA GTG ATG). En este caso, los cebadores proporcionaban la incorporación de un sitio de corte con NdeI junto al extremo 5' o respectivamente de un sitio de corte con XhoI junto al extremo 3' del fragmento amplificado. Se empleó la Taq-Mastermix (de Qiagen, Hilden) según los datos del fabricante en las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	2 min	1
94 °C	30 s	30
55 °C	1 min	30
72 °C	1 min	30
72 °C	10 min	1

Se obtuvo un fragmento con el tamaño esperado de aproximadamente 430 pb (pares de bases). Éste fue subclonado primeramente en el vector pJET (de Fermentas, St. Leon-Rot) de acuerdo con los datos del fabricante (pJet\_ybgcTYB, 410 pb). A continuación, el fragmento de ybgc se recortó de nuevo desde este plásmido con las endonucleasas de restricción NdeI y XhoI y se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit, de peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, según los datos del fabricante). El vector pTYB1 (de 7.477 pb) se cortó asimismo con NdeI y XhoI (de 7.439 pb) y a continuación se ligó con el fragmento de ybgc cortado y eluido en un gel mediante utilización del Rapid Ligation Kit (estuche de ligación rápida) según los datos del fabricante (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). En cada caso 10 µl de la tanda de ligación se emplearon para la transformación de 100 µl de células *E. coli* XL1-B competentes en presencia de CaCl<sub>2</sub>. Los clones obtenidos se cultivaron a continuación en un medio líquido de LB-ampicilina y se aisló el ADN plasmídico. Los plásmidos aislados se comprobaron mediante un análisis por restricción (con NdeI/XhoI) y se secuenciaron (Agowa GmbH, Berlin). El plásmido resultante fue designado como pTYBybgc (SEQ ID No. 15) y se empleó para la transformación ulterior en el seno de *E. coli* BL21 DE3.

La expresión se efectuó en *E. coli* BL21 (DE3) en un medio LB<sub>Amp</sub> hasta la inducción en el caso de una DO<sub>600nm</sub> de ~ 0,5 con IPTG 0,5 mM a 37 °C, después de esto se continuó incubando el cultivo durante 6 h a 20 °C y 150 rpm. La proteína de fusión (de aproximadamente 70 kDa) expresada heterológicamente, se fija a la quitina. Mediante una adición de DTT se da lugar a una modificación de la conformación y se induce el recorte de la proteína diana (de aproximadamente 15 kDa), la cual puede ser eluida a continuación. La Figura 8 muestra unos geles de SDS-PAGE. En la zona superior se representa una SDS-PAGE para el análisis de la expresión de YbgC. Se trata de un gel de SDS-PA en un gradiente de 10-20 % después de una tinción según Coomassie. Se aplicaron en cada caso 15 µl de un extracto en bruto/pista (disgregación rápida de las células). 1: antes de la inducción, 2, 3: 6 h después de la inducción. En la parte inferior se representa la evolución de la purificación de YbgC en unas columnas con quitina en un gel de SDS-PA en un gradiente de 10-20 % después de una tinción con plata. Se aplicaron en cada caso 2 µg de proteína/pista; -RE: extracto en bruto, DL: material que ha pasado, W: fracciones de lavado, materiales eluidos: fracciones de elución, que contienen proteínas (tamaño de las fracciones: en cada caso 1 ml).

A pesar de que en las fracciones de elución, junto a la deseada proteína de 15 kDa, aparecieron todavía unas bandas de la proteína de fusión y del dominio de inteína separado, éstas se aprovecharon para la determinación de la actividad *in vitro* en el ensayo con DTNB. Las mediciones para la determinación del valor de Km oscilaban ciertamente (datos no mostrados), sin embargo, para la acetil-CoA se pudieron determinar un valor de Km de  $5,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (0,53 mM), o respectivamente, para la acetoacetil-CoA como sustrato, un valor de Km de  $1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (0,14 mM). De esta manera se pudo determinar en la comparación directa una afinidad incluso aumentada de la enzima para el sustrato en comparación con la acetoacetil-CoA. Estos resultados argumentaron en favor de incluir a la YbgC en los ensayos ulteriores para la clonación.

#### Ejemplo 4: Estrategia de clonación para la construcción de los vectores de expresión

Para la producción de acetona en *E. coli* se llevó a cabo la clonación de los genes de unas adecuadas acil-CoA tioesterasa o acil-CoA sintetasa / acil-CoA tiocinasa en común con los genes thIA (un producto génico con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 16 y con la correspondiente secuencia de ADNc SEQ ID No. 17, la tiolasa A) y adc (un producto génico con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 18 y la correspondiente secuencia de ADNc

SEQ ID No. 19, la acetoacetato descarboxilasa) procedente de *C. acetobutylicum*. Para esto, se escogieron primeramente los plásmidos pSK y pKS. Se trata de unos vectores de clonación, que se diferencian esencialmente en lo que respecta a la orientación del sitio de clonación múltiple (MCS, acrónimo del inglés "Multi Cloning Site"). El MCS está situado en cada caso dentro de una secuencia presente del gen *lacZ'*, que codifica el fragmento del extremo del terminal de N de la  $\beta$ -galactosidasa y permite un escrutinio en blanco y azul de los plásmidos recombinantes. Para los ensayos en el marco del proyecto, la expresión de los genes clonados estaba en predominancia bajo el control del promotor inducible de *lac*. Para esta finalidad estaba previsto el vector pSK. Por lo demás, se produjo una variante mediante la integración en el plásmido pKS, en cuyo caso los genes debían ser expresados bajo el control del promotor constitutivo de la tiolasa procedente de *C. acetobutylicum*.

La clonación de los respectivos genes en los vectores se efectuó secuencialmente. Para esto, se desarrollaron primeramente unos oligonucleótidos para la amplificación de los genes mediando introducción de unos correspondientes sitios de corte y se llevaron a cabo las reacciones en cadena de la polimerasa. Todos los fragmentos fueron amplificados y se clonaron en los vectores tal como se representa. El modo de proceder estratégico y los sitios de corte por restricción utilizados se han ilustrado esquemáticamente en el caso del pSK en la Figura 9. Se procedió de manera análoga con el plásmido pKS.

A continuación se divulgan en detalle las etapas de clonación:

Clonación de los genes *adc*, *tell*, *thIA* en el plásmido pKS:

El objetivo fue clonar los genes *adc* (de la acetoacetato descarboxilasa procedente de *Clostridium acetobutylicum*), *tell<sub>srf</sub>* (de la tioesterasa II procedente de *Bacillus subtilis*) y *thIA* (de la tiolasa procedente de *C. acetobutylicum*) en común en un vector y expresarlos a continuación en *E. coli*.

El gen de la acetoacetato descarboxilasa *adc* se amplificó mediante una PCR del plásmido pDrive\_ *adc* (SEQ ID No. 20) con los cebadores AdcXhofwneu (CAT GCT CGA GAC GCG TTA CGT ATC) y AdcAparevneu (GAT GGG GCC CTG AAT TCT ATT ACT TAA G). En este caso, los cebadores proporcionaron la introducción de un sitio de corte con *XhoI* junto al extremo 5' o respectivamente de un sitio de corte con *Apal* junto al extremo 3' del fragmento amplificado. Se empleó la polimerasa GoTaq (de Promega GmbH, Mannheim) según los datos del fabricante mediando adición de MgCl<sub>2</sub> 4 mM y en las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	2 min	1
95 °C	30 s	30
60 °C	30 s	30
72 °C	1 min	30
72 °C	5 min	1

Se obtuvo un fragmento con el tamaño esperado de aproximadamente 800 pb. Éste se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, según los datos del fabricante) y a continuación, se cortó al igual que el plásmido pKS, con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *Apal* (788 pb) y el vector se desfosforiló adicionalmente (con la Antarctic phosphatase (fosfatasa antártica), de New England Biolabs GmbH, Francfort a. M., según los datos del fabricante). A esto le siguió la ligación del vector tratado de esta manera y del fragmento con la ligasa de T4 (de New England Biolabs GmbH, Francfort a. M.) según los datos del fabricante. En cada caso 10  $\mu$ l de la tanda de ligación se emplearon para la transformación de 100  $\mu$ l de células *E. coli* XL1 B competentes en presencia de CaCl<sub>2</sub>. Para cada tanda se transfirieron 100  $\mu$ l de células *E. coli* XL1 B competentes en presencia de CaCl<sub>2</sub> a unos recipientes de reacción enfriados previamente, con una capacidad de 1,5 ml, y se añadieron en cada caso 10  $\mu$ l de la tanda de ligación, se mezcló con precaución y las tandas se incubaron sobre hielo durante 30 min. A continuación se efectuó un choque térmico durante 90 s a 42 °C y las células fueron colocadas después de esto nuevamente durante 2 min sobre hielo, se les añadieron en cada caso 0,5 ml de un medio LB calentado previamente y las tandas se incubaron durante 60 min a 37 °C mediando ligero sacudimiento. De cada tanda se sembraron en placas 100 - 300  $\mu$ l sobre un medio LB, que contenía ampicilina, y se incubaron durante una noche a 37 °C. Los clones obtenidos se cultivaron a continuación en un medio líquido LB, que contenía ampicilina, y se aisló el ADN plasmídico según el siguiente protocolo: para el aislamiento rápido del ADN plasmídico sirvió una modificación de las etapas del estuche 'Qiagen-Mini-Kit' sin ninguna purificación en la columna (de Qiagen, Hilden), según Birnboim y Doly (Birnboim, H. C., J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA (Un rápido procedimiento de extracción en condiciones alcalinas para el escrutinio de un ADN plasmídico recombinante). Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523). Los plásmidos aislados se comprobaron mediante un análisis por restricción (con *Apal/XhoI*) y a continuación se secuenciaron los clones positivos (Agowa GmbH, Berlin). Este plásmido fue designado como pKS<sub>adc</sub> y se empleó para las siguientes etapas de clonación.

El gen de la tioesterasa II *tell<sub>srf</sub>* se amplificó mediante una PCR del plásmido pTEllsrf con los cebadores TellSalfw (CAA TTG TCG ACG GAT AAC AAT TTC ACA CAG A) y TellXhorev (CTA TCA ACT CGA GTC CAA GCT CAG CTA ATT AA). En este caso, los cebadores proporcionaron la introducción de un sitio de corte con *SaI* junto al extremo 5' o respectivamente de un sitio de corte con *XhoI* junto al extremo 3' del fragmento amplificado. Se empleó la polimerasa Synergy (de GeneCraft GmbH, Lüdinghausen) según los datos del fabricante en las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	2 min	1
95 °C	30 s	30
60 °C	40 s	30
72 °C	1 min	30
72 °C	5 min	1

Se obtuvo un fragmento con el tamaño esperado de aproximadamente 850 pb. Éste se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, según los datos del fabricante) y a continuación, al igual que el plásmido pKSadc, se cortó con las endonucleasas de restricción *Sall* y *XhoI* (831 pb) y el vector se desfosforiló adicionalmente (con una Shrimp alkaline phosphatase SAP (fosfatasa alcalina de gamba), de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, según los datos del fabricante). A esto le siguió la ligación del vector y el fragmento tratado de esta manera mediando utilización del Rapid Ligation Kit según los datos del fabricante (de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). En cada caso 10 µl de la tanda de ligación se emplearon para la transformación de 100 µl de células *E. coli* XL1-B competentes en presencia de CaCl<sub>2</sub>. De cada tanda se sembraron en placas 100 - 300 µl sobre un medio LB, que contenía ampicilina, y se incubó durante una noche a 37 °C. Los clones obtenidos se cultivaron a continuación en un medio líquido LB, que contenía ampicilina, y se aisló el ADN plasmídico. Los plásmidos aislados se comprobaron mediante un análisis por restricción (con *XhoI/Sall*), y a continuación se secuenciaron los clones positivos (Agowa GmbH, Berlin). Este plásmido fue designado como pKSadcte y fue empleado para las siguientes etapas de clonación.

El gen de la tiolasa *thlA*, inclusive el promotor de la tiolasa, se amplificó mediante una PCR del ADN genómico procedente de *C. acetobutylicum*.

20 Aislamiento del ADN cromosómico procedente de *C. acetobutylicum*:

El aislamiento del ADN cromosómico procedente de *C. acetobutylicum* se efectuó principalmente de acuerdo con Bertram (Bertram, J. 1989. Entwicklung eines Systems zum DNA-Transfer und zur Transposon-Mutagenese für *Clostridium acetobutylicum* (Desarrollo de un sistema para la transferencia de ADN y para la mutagénesis con transposones para *Clostridium acetobutylicum*). Tesis doctoral, Universidad de Göttingen). Para esto, se cultivaron las células en condiciones anaerobias en un medio 2x YTG y se cosecharon en el caso de una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 1,2. Las células se sedimentaron mediante centrifugación (5 min, 5.000 x g, 4 °C). El sedimento celular se lavó tres veces con 10 ml de tampón 1x TAE (suplementado con 10 % [p/v] de sacarosa) y se almacenó a -20 °C. El ADN obtenido a partir de 90 ml de una suspensión de células tratada de esta manera se obtuvo como sigue:

- 30 1. Suspensión del sedimento en 3,8 ml de 1x TAE con sacarosa
2. Adición de 1 ml de una solución de lisozima-ARNasa
3. Incubación: durante 30 min, a 37 °C
- 35 4. Adición de 500 µl de EDTA 0,5 M (de pH 8,0), 40 µl de Tris-HCl (de pH 8,0), 30 µl de SDS (al 10 % [p/v])
5. Incubación: durante 10 min, a 37 °C
6. Adición de 200 µl de una solución de proteinasa K
7. Incubación: durante 2 h, a 37 °C
8. Adición de 1,4 ml de perclorato de Na 5 M
9. Adición de 7,3 ml de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1 [v/v] sobre hielo)
- 40 10. Centrifugación: durante 10 min, 5.000 x g, a 4 °C
11. Retirada de la fase acuosa superior
12. Repetición en dos veces de las etapas 9. - 11.
13. Precipitación del ADN desde la fase acuosa mediante adición de 1 volumen de isopropanol
14. Incubación: durante 5 min, a la TA
- 45 15. Centrifugación: durante 20 min, 16.000 x g, a 4 °C
16. Desecación del sedimento a la TA durante como máximo 2 h
17. Suspensión del sedimento en 2 ml de un tampón TE
18. Adición de 200 µl de una solución de proteinasa K
19. Incubación: durante una noche, a 37 °C
- 50 20. Aumento del volumen hasta 4 ml con agua destilada
21. Adición de 600 µl de acetato de Na 3 M (de pH 5,2)
22. Extracción repetida tres veces con una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (véanse las etapas 9. - 11.)
23. Precipitación del ADN mediante adición de 1 volumen de isopropanol
- 55 24. Incubación: durante 5 min, a la TA
25. Centrifugación: durante 20 min, 16.000 x g, a 4 °C
26. Lavado repetido dos veces del sedimento con etanol al 96 % (v/v) (purísimo, enfriado con hielo)
27. Desecación del sedimento a la TA durante como máximo 2 h
28. Suspensión del sedimento en 200 µl de TE

60

Los cebadores empleados para la PCR PthIAXmaf<sub>w</sub> (CAT GAT TTC CCG GGG GTT AGC ATA TG) y PthIASalrev (CAG AGT TAT TTT TAA GTC GAC TTT CTA GCA C) proporcionaron la introducción de un sitio de corte con *Xma*I junto al extremo 5' o respectivamente de un sitio de corte con *Sal*I junto al extremo 3' del fragmento amplificado. Se empleó la Taq-Mastermix (de Qiagen Hilden) según los datos del fabricante en las siguientes condiciones:

5

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	2 min	1
95 °C	30 s	30
60 °C	40 s	30
72 °C	1,5 min	30
72 °C	5 min	1

Se obtuvo un fragmento con el tamaño esperado de aproximadamente 1.400 pb. Éste se subclonó primeramente en el vector pJET (de Fermentas, St. Leon-Rot) según los datos del fabricante (pJet\_PthIA). A continuación, el fragmento de *thIA* procedente se recortó de nuevo desde este plásmido con las endonucleasas de restricción *Xho*I y *Cfr*9I (1.397 pb) y se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, según los datos del fabricante). El plásmido pKSadcte se trató asimismo con *Xho*I y *Cfr*9I y se desfosforiló adicionalmente (con la Shrimp alkaline phosphatase SAP, de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, según los datos del fabricante). A esto le siguió la ligación del vector tratado de esta manera y del fragmento mediante utilización del estuche Rapid Ligation Kit según los datos del fabricante (de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). En cada caso 10 µl de la tanda de ligación se emplearon para la transformación de 100 µl de células de la cepa *E. coli* XL1-B competentes en presencia de CaCl<sub>2</sub>. Los clones obtenidos se cultivaron a continuación en un medio líquido LB, que contenía ampicilina, y se aisló el ADN plasmídico. Los plásmidos aislados se comprobaron mediante un análisis por restricción (con *Sal*I/*Cfr*9I) y a continuación se secuenciaron los clones positivos (Agowa GmbH, Berlin).

10

15

20

Este plásmido con la SEQ ID No. 8 fue designado como pKSatt y se empleó para la transformación ulterior en el seno de diferentes cepas de *E. coli*, que fueron investigadas a continuación en cuanto a la formación de acetona.

Clonación de los genes *adc*, *tell<sub>srf</sub>*, *thIA* en el plásmido pSK: Para la clonación de los tres genes en el vector pSK se recortó primeramente el fragmento *adc-tell<sub>srf</sub>* ya presente en el pKS mediante corte por restricción con *Apal*I y *Sal*I (1.625 pb) y se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, según los datos del fabricante) y se ligó en el vector pSK asimismo cortado y desfosforilado (SAP, de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, según los datos del fabricante). Para esto, se utilizó el estuche Quick Ligation Kit (de New England Biolabs GmbH, Francfort a. M.) correspondientemente a los datos del fabricante. Para la comprobación de los clones obtenidos, éstos se cultivaron a continuación en un medio líquido LB, que contenía ampicilina, y se aisló el ADN plasmídico. Los plásmidos aislados se comprobaron mediante un análisis por restricción (con *Apal*I/*Sal*I). El plásmido así obtenido se designó como pSKadcte y se utilizó ulteriormente para la subsiguiente etapa de clonación.

25

30

El gen de la tiolasa *thIA* se amplificó mediante una PCR del plásmido pDrive\_ThI (SEQ ID Nr. 21) con los cebadores ThIAXmaf<sub>w</sub> (GTC GAC CCG GGT CAA AAT TTA GGA G) y ThIASalrev (GCT TGT CGA ATT CAG ATC AGA G). En este caso, los cebadores proporcionaron la incorporación de un sitio de corte con *Xma*I junto al extremo 5' o respectivamente de un sitio de corte con *Sal*I junto al extremo 3' del fragmento amplificado. Se empleó la Taq-Mastermix (de Qiagen, Hilden) según los datos del fabricante en las siguientes condiciones:

35

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	2 min	1
95 °C	30 s	30
60 °C	1 min	30
72 °C	1,5 min	30
72 °C	10 min	1

40

Se obtuvo un fragmento con el tamaño esperado de aproximadamente 1.250 pb. Éste se subclonó primeramente en el vector pJET (de Fermentas, St. Leon-Rot) según los datos del fabricante (pJet\_ThIA). A continuación, el fragmento de *thIA* procedente se recortó de nuevo desde este plásmido con las endonucleasas de restricción *Xho*I y *Cfr*9I (1.243 pb) y se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, según los datos del fabricante). El plásmido pSKadcte se trató asimismo con *Xho*I y *Cfr*9I y se desfosforiló adicionalmente (con la Shrimp alkaline phosphatase SAP, de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, según los datos del fabricante). A esto le siguió la ligación del vector tratado de esta manera y del fragmento mediante utilización del estuche Rapid Ligation Kit (de New England Biolabs GmbH, Francfort a. M.) correspondientemente a los datos del fabricante. En cada caso 10 µl de la tanda de ligación se emplearon para la transformación de 100 µl de células de la cepa *E. coli* XL1-B competentes en presencia de CaCl<sub>2</sub>. Los clones obtenidos se cultivaron a continuación en un medio líquido LB, que contenía ampicilina, y se aisló el ADN plasmídico. Los plásmidos aislados se comprobaron mediante un análisis por restricción (con *Sal*I/*Cfr*9I) y a continuación se secuenciaron los clones positivos (Agowa GmbH, Berlin).

45

50

Este plásmido con la SEQ ID No. 7 fue designado como pSKatt y se empleó para la transformación ulterior en el seno de diferentes cepas de *E. coli*, que fueron investigadas a continuación en cuanto a la formación de acetona.

Sobre la base de la construcción artificial pUC18 con la SEQ ID No. 14 (pUCadc\_ctfA/B\_thIA; véase la Fig. 10), en la que los genes clostridianos *adc*, *ctfA/B* y *thIA* se presentaban ya clonados, se pudo producir por una parte una variante adicional en el vector pUC19, mediante el recurso de que este casete de genes es expresado bajo el control del promotor de *lac*. Además de esto, a continuación se pudieron recortar específicamente los genes *ctfA/B* y, después de la introducción de los sitios de corte apropiados en los fragmentos, en lugar de esto se insertaron los genes *tell<sub>srf</sub>* o respectivamente *ybgC* (Fig. 9). En la construcción artificial pUC18 se eliminó además el fragmento de *thIA* original y se reemplazó por un fragmento de *thIA*, que contenía de manera adicional, "conectada previamente", la secuencia del promotor de *thI*.

La Fig. 10 muestra esquemáticamente la producción de las construcciones artificiales pUC19; en la parte superior se muestra la representación esquemática del modo de proceder en el caso de la clonación del casete de genes *adc/ctfA/B/thIA* en el plásmido pUC19, y en parte inferior la representación esquemática del modo de proceder en el caso de la clonación de *tell<sub>srf</sub>* o respectivamente de *ybgC* partiendo del plásmido pUC19act.

Las clonaciones en detalle:

#### Construcción del plásmido pUC19act

El fundamento de éste fue el plásmido pUCadc\_ctfA/B\_thIA con la SEQ ID No. 14 que representa los genes clostridianos de la acetoacetato descarboxilasa (*adc*), de la CoA transferasa (*ctfA/B*) y de la tiolasa (*thIA*), clonados en el vector pUC18. Los genes se han clonado aquí en la orientación opuesta al gen *lacZ*. Para que los genes puedan ser transcritos bajo el control del promotor de *lac*, el fragmento *adc\_ctfA/B\_thIA* (de 3.311 pb) se recortó de nuevo con las endonucleasas de restricción *SalI* y *EcoRI* y se ligó (con el estuche Rapid Ligation Kit según los datos del fabricante; de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) en el vector pUC19, que había sido cortado con las mismas enzimas. En cada caso 10 µl de la tanda de ligación se emplearon para la transformación de 100 µl de células de la cepa *E. coli* XL1-B competentes en presencia de CaCl<sub>2</sub>. Los clones obtenidos se cultivaron a continuación en un medio líquido LB, que contenía ampicilina, y se aisló el ADN plasmídico. Los plásmidos aislados se comprobaron mediante un análisis por restricción (con *SalI/EcoRI*). Este plásmido con la SEQ ID No. 12 fue designado como pUC19act y se empleó para la transformación ulterior en el seno de diferentes cepas de *E. coli*, que fueron investigadas a continuación en cuanto a la formación de acetona. En este caso, esta construcción artificial, que contiene los genes clostridianos para la formación de acetona, sirvió como una posibilidad de comparación para las construcciones artificiales restantes.

#### Construcción del plásmido pUC18att

El fundamento de éste fue el plásmido pUCadc\_ctfA/B\_thIA con la SEQ ID No. 14, que representa los genes clostridianos de la acetoacetato descarboxilasa (*adc*), de la CoA transferasa (*ctfA/B*) y de la tiolasa (*thIA*), clonados en el vector pUC18. El gen de la tioesterasa II *tell<sub>srf</sub>* se amplificó mediante una PCR del plásmido pTEllsrf con los cebadores TellpUCBamfw (CAA TTG GGA TCC GAT AAC AAT TTC ACA CAG) y TellpUCAccrev (GAG ATC TGG TAC CCG GTT AAA TGA TCG GA). En este caso, los cebadores proporcionaron la introducción de un sitio de corte con *BamHI* junto al extremo 5' o respectivamente de un sitio de corte con *Acc65I* junto al extremo 3' del fragmento amplificado. Se empleó la polimerasa Sinergy (de sinergia) (de GeneCraft GmbH, Lüdinghausen) según los datos del fabricante en las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	2 min	1
95 °C	30 s	30
61 °C	30 s	30
72 °C	1 min	30
72 °C	5 min	1

Se obtuvo un fragmento con el tamaño esperado de aproximadamente 800 pb. Éste se subclonó primeramente en el vector pJET (de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) según los datos del fabricante (pJet\_tellpUC). A continuación, el fragmento de *tell<sub>srf</sub>* se recortó de nuevo desde este plásmido con las endonucleasas de restricción *BamHI* y *Acc65I* (776 pb) y se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, según los datos del fabricante). El vector pUCadc\_ctfA/B\_thIA fue tratado asimismo con las enzimas de restricción *BamHI* y *Acc65I*, de modo tal que se cayó el fragmento *ctfA/B* (de 1.331 pb). La tanda se separó en un gel de agarosa y la banda con el vector remanente (4.633 pb) se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, según los datos del fabricante). A esto le siguió la ligación del vector y del fragmento mediando utilización del estuche Rapid Ligation Kit según los datos del fabricante (de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). En cada caso 10 µl de la tanda de ligación se emplearon para la transformación de 100 µl de células de la cepa *E. coli* XL1-B competentes en presencia de CaCl<sub>2</sub>. Los clones obtenidos se cultivaron a continuación en un medio líquido LB, que contenía ampicilina, y se aisló el ADN plasmídico. Los plásmidos aislados se comprobaron mediante un análisis por restricción (con *BamHI/Acc65I*). El plásmido resultante pUC18att\_sub se utilizó ulteriormente para la clonación del fragmento de *thIA* con el promotor de la tiolasa.

El gen de la tiolasa *thIA*, inclusive el promotor de la tiolasa, se amplificó mediante una PCR del ADN genómico procedente de *C. acetobutylicum*. Los cebadores empleados para la PCR PthIApUCSalfw (CAT GAT TTG TCG ACG GTT AGC ATA TG) y PthIApUCBamrev (CAG AGT TAT TTT TAA GGA TCC TTT CTA GC) proporcionaron la incorporación de un sitio de corte con *Sall* junto al extremo 5' o respectivamente de un sitio de corte con *BamHI* junto al extremo 3' del fragmento amplificado. Se empleó la Taq-Mastermix (de Qiagen, Hilden) según los datos del fabricante mediando adición de MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y en las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	2 min	1
95 °C	30 s	30
50 °C	1 min	30
72 °C	1,5 min	30
72 °C	10 min	1

Se obtuvo un fragmento con el tamaño esperado de aproximadamente 1.400 pb. Éste se subclonó primeramente en el vector pJET (de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) según los datos del fabricante (pJet\_PthlpUC). A continuación, el fragmento de *thIA* de este plásmido se recortó de nuevo con las endonucleasas de restricción *Sall* y *BamHI* (1.397 pb) y se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, según los datos del fabricante). A partir del plásmido construido previamente pUC18att\_sub, el fragmento de la tiolasa (sin el promotor, de 1.217 pb) se recortó con *Sall* y *BamHI*, el vector remanente (de 4.192 pb) se eluyó en un gel y el fragmento de la tiolasa inclusive el promotor (de 1.397 pb) se introdujo por ligación (con el estuche Rapid Ligation Kit según los datos del fabricante; de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). En cada caso 10 µl de la tanda de ligación se emplearon para la transformación de 100 µl de células de la cepa *E. coli* XL1-B competentes en presencia de CaCl<sub>2</sub>. Los clones obtenidos se cultivaron a continuación en un medio líquido LB, que contenía ampicilina, y se aisló el ADN plasmídico. Los plásmidos aislados se comprobaron mediante un análisis por restricción (con *Sall/BamHI*) y se secuenciaron (Agowa GmbH, Berlin). Este plásmido se designó como pUC18att (SEQ ID No. 10) y se empleó para la transformación ulterior en el seno de diferentes cepas de *E. coli*, que fueron investigadas a continuación en cuanto a la formación de acetona.

#### Construcción del plásmido pUC19att

El fundamento de éste fue el plásmido pUC19act, que comprende los genes clostridianos de la acetoacetato descarboxilasa (*adc*), de la CoA transferasa (*ctfA/B*) y de la tiolasa (*thIA*), clonados en el vector pUC19. El fragmento de *tell<sub>sr</sub>* se recortó con las enzimas de restricción *BamHI* y *Acc65I* desde el pJET\_tellpUC (776 pb) y se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, según los datos del fabricante). El vector pUC19act se cortó con las mismas enzimas, de modo tal que se cayó el fragmento de *ctfA/B*. Después de la separación en agarosa, la banda remanente con el vector (4.633 pb) se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, según los datos del fabricante). A esto le siguió la ligación del fragmento de vector y del fragmento de *tellpUC*. Para esto, se utilizó el estuche Quick Ligation Kit (de New England Biolabs GmbH, Francfort a. M.) correspondientemente a los datos del fabricante. La transformación se efectuó tal como se ha descrito más arriba. Para la comprobación de los clones obtenidos, éstos se cultivaron a continuación en un medio líquido LB, que contenía ampicilina, y se aisló el ADN plasmídico. Los plásmidos aislados se comprobaron mediante un análisis por restricción (con *BamHI/Acc65I*). El plásmido así obtenido se designó como pUC19att (SEQ ID No. 9) y se empleó para la transformación ulterior en el seno de diferentes cepas de *E. coli*, que fueron investigadas seguidamente en cuanto a la formación de acetona.

#### Construcción del plásmido pUC19ayt

El fundamento de éste lo formó el plásmido pUC19att. El gen *ybgc* para la acil-CoA tioesterasa YbgC procedente de *Haemophilus influenzae* se amplificó mediante una PCR del ADN genómico con los cebadores *ybgcpUCBamfw* (CTC TAG AAG GAT CCT GTT TAA CTT TAA G) e *ybgcpUCAccrev* (ATT GGG TAC CTC ATT GCA TAC TCC G). En este caso, los cebadores proporcionaron la incorporación de un sitio de corte con *BamHI* junto al extremo 5' o respectivamente de un sitio de corte con *Acc65I* junto al extremo 3' del fragmento amplificado. Se empleó la Taq-Mastermix (de Qiagen, Hilden) según los datos del fabricante en las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	2 min	1
94 °C	30 s	30
57 °C	1 min	30
72 °C	1 min	30
72 °C	10 min	1

Se obtuvo un fragmento con el tamaño esperado de aproximadamente 490 pb. Éste se subclonó primeramente en el vector pJET (de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) según los datos del fabricante (pJet\_ybgcpUC). A continuación, el fragmento de *ybgc* se recortó de nuevo desde este plásmido con las endonucleasas de restricción *BamHI* y *Acc65I*



(465 pb) y se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, según los datos del fabricante).

El vector pUC19att fue tratado asimismo con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Acc*65I, de modo tal que se cayó el fragmento de *tell<sub>srf</sub>* (de 468 pb). La tnda se separó en un gel de agarosa y la banda con el vector remanente (de 4.633 pb) se eluyó en un gel (con el estuche Gel extraction Kit; de peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, según los datos del fabricante). A esto le siguió la ligación del vector y del fragmento mediando utilización del estuche Rapid Ligation Kit según los datos del fabricante (de Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). En cada caso 10 µl de la tnda de ligación se emplearon para la transformación de 100 µl de células de la cepa *E. coli* XL1-B competentes en presencia de CaCl<sub>2</sub>. Los clones obtenidos se cultivaron a continuación en un medio líquido LB, que contenía ampicilina, y se aisló el ADN plasmídico. Los plásmidos aislados se comprobaron mediante un análisis por restricción (con *Bam*HI/*Acc*65I) y se secuenciaron (Agowa GmbH, Berlin). El plásmido resultante se designó como pUC19ayt (SEQ ID No. 11) y se empleó para la transformación ulterior en el seno de diferentes cepas de *E. coli*, que fueron investigadas a continuación en cuanto a la formación de acetona.

En la Tabla 1 se ha reunido una recopilación acerca de las construcciones artificiales de plásmidos presentes.

Tabla 1: Construcciones artificiales de plásmidos

Plásmido	Tamaño en pb	Inserto	Promotor
pSKatt	5.771	<i>tell<sub>srf</sub></i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	Lac
pKSatt	5.925	<i>tell<sub>srf</sub></i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	Thl
pUC19att	5.409	<i>tell<sub>srf</sub></i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	Lac
pUC18att	5.589	<i>tell<sub>srf</sub></i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	Thl
pUC19ayt	5.101	<i>ybgc</i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	Lac
pUC19act	5.964	<i>ctfA/B</i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	Lac

Ejemplo 5: Formación de acetona en *E. coli*

Todas las variantes obtenidas de plásmidos (véase la Tabla 1) fueron investigadas en la cepa de clonación de *E. coli* HB101 en cuanto a la formación de acetona. Los análisis se efectuaron a la escala de 5 ml en un medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml), después de una inoculación, a partir de unos correspondientes cultivos previos y de una incubación a 37 °C y 200 rpm. La densidad óptica (600 nm) se vigiló por fotometría, y en el caso de un valor de aproximadamente 0,5-0,6 se indujo la expresión de los genes clonados mediante adición de IPTG 1 mM (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido), y después de 3-4 h se añadió glucosa (20 g/l). En el caso de las variantes bajo el control del promotor de la tiolasa no se efectuó ninguna inducción, puesto que se partió del hecho de que se efectúa una expresión constitutiva. En determinados momentos, a lo largo de un período de tiempo de aproximadamente 48 h se extrajeron muestras, y, mediante una cromatografía de gases, se determinaron las concentraciones de acetona y de acetato en el material sobrenadante del medio exento de células. Facultativamente, se realizaron unas adiciones adicionales de glucosa en diferentes cantidades (en el intervalo de 10-40 g/l) o bien 4 h después de la inducción o también al mismo tiempo que la inducción.

En *E. coli* HB101 se pudieron detectar con todas las variantes de plásmidos unas significativas producciones de acetona. En la Figura 11, se muestran a modo de ejemplo las curvas de crecimiento con las cantidades formadas de acetona y acetato para unas variantes individuales.

En la Tabla 2 se muestra una recopilación de los resultados con las concentraciones máximas de acetona.

La Fig. 11 representa en cada caso la densidad óptica (a 600 nm), así como las concentraciones de acetona y acetato (en mM) en unos momentos escogidos. La flecha negra indica en cada caso el momento de la adición de IPTG (1 mM), la flecha verde indica la adición de la glucosa (20 g/l).

Tab. 2: Recopilación de las concentraciones máximas de acetona de las variantes individuales de plásmidos en cultivos de 5 ml

Plásmido	Inserto	Promotor	Concentración máxima de acetona, cepa, medio
pSKatt	<i>tell<sub>srf</sub></i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	lac	34 mM (2,0 g/l, HB101, LB <sub>Amp</sub> )
pKSatt	<i>tell<sub>srf</sub></i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	thl	36 mM (2,1 g/l, HB101, LB <sub>Amp</sub> )
pUC19att	<i>tell<sub>srf</sub></i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	lac	30 mM (1,7 g/l, HB101, LB <sub>Amp</sub> )
pUC18att	<i>tell<sub>srf</sub></i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	thl	35 mM (2,0 g/l, HB101, LB <sub>Amp</sub> )
pUC19ayt	<i>ybgc</i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	lac	60 mM (3,5 g/l, HB101, LB <sub>Amp</sub> )
pUC19act	<i>ctfA/B</i> ( <i>adc</i> , <i>thIA</i> )	lac	46 mM (2,7 g/l, HB101, LB <sub>Amp</sub> )

**Ejemplo 6: Comparación de la ruta metabólica de la acetona con un gen *ybgC* clonado procedente de *H. influenzae* con la ruta metabólica de la acetona, que se compone exclusivamente de genes clostridianos**

En un subsiguiente experimento se intentó entonces reproducir los resultados obtenidos también en unos cultivos de 100 ml (en LB<sub>Amp</sub>) con las variantes pUC19ayt y pUC19act como testigos (a 37 °C, 200 rpm). Los cultivos principales fueron inoculados con 1 ml de un correspondiente cultivo previo y fueron inducidos en el caso de una DO<sub>600nm</sub> de 0,5

con IPTG 1 mM. Desviándose de los ensayos realizados hasta ahora, se repitió la adición de glucosa (20 g/l) 18 h después de la primera adición. Adicionalmente, de manera paralela a los momentos individuales de las tomas individuales de muestras se efectuó la determinación del contenido de glucosa del cultivo, con el fin de determinar el consumo de glucosa. La determinación de la glucosa se llevó a cabo mediante un ensayo óptico-enzimático según Bergmeyer (1970), en cuyo caso por medio de las enzimas hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, mediando adición de ATP y NADP<sup>+</sup>, se efectúa en dos etapas una reacción de la glucosa para dar 6-fosfogluconato y NADPH (Bergmeyer, H. U. (jefe de edición): *Methods of Enzymatic Analysis* (Métodos del análisis enzimático), 2<sup>a</sup> edición, editorial Verlag Chemie, Weinheim - Deerfield Beach - Basilea 1970). La cantidad de NADPH formada en este caso es proporcional a la cantidad presente de glucosa y puede ser determinada fotométricamente a una longitud de onda de 340 nm a través de la modificación de la extinción. Los resultados a este respecto se han representado en las Figuras 12 A y 12 B. Se puede reconocer, que la glucosa en el cultivo A (*E. coli* HB101 pUC19ayt) ya había sido consumida completamente en el momento de la segunda adición.

No obstante, la aplicación renovada de glucosa no dio lugar ni al esperado aumento adicional de la cantidad de acetona ni fue consumida aquella, puesto que, evidentemente no se pudo comprobar ninguna disminución. Se ha de partir del hecho de que en ese momento otros factores limitaban ya el crecimiento, puesto que se no tuvo lugar tampoco ninguna aumento adicional de la densidad óptica. Se formaron como máximo 67 mM (3,9 g/l) de acetona. Algo similar sucedió en el caso del cultivo B con el plásmido testigo pUC19act, que se llevó a cabo en iguales condiciones. La glucosa no había sido consumida todavía totalmente en el momento de la segunda adición, y en este caso, la adición renovada de glucosa tampoco tuvo ningún efecto en conexión con un aumento de la cantidad formada de acetona. La cantidad máxima de acetona estaba situada en 20 mM (1,2 g/l). De esta manera, la variante con el gen *ybgC* clonado procedente de *H. influenzae* produjo en estas condiciones tres veces la cantidad de acetona que produjo el cultivo testigo con los genes exclusivamente clostridianos.

La Fig. 12 representa en cada caso la densidad óptica (a 600 nm), las concentraciones de acetona y acetato (mM) y el contenido de glucosa (g/l) en los momentos escogidos. La flecha negra indica el momento de la adición de IPTG (1 mM), las flechas verdes la adición de glucosa (20 g/l); parte superior: *E. coli* HB101 pUC19ayt, parte inferior: *E. coli* HB101 pUC19act (testigo)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Evonik Degussa GmbH

5 <120> Obtención de acetona por fermentación a partir de materias primas renovables mediante una nueva ruta metabólica

<130> 200700792

10 <160> 21

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

15 <211> 246

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

Met Gly Gln Leu Phe Lys Ser Phe Asp Ala Ser Glu Lys Thr Gln Leu  
1 5 10 15

Ile Cys Phe Pro Phe Ala Gly Gly Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Pro Leu  
20 25 30

His Ala Phe Leu Gln Gly Glu Cys Glu Met Leu Ala Ala Glu Pro Pro  
35 40 45

Gly His Gly Thr Asn Gln Thr Ser Ala Ile Glu Asp Leu Glu Glu Leu  
50 55 60

Thr Asp Leu Tyr Lys Gln Glu Leu Asn Leu Arg Pro Asp Arg Pro Phe  
65 70 75 80

Val Leu Phe Gly His Ser Met Gly Gly Met Ile Thr Phe Arg Leu Ala  
85 90 95

Gln Lys Leu Glu Arg Glu Gly Ile Phe Pro Gln Ala Val Ile Ile Ser  
100 105 110

Ala Ile Gln Pro Pro His Ile Gln Arg Lys Lys Val Ser His Leu Pro  
115 120 125

Asp Asp Gln Phe Leu Asp His Ile Ile Gln Leu Gly Gly Met Pro Ala  
130 135 140

Glu Leu Val Glu Asn Lys Glu Val Met Ser Phe Phe Leu Pro Ser Phe  
145 150 155 160

Arg Ser Asp Tyr Arg Ala Leu Glu Gln Phe Glu Leu Tyr Asp Leu Ala  
165 170 175

Gln Ile Gln Ser Pro Val His Val Phe Asn Gly Leu Asp Asp Lys Lys  
180 185 190

20 Cys Ile Arg Asp Ala Glu Gly Trp Lys Lys Trp Ala Lys Asp Ile Thr

ES 2 470 618 T3

195

200

205

Phe His Gln Phe Asp Gly Gly His Met Phe Leu Leu Ser Gln Thr Glu  
 210 215 220

Glu Val Ala Glu Arg Ile Phe Ala Ile Leu Asn Gln His Pro Ile Ile  
 225 230 235 240

Gln Pro Gly Ser Arg Ser  
 245

<210> 2

<211> 741

<212> ADN

5 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 2

atgggccaac tcttcaaadc atttgatgcg tcggaaaaaa cacagctcat ctgttttccg 60  
 ttgcccggcg gctattcggc gtcgtttcgc cctctccatg cttttttgca gggggagtgc 120  
 gagatgctcg ctgccgagcc gccgggacac ggcacgaatc aaacgtcagc cattgaggat 180  
 ctcgaagagc tgacggattt gtacaagcaa gaactgaacc ttcgccctga tcggccgttt 240  
 gtgctgttcg gacacagtat gggcggaaatg atcaccttca ggctggcgca aaagcttgag 300  
 cgtgaaggca tctttccgca ggcggttatc atttctgcaa tccagccgcc tcatattcag 360  
 cggaaagaaag tgtcccacct gcctgatgat cagttttctcg atcatattat ccaattaggc 420  
 ggaatgcccg cagagcttgt tgaaaataag gaggtcatgt cttttttcct gccttctttc 480  
 cgatcagatt accgggctct tgaacaattt gagctttacg atctggccca gatccagtcg 540  
 cctgttcatg tctttaacgg gcttgatgat aaaaaatgca tacgagatgc ggaaggggtg 600  
 aagaagtggg caaaagacat cacattccat caatttgacg gcgggcacat gttcctgctg 660  
 tcacaaacgg aagaagtcgc agaacggatt tttgcgatct tgaatcagca tccgatcatt 720  
 caaccgggat ccagatctta a 741

<210> 3

10 <211> 650

<212> PRT

<213> Sinorhizobium meliloti

<400> 3

Met Gln Ala Glu Arg Pro Leu Trp Val Pro Asp Arg Glu Ile Val Glu  
 1 5 10 15

Arg Ser Pro Met Ala Glu Phe Ile Asp Trp Cys Gly Glu Arg Phe Gly  
 20 25 30

Arg Ser Phe Ala Asp Tyr Asp Ala Phe His Asp Trp Ser Val Ser Glu  
 35 40 45

Arg Gly Ala Phe Trp Thr Ala Val Trp Glu His Cys Lys Val Ile Gly  
 50 55 60

15

ES 2 470 618 T3

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

Gly Ser Pro Phe Cys Pro Asp Gly Asn Val Leu Phe Asp Tyr Ala Ala  
 340 345 350  
 Ala Glu Arg Phe Ala Val Phe Gly Thr Ser Ala Lys Tyr Ile Asp Ala  
 355 360 365  
 Val Arg Lys Gly Gly Phe Thr Pro Ala Arg Thr His Asp Leu Ser Ser  
 370 375 380  
 Leu Arg Leu Met Thr Ser Thr Gly Ser Pro Leu Ser Pro Glu Gly Phe  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Val Tyr Glu Gly Ile Lys Pro Asp Val Gln Leu Ala Ser Ile  
 405 410 415  
 Ser Gly Gly Thr Asp Ile Val Ser Cys Phe Val Leu Gly Asn Pro Leu  
 420 425 430  
 Lys Pro Val Trp Arg Gly Glu Ile Gln Gly Pro Gly Leu Gly Leu Ala  
 435 440 445  
 Val Asp Val Trp Asn Asp Glu Gly Lys Pro Val Arg Gly Glu Lys Gly  
 450 455 460  
 Glu Leu Val Cys Thr Arg Ala Phe Pro Ser Met Pro Val Met Phe Trp  
 465 470 475 480  
 Asn Asp Pro Asp Gly Ala Lys Tyr Arg Ala Ala Tyr Phe Asp Arg Phe  
 485 490 495  
 Asp Asn Val Trp Cys His Gly Asp Phe Ala Glu Trp Thr Pro His Gly  
 500 505 510  
 Gly Ile Val Ile His Gly Arg Ser Asp Ala Thr Leu Asn Pro Gly Gly  
 515 520 525  
 Val Arg Ile Gly Thr Ala Glu Ile Tyr Asn Gln Val Glu Gln Met Asp  
 530 535 540  
 Glu Val Ala Glu Ala Leu Cys Ile Gly Gln Asp Trp Glu Asp Asp Val  
 545 550 555 560  
 Arg Val Val Leu Phe Val Arg Leu Ala Arg Gly Val Glu Leu Thr Glu  
 565 570 575  
 Ala Leu Thr Arg Glu Ile Lys Asn Arg Ile Arg Ser Gly Ala Ser Pro  
 580 585 590  
 Arg His Val Pro Ala Lys Ile Ile Ala Val Ala Asp Ile Pro Arg Thr  
 595 600 605

ES 2 470 618 T3

Lys Ser Gly Lys Ile Val Glu Leu Ala Val Arg Asp Val Val His Gly  
 610 615 620

Arg Pro Val Lys Asn Lys Glu Ala Leu Ala Asn Pro Glu Ala Leu Asp  
 625 630 635 640

Leu Phe Ala Gly Leu Glu Glu Leu Lys Ser  
 645 650

<210> 4

<211> 1953

<212> ADN

5 <213> Sinorhizobium meliloti

<400> 4

```

atgcaagcag aacgacctt gtgggttccg gacagggaga tagtcgaacg cagccccgatg      60
gctgagttca ttgactggtg cggggagcgc ttcgggcgca gcttcgccga ctatgatgcc      120
tttcatgact ggtcgggtgag cgagcgcggc gcgttctgga ccgccgatg ggaacattgc      180
aaggtcacg gcgaaagcgg ggagaaggcg ctcgtcgacg gcgaccggat gctcgatgcc      240
cgtttctttc cggaagcgag gctcaacttc gccgaaaacc tgctgcgcaa gacggggagc      300
ggcgatgcct tgatcttccg cggcgaggac aagggtgagct accggctgac ctgggacgaa      360
ctgcgcccc tggtgtcgcg tctgcaacag gcgctgaggg cgaggggat cggcgccggc      420
gaccgcgtct ccgcatgat gccgaacatg cccgagacga tcgcactcat gcttgcgacc      480
gcttccgctg gcgccatctg gtcgtcctgt tcgccgatt tcggcgagca gggcgtctc      540
gaccgcttcg gccagatcgc cccaagctc ttcactgtt gcgacggcta ctggtacaac      600
ggcaagcggc aggacgtgga ctcgaagggt cgtgcggtgg ccaagtcgct cggcgcccc      660
accgtcacg ttccctatgc cggagacagc gccgcgcttg cgccgaccgt cgagggcggg      720
gtgacgcttg ccgatttcat cgccggattc caggccggac cgcttgtctt cgagcgctg      780
ccgttcggcc atccgctcta catactgttc tcctcgggca cgaccggcgt acccaaatgc      840
atcgtccatt cggccggcgg aacgctgctg cagcacctca aggaacatcg cttccattgc      900
gggctgaggg acggcgagcg gctgttctat ttcaccacct gcggctggat gatgtggaac      960
tggctggcct cgggcctcgc cgtgggcgca actctgtgcc tctatgactg ctcaccttt      1020
tgccccgacg gcaacgtgct cttcgattat gccgccgccg aacgcttcgc cttgttcggc      1080
acctcggcga aatatatcga cgccgtcgcg aagggcgggt tcaccccgcc aaggacgcac      1140
gatctgtcgt cttgcgggt catgacgtcc accggtcgc cgcttccgcc ggagggcttc      1200
tccttctgt atgagggcat caagcccgat gtccagctcg cctcgatttc cggcggcacc      1260
gacatcgtct cctgcttcgt gctcggcaat cccctgaaac ccgtgtggcg cggagagatt      1320
cagggccccg gcctcgggct cgccgtcgat gtctggaacg acgaaggcaa gccggtcgcg      1380
ggggaaaagg gcgaactcgt ctgcaccagg gcgttccgt cgatgcctgt catgttctgg      1440
aacgatccgg acggcgcgaa gtatcgagcc gcctatttcg accgcttcga caatgtctgg      1500
tgccacggcg attttgccga atggacaccg catggcggca tcgtcatcca cggccgttcc      1560
    
```

ES 2 470 618 T3

gacgcgacat tgaacccccg cggcgtgccc atcggcacgg cggagatcta caatcaggtc 1620  
 gaacagatgg atgaagtcgc cgaagcactg tgcacggccc aggactggga ggacgatgtc 1680  
 cgcgtcgtcc tgttcgtgcg gctggcccgc ggggtcgaac tgaccgaagc actgaccagg 1740  
 gagatcaaga accggatccc gtcccggccc tcgccgccc acgtgccggc gaagatcatc 1800  
 gccgtcggcg acatcccgcg caccaagtcc ggcaagatcg tcgaactggc ggtgcgcgac 1860  
 gtggtgcacg gccgtccggt caagaacaag gaagcgtgga cgaacccgga agctctcgac 1920  
 ctctttgccc ggctcgagga actcaagagc tga 1953

<210> 5

<211> 136

<212> PRT

5 <213> Haemophilus influenzae

<400> 5

Met Leu Asp Asn Gly Phe Ser Phe Pro Val Arg Val Tyr Tyr Glu Asp  
 1 5 10 15

Thr Asp Ala Gly Gly Val Val Tyr His Ala Arg Tyr Leu His Phe Phe  
 20 25 30

Glu Arg Ala Arg Thr Glu Tyr Leu Arg Thr Leu Asn Phe Thr Gln Gln  
 35 40 45

Thr Leu Leu Glu Glu Gln Gln Leu Ala Phe Val Val Lys Thr Leu Ala  
 50 55 60

Ile Asp Tyr Cys Val Ala Ala Lys Leu Asp Asp Leu Leu Met Val Glu  
 65 70 75 80

Thr Glu Val Ser Glu Val Lys Gly Ala Thr Ile Leu Phe Glu Gln Arg  
 85 90 95

Leu Met Arg Asn Thr Leu Met Leu Ser Lys Ala Thr Val Lys Val Ala  
 100 105 110

Cys Val Asp Leu Gly Lys Met Lys Pro Val Ala Phe Pro Lys Glu Val  
 115 120 125

Lys Ala Ala Phe His His Leu Lys  
 130 135

<210> 6

<211> 411

<212> ADN

10 <213> Haemophilus influenzae

<400> 6

atgttggata atggcttttc ttttctgtt cgtgtgtatt atgaagatac tgatgcaggt 60

15 ggcgtagtgt atcacgctcg ctatttgcac tttttgaaac gagcaagaac agaattttg 120



ES 2 470 618 T3

cgtaacattaa attttacgca acaaacctta ctagaggaac aacaactcgc atttgttgtc 180  
 aaaacgctcg ccattgatta ttgctgtggca gcaaaattgg atgatttact tatgggtggaa 240  
 acagaggttt cagaagtaaa aggggctaca atcctttttg aacagagact gatgcgcaac 300  
 accctgatgt tatcaaaggc tactgttaag gttagcctgtg ttgatctagg caagatgaaa 360  
 ccagtggcgt ttcccaaaga agttaaagcg gcgtttcatc acttaaaata a 411

<210> 7  
 <211> 5765  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Plásmido

10

<400> 7  
 ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga 60  
 ccgctacact tgccagcggc ctagcggccc ctcctttcgc tttcttcct tcctttctcg 120  
 ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat 180  
 ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggatgaggt tcacgtagtg 240  
 ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata 300  
 gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt 360  
 tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggtaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat 420  
 ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg 480  
 caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540  
 gggatgtgct gcaagggcat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cagcagcttg 600  
 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg 660  
 gccctgaatt ctattactta agataatcat atataacttc agctctaggc aatattatat 720  
 ctgcaagaat gtgagagcta gaaacaatct cttttactgg caaatcatta agtggcgcca 780  
 tagcgtgatc aaataactgc agtcgagttg gtcctgtcca agcttcatgt acggtaacat 840  
 ctgtgatttt cgcatttata agctcacata ttctagggct tccatcataa ttgggtatta 900  
 ttttcaacat ataattaggg cgacaaattt gatcctttgc ttcattagca tctaaggctt 960  
 tatgtttgta cccattgta gctgtcgcaa ctctaagttt tccatagtct aaagttccta 1020  
 ctaaagtatc tgaatccaca aaaagctttg gataccggag ctttttagga tatgactta 1080  
 attcccttcc tactgcaatt gcaggctcat tatctaaata catcatatga agataatctc 1140  
 ccttaactcc attaaagctt acgggaatag cctgtccgct ttctgtataa caaccaagtc 1200  
 cactcgtatc atgcattgcc ataatttcaa acctgactaa gggctcatca atttctaaag 1260  
 gctctggcac aactttacga agtgcaccca tatctgtacg atatacaatg ttaaaatact 1320  
 cacgattatg aaatttatag ggtcctctag gaaatgcagg cgaagttaat ggcgtgctaa 1380  
 tttgtttaat tacttcatcc ttttaacataa aaggctacctt ccaatctgga tacgtaacgc 1440  
 gtctcgagtc caagctcagc taattaagct tagtgatggt gatggatgat agatcccggg 1500

ES 2 470 618 T3

tgaatgatcg gatgctgatt caagatcgca aaaatccggt ctgcgacttc ttccgtttgt 1560  
gacagcagga acatgtgcc gccgtcaaat tgatggaatg tgatgtcttt tgcccacttc 1620  
ttccaccctt ccgcatctcg tatgcatttt ttatcatcaa gcccgttaaa gacatgaaca 1680  
ggcgactgga tctgggccag atcgtaaagc tcaaattggt caagagcccg gtaatctgat 1740  
cggaagaag gcaggaaaaa ggacatgacc tccttatttt caacaagctc tgcgggcatt 1800  
ccgcctaatt ggataatatg atcgagaaac tgatcatcag gcaggtggga cactttcttc 1860  
cgctgaatat gaggcggctg gattgcagaa atgataaccg cctgcggaaa gatgccttca 1920  
cgctcaagct tttgcccag cctgaagggt atcattccgc ccatactgtg tccgaacagc 1980  
acaaacggcc gatcagggcg aaggttcagt tcttgcttgt acaaaccgt cagctcttcg 2040  
agatcctcaa tggctgacgt ttgattcgtg ccgtgtcccg gcggctcggc agcgagcatc 2100  
tcgactccc cctgcaaaaa agcatggaga gggcgaaacg acgccgaata gccgccggca 2160  
aacggaaaac agatgagctg tgtttttcc gacgcatcaa atgatttgaa gagttggccc 2220  
atggttaatt tctcctcttt aatgaattct gtgtgaaatt gttatccgtc gaggtcgacg 2280  
aattcagatc agagttattt ttaaggatcc tttctagcac tttctagca atattgctgt 2340  
tccttgccg ccacctatac ataaagttgc taagcctttt tttgcatctc ttttttgc 2400  
tgcgtgtaca agagtaacga gtattcttgc acctgatgct ccaattggat gaccaagggc 2460  
aatagctcct ccatttacat ttactttatt catatcaaat tttaaatctt ttgctactgc 2520  
taaactttga gctgcaaaag cttcatttga ttctattaaa tctaattcat caactgtcca 2580  
acctgctttt tcaatagctg cttttgttgc atagaaaggt ccatatccca ttattgctgg 2640  
gtcaactcct gctgaaccat aagaaactat cttagcaagt ggttttactc caagctcttt 2700  
agctttttct gactcatga ttacaagtac tgctgcacag tcatttaatc ctgatgcatt 2760  
accagctgta actgttccat cttttttgaa ggcaggtttt aattttgcaa gtccttctat 2820  
agttgatcca aatctagggg gctcatctgt atcaactaca gtttctccct ttctgccttt 2880  
aattactaca ggaactattt catctttaa ttgacctgat tttatagctt cttcagcttt 2940  
tttttgatgat gcaagagcaa actcatcttg ttcttctctt gaaatgttcc atctctcagc 3000  
tatgttttct gctgttattc ccatgtggta atcattaaat gcatcccaca atccgctcagt 3060  
gatcatttca tcaacaaatt tagcgtttcc cattctatat ccccatctag cgttattcgc 3120  
taagtaagga gctctagaca tattttccat accacctgct attattacgt cagcatctcc 3180  
tgcttttata atttgtgctg ctaagctaac tgttctaagt cctgaaccac aaaccttatt 3240  
aatagtcata gctggaattt caactggtaa tcctgcttta aaagatgcct gtcttgctgg 3300  
attctgtcct aaacctgctt gaagaacatt tcctaaaatg acttcattaa catcctctgg 3360  
ttttattcct gcttttttaa ctgcttcctt tatagctgta gctcctaaat ctactgctgg 3420  
tacatcctta agagactttc cataagatcc aatcgctggt cttactgcac tagctattac 3480  
aacttctttc attctaacta acctcctaaa ttttgaccgg ggggatccac tagttctaga 3540

ES 2 470 618 T3

gcggccgcca ccgcggtgga gctccagctt ttgttccctt tagtgagggt taattgcgcg 3600  
 cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc 3660  
 acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta 3720  
 actcacatta attgcggtgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca 3780  
 gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgctgattg ggcgctcttc 3840  
 cgcttctcgc ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc 3900  
 tcaactaaag gcggtataac gggtatccac agaactcagg gataacgcag gaaagaacat 3960  
 gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt 4020  
 ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg 4080  
 aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc 4140  
 tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt 4200  
 ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa 4260  
 gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaaacta 4320  
 tcgtcttgag tccaaccggt taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa 4380  
 caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa 4440  
 ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt 4500  
 cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt 4560  
 ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaggga tctcaagaag atcctttgat 4620  
 cttttctacg gggctctgac ctcaagtggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttgggtcat 4680  
 gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc 4740  
 aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc 4800  
 acctatctca gcgatctgtc tatttcgctc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta 4860  
 gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga 4920  
 cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg 4980  
 cagaagtggg cctgcaactt tatccgcctc catccagctt attaattggt gccgggaagc 5040  
 tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat 5100  
 cgtgggtgca cgctcgtcgt ttggtatggc ttattcagc tccggttccc aacgatcaag 5160  
 gcgagttaca tgatccccc tggtgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat 5220  
 cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa 5280  
 ttctcttact gtcattgcat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa 5340  
 gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga 5400  
 taataccgcg ccacatagca gaactttaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg 5460  
 gcaaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccaactcgtgc 5520  
 acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg 5580  
 aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa tactcact 5640

ES 2 470 618 T3

	cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat	5700
	atgtgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt	5760
	gccac	5765
	<210> 8	
	<211> 5919	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Plásmido	
10	<400> 8	
	ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga	60
	ccgctacact tgccagcggc ctagcgcggc ctcttttcgc tttcttcctt tcctttctcg	120
	ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccctta gggttccgat	180
	ttagtgcttt acggcacctc gacccccaaa aacttgatta ggggtgatgg tcaacgtagt	240
	ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacggt ggagtcacg ttctttaata	300
	gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggctctat tcttttgatt	360
	tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggtaaataaa tgagctgatt taacaaaaat	420
	ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg	480
	caactgttgga gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaagg	540
	gggatgtgct gcaaggggat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg	600
	taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tggagctcca	660
	ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg atccccggg ggtagcata tgcataagtt	720
	taattttttt gttaaaaaat attaaacttt gtgttttttt taacaaaata tattgataaa	780
	aataataata gtgggtataa ttaagttggt agagaaaacg tataaattag ggataaacta	840
	tggaacttat gaaatagatt gaaatgggtt atctgttacc ccgtatcaaa atttaggagg	900
	ttagttagaa tgaaagaagt tgtaatagct agtgcagtaa gaacagcgat tggatcttat	960
	ggaaagtctc ttaaggatgt accagcagta gatttaggag ctacagctat aaaggaagca	1020
	gttaaaaaag caggaataaa accagaggat gttaatgaag tcatttttagg aaatgttctt	1080
	caagcagggt taggacagaa tccagcaaga caggcatctt ttaaagcagg attaccagtt	1140
	gaaattccag ctatgactat taataagggt tgtggttcag gacttagaac agttagctta	1200
	gcagcacaaa ttataaaagc aggagatgct gacgtaataa tagcagggtg tatggaaaat	1260
	atgtctagag ctcttactt agcgaataac gctagatggg gatatagaat gggaaacgct	1320
	aaatttggtg atgaaatgat cactgacgga ttgtgggatg catttaatga ttaccacatg	1380
	ggaataacag cagaaaacat agctgagaga tggaacattt caagagaaga acaagatgag	1440
	tttgctcttg catcacaaaa aaaagctgaa gaagctataa aatcagggtca atttaagat	1500
	gaaatagttc ctgtagtaat taaaggcaga aaggagaaaa ctgtagttga tacagatgag	1560

ES 2 470 618 T3

cacctagat ttggatcaac tatagaagga cttgcaaaat taaaacctgc cttcaaaaaa 1620  
gatggaacag ttacagctgg taatgcatca ggattaaatg actgtgcagc agtacttgta 1680  
atcatgagtg cagaaaaagc taaagagctt ggagtaaaac cacttgctaa gatagtttct 1740  
tatggttcag caggagttga cccagcaata atgggatatg gacctttcta tgcaacaaaa 1800  
gcagctattg aaaaagcagg ttggacagtt gatgaattag atttaataga atcaaatgaa 1860  
gcttttgag ctcaaagttt agcagtagca aaagatttaa aatttgatat gaataaagta 1920  
aatgtaaagtg gaggagctat tgcccttggc catccaattg gagcatcagg tgcaagaata 1980  
ctcgttactc ttgtacacgc aatgcaaaaa agagatgcaa aaaaaggctt agcaacttta 2040  
tgtataggtg gcggaacaagg aacagcaata ttgctagaaa agtgctagaa agtcgacctc 2100  
gacggataac aatttcacac agaattcatt aaagaggaga aattaacctt gggccaactc 2160  
ttcaaatcat ttgatgcgtc ggaaaaaaca cagctcatct gttttccggt tgccggcggc 2220  
tattcggcgt cgtttcgccc tctccatgct tttttgcagg gggagtgcga gatgctcgct 2280  
gccgagccgc cgggacacgg cacgaatcaa acgtcagcca ttgaggatct cgaagagctg 2340  
acggatttgt acaagcaaga actgaacctt cgccctgatc ggccgtttgt gctgttcgga 2400  
cacagtatgg gcggaatgat caccttcagg ctggcgcaaa agcttgagcg tgaaggcatc 2460  
ttccgcagg cggttatcat ttctgcaatc cagccgcctc atattcagcg gaagaaagtg 2520  
tcccacctgc ctgatgatca gtttctcgat catattatcc aattaggcgg aatgcccgca 2580  
gagcttgttg aaaataagga ggtcatgtcc tttttcctgc cttctttccg atcagattac 2640  
cgggctcttg aacaatttga gctttacgat ctggcccaga tccagtcgcc tgttcatgtc 2700  
tttaacgggc ttgatgataa aaaatgcata cgagatgcgg aagggtggaa gaagtgggca 2760  
aaagacatca cattccatca atttgacggc gggcacatgt tcctgctgtc acaaacggaa 2820  
gaagtcgcag aacggatttt tgcgatcttg aatcagcatc cgatcattca accgggatct 2880  
catcaccatc accatcacta agcttaatta gctgagcttg gactcgagac gcgttacgta 2940  
tccagattgg aaggtaacctt ttatgttaa ggatgaagta attaaacaaa ttagcacgcc 3000  
attaacttcg cctgcatttc cttagaggacc ctataaattt cataatcgtg agtattttaa 3060  
cattgtatat cgtacagata tggatgcact tcgtaaagtt gtgccagagc ctttagaaat 3120  
tgatgagccc ttagtcaggt ttgaaattat ggcaatgcat gatacgagtg gacttggttg 3180  
ttatacagaa agcggacagg ctattcccgt aagctttaat ggagttaagg gagattatct 3240  
tcatatgatg tatttagata atgagcctgc aattgcagta ggaaggaat taagtgcata 3300  
tcctaaaaag ctcgggtatc caaagctttt tgtggattca gatactttag taggaacttt 3360  
agactatgga aaacttagag ttgcgacagc tacaatgggg tacaacata aagccttaga 3420  
tgctaatgaa gcaaaggatc aaatttgctg ccctaattat atgttgaaaa taatacccaa 3480  
ttatgatgga agccctagaa tatgtgagct tataaatgcg aaaatcacag atgttaccgt 3540  
acatgaagct tggacaggac caactcgact gcagttattt gatcacgcta tggcgccact 3600  
taatgatttg ccagtaaaag agattgtttc tagctctcac attcttgag atataatatt 3660

gcctagagct gaagttatat atgattatct taagtaatag aattcagggc ccggtaccca 3720  
 gcttttgttc ccttttagtga gggttaattg cgcgcttggc gtaatcatgg tcatagctgt 3780  
 ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa 3840  
 agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgctgctcac 3900  
 tgcccgttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg 3960  
 cggggagagg cggtttgctg attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgtgctc 4020  
 gctcggctcgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat 4080  
 ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 4140  
 ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt tttccatag gctccgcccc cctgacgagc 4200  
 atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc 4260  
 aggcgtttcc ccctggaagc tcctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg 4320  
 gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 4380  
 ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg 4440  
 ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc 4500  
 acgacttate gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 4560  
 gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat 4620  
 ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat 4680  
 ccggcaaaaca aaccaccgct ggtagcgggt gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 4740  
 gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc tacggggtct gacgctcagt 4800  
 ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 4860  
 agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt 4920  
 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc 4980  
 gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tntagataac tacgatacgg gagggcttac 5040  
 catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat 5100  
 cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg 5160  
 cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 5220  
 gtttgegcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggtg 5280  
 tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt 5340  
 gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgagc 5400  
 tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa 5460  
 gatgcttttc tgtgactggt gactactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc 5520  
 gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 5580  
 taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 5640  
 tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcaccaa ctgatcttca gcatctttta 5700

ES 2 470 618 T3

ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccga aaaaagggaa 5760  
 taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca 5820  
 tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 5880  
 aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtccac 5919

<210> 9  
 <211> 5409  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Plásmido

10

<400> 9  
 tcgCGcGttt cGgtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccG gagacggTca 60  
 cagcttGtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccG tcagggcgGg tcagcggggtg 120  
 ttggcgggtg tcggggctgG cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180  
 accatatgCG gtgtgaaata cgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240  
 attcGCCatt caggctgCGc aactgttggg aagggcGatc ggtgcgggGc tcttcGctat 300  
 tacGCCagct ggcgaaaggG ggatgtgctg caaggcGatt aagtTgggta acGCCagggT 360  
 tttcccagtc acgacgttGt aaaacgacgg ccagTgaatt caggtaaCTc ttatttttat 420  
 tacttaagat aatcatatat aacttcagct ctaggcaata ttatatctgc aagaatgtga 480  
 gagctagaaa caatctcttt tactggcaaa tcattaagtG gcGCCatagc gtgatcaaat 540  
 aactgcagtc gagttggTcc tgtccaagct tcatgtacgg taacatctgt gatTTtcgca 600  
 tttataagct cacatattct agggcttcca tcataattgg gtattatttt caacatataa 660  
 ttagggcgac aaatttgatc ctttgcttca ttagcatcta aggcTTtatg tttgtacccc 720  
 attgtagctg tcgcaactct aagttttcca tagtctaaag ttcctactaa agtatctgaa 780  
 tccacaaaaa gctttggata cccgagcttt ttaggatatg cacttaattc ctttcctact 840  
 gcaattgcag gctcattatc taaatacatc atatgaagat aatctccctt aactccatta 900  
 aagcttacgg gaatagcctg tccgctttct gtataacaac caagtccact cgtatcatgc 960  
 attGCCataa tttcaaacct gactaagggc tcatcaattt ctaaaggctc tggcacaact 1020  
 ttacgaagtG catccatatc tgtacgatat acaatgttaa aatactcagc attatgaaat 1080  
 ttatagggTc ctctaggaaa tgcaggcgaa gttaatggcg tgctaatttg ttttaattact 1140  
 tcatccttta acataaaaagG taccCGgtta aatgatcgga tgctgattca agatcgcaaa 1200  
 aatccgttct gcgacttctt ccgtttGtga cagcaggaac atgtgcccGc cgtcaaattg 1260  
 atggaatgtg atgtcttttg ccacttctt ccacccttcc gcatctcgta tgcatttttt 1320  
 atcatcaagc ccgttaaaga catgaacagg cgactggatc tgggCCagat cgtaaagctc 1380  
 aaattgttca agagcccggT aatctgatcg gaaagaaggc aggaaaaagg acatgacctc 1440  
 cttattttca acaagctctg cgggcattcc gcctaattgg ataatatgat cgagaaactg 1500  
 atcAtcagGc aggtgggaca ctttctcGc ctgaatatga ggcggctgga ttgcagaaat 1560

gataaccgcc tgcggaaaga tgccttcacg ctcaagcttt tgcgccagcc tgaaggatgat 1620  
cattccgccc atactgtgtc cgaacagcac aaacggccga tcagggcgaa ggttcagttc 1680  
ttgcttgtagc aaatccgtca gctcttcgag atcctcaatg gctgacgttt gattcgtgcc 1740  
gtgtcccggc ggctcggcag cgagcatctc gactcccc tgcaaaaaag catggagagg 1800  
gcgaaacgac gccgaatagc cgccggcaaa cggaaaacag atgagcggtg tttttccga 1860  
cgcatcaaat gatttgaaga gttggcccat ggtaatttc tcctcttaa tgaattctgt 1920  
gtgaaattgt tatcggatcc tttctagcac tttctagca atattgctgt tccttgccg 1980  
ccacctatac ataaagttgc taagcctttt tttgcatctc tttttgcat tgcgtgtaca 2040  
agagtaacga gtattcttgc acctgatgct ccaattggat gaccaagggc aatagctcct 2100  
ccatttacat ttactttatt catatcaaat tttaaatctt ttgctactgc taaactttga 2160  
gctgcaaaag cttcatttga ttctattaa tctaattcat caactgtcca acctgctttt 2220  
tcaatagctg cttttgttgc atagaaaggc ccatatcca ttattgctgg gtcaactcct 2280  
gctgaaccat aagaaactat cttagcaagt ggttttactc caagctctt agctttttct 2340  
gactcatga ttacaagtac tgctgcacag tcatttaatc ctgatgcatt accagctgta 2400  
actgttccat cttttttgaa ggcaggtttt aattttgcaa gtccttctat agttgatcca 2460  
aatctagggc gctcatctgt atcaactaca gttctcctt ttctgcctt aattactaca 2520  
ggaactattt catctttaa ttgacctgat tttatagctt cttcagctt tttttgtgat 2580  
gcaagagcaa actcatcttg ttcttctctt gaaatgttcc atctctcagc tatgttttct 2640  
gctgttattc ccatgtggta atcattaaat gcatcccaca atccgtcagt gatcatttca 2700  
tcaacaaatt tagcgtttcc cattctatat cccatctag cgttattcgc taagtaagga 2760  
gctctagaca tattttccat accacctgct attattacgt cagcatctec tgcttttata 2820  
atgtgtgctg ctaagctaac tgttctaagt cctgaaccac aaaccttatt aatagtcata 2880  
gctggaattt caactggtaa tcctgcttta aaagatgcct gtcttgctgg attctgtcct 2940  
aaacctgctt gaagaacatt tcctaaaatg acttcattaa catcctctgg ttttattcct 3000  
gcttttttaa ctgcttcctt tatagctgta gtcctaaat ctactgctgg tacatcctta 3060  
agagactttc cataagatcc aatcgtggtt ctactgcac tagctattac aacttctttc 3120  
attctaacta acctcctaaa ttttgatacg ggtcgacctg caggcagca agcttggcgt 3180  
aatcatggc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca 3240  
tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat 3300  
taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt 3360  
aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttctt 3420  
cgctcactga ctgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatca gctcactcaa 3480  
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa 3540  
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc 3600



ES 2 470 618 T3

tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga 3660  
caggactata aagataaccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc 3720  
cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt 3780  
ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct 3840  
gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 3900  
agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta 3960  
gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct 4020  
aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa 4080  
gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgttt 4140  
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta 4200  
cggggctctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggct atgagattat 4260  
caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa 4320  
gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct 4380  
cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgctgact ccccgctctg tagataacta 4440  
cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct 4500  
caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg 4560  
gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa 4620  
gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt 4680  
cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggtc ccaacgatca aggcgagta 4740  
catgatcccc catgttggtc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctctccg atcgttgta 4800  
gaagtaagtt ggccgcagtg ttatactca tggttatggc agcactgcat aattctcta 4860  
ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactgggta gtactcaacc aagtcattct 4920  
gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg 4980  
cgccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac 5040  
tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact 5100  
gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa 5160  
atgccgcaaa aaaggggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt 5220  
ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat 5280  
gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg 5340  
acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc 5400  
cctttcgtc 5409

<210> 10  
<211> 5589  
<212> ADN  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Plásmido

10 <400> 10

ES 2 470 618 T3

tcgcgcgttt	cggatgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccc	gagacgggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccc	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatagcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcgggcc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaagg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccaggt	360
ttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgccaa	gcttgcagtc	ctgcaggtcg	420
acggttagca	tatgcataag	tttaattttt	ttgttaaaaa	atattaaact	ttgtgttttt	480
tttaacaaaa	tatattgata	aaaataataa	tagtgggtat	aattaagttg	ttagagaaaa	540
cgtataaatt	agggataaac	tatggaactt	atgaaataga	ttgaaatggt	ttatctgtta	600
ccccgatca	aaatttagga	ggtagtttag	aatgaaagaa	gttgtaatag	ctagtgcagt	660
aagaacagcg	attggatctt	atggaaagtc	tcttaaggat	gtaccagcag	tagatttagg	720
agctacagct	ataaaggaag	cagttaaaaa	agcaggaata	aaaccagagg	atgttaatga	780
agtcatttta	ggaaatgttc	ttcaagcagg	tttaggacag	aatccagcaa	gacaggcatc	840
ttttaaagca	ggattaccag	ttgaaattcc	agctatgact	attaataagg	tttgtggttc	900
aggacttaga	acagttagct	tagcagcaca	aattataaaa	gcaggagatg	ctgacgtaat	960
aatagcaggt	ggtaggaaa	atatgtctag	agctccttac	ttagcgaata	acgctagatg	1020
gggatataga	atgggaaacg	ctaaatttgt	tgatgaaatg	atcactgacg	gattgtggga	1080
tgcatttaat	gattaccaca	tgggaataac	agcagaaaac	atagctgaga	gatggaacat	1140
ttcaagagaa	gaacaagatg	agtttgctct	tgcatcacia	aaaaaagctg	aagaagctat	1200
aaaatcaggt	caatttaaag	atgaaatagt	tcctgtagta	attaaggca	gaaagggaga	1260
aactgtagtt	gatacagatg	agcaccctag	atttggatca	actatagaag	gacttgcaaa	1320
attaaaacct	gccttcaaaa	aagatggaac	agttacagct	ggtaatgcat	caggattaaa	1380
tgactgtgca	gcagtagctg	taatcatgag	tgcaaaaaaa	gctaaagagc	ttggagtaaa	1440
accacttgct	aagatagttt	cttatggttc	agcaggagtt	gaccagcaa	taatgggata	1500
tggacctttc	tatgcaacia	aagcagctat	tgaaaaagca	ggttggacag	ttgatgaatt	1560
agatttaata	gaatcaaatg	aagcttttgc	agctcaaagt	ttagcagtag	caaaagattt	1620
aaaatttgat	atgaataaag	taaatgtaaa	tggaggagct	attgcccttg	gtcatccaat	1680
tggagcatca	ggtgcaagaa	tactcgttac	tcttgtacac	gcaatgcaaa	aaagagatgc	1740
aaaaaaaggc	ttagcaactt	tatgtatagg	tggcggacia	ggaacagcaa	tattgctaga	1800
aaagtgctag	aaaggatccg	ataacaattt	cacacagaat	tcattaaaga	ggagaaatta	1860
accatgggcc	aactcttcaa	atcatttgat	gcgtcggaaa	aaacacagct	catctgtttt	1920
ccgtttgccg	gcggtctattc	ggcgtcgttt	cgccctctcc	atgctttttt	gcagggggag	1980

ES 2 470 618 T3

tgcgagatgc	tcgctgccga	gccgccggga	cacggcacga	atcaaacgtc	agccattgag	2040
gatctcgaag	agctgacgga	tttgtacaag	caagaactga	accttcgccc	tgatcggccg	2100
tttgtgctgt	tcggacacag	tatgggcgga	atgatcacct	tcaggctggc	gcaaaagctt	2160
gagcgtgaag	gcatctttcc	gcaggcgggt	atcatttctg	caatccagcc	gcctcatatt	2220
cagcgggaaga	aagtgtccca	cctgcctgat	gatcagtttc	tcgatcatat	tatccaatta	2280
ggcggaaatgc	ccgcagagct	tgttgaaaat	aaggagggtca	tgctcttttt	cctgccttct	2340
ttccgatcag	attaccgggc	tcttgaacaa	tttgagcttt	acgatctggc	ccagatccag	2400
tcgcctgttc	atgtctttaa	cgggcttgat	gataaaaaat	gcatacgaga	tgcggaaggg	2460
tggaagaagt	gggcaaaaaga	catcacattc	catcaatttg	acggcgggca	catgttcctg	2520
ctgtcacaaa	cggaagaagt	cgcagaacgg	atTTTTgcga	tcttgaatca	gcatccgatc	2580
athtaaccgg	gtacctttta	tgtaaagga	tgaagtaatt	aaacaaatta	gcacgccatt	2640
aacttcgcct	gcatttccta	gaggacccta	taaatttcat	aatcgtgagt	athttaacat	2700
tgtatatcgt	acagatatgg	atgcacttcg	taaagttgtg	ccagagcctt	tagaaattga	2760
tgagccctta	gtcagggttg	aaattatggc	aatgcatgat	acgagtggac	ttggttgtta	2820
tacagaaagc	ggacaggcta	ttcccgtaa	ctttaatgga	gttaagggag	attatcttca	2880
tatgatgtat	ttagataatg	agcctgcaat	tgtagtagga	agggaaattaa	gtgcatatcc	2940
taaaaagctc	gggtatccaa	agctttttgt	ggattcagat	actttagtag	gaactttaga	3000
ctatggaaaa	cttagagttg	cgacagctac	aatgggggtac	aacataaag	ccttagatgc	3060
taatgaagca	aaggatcaaa	tttgtcggcc	taattatatg	ttgaaaataa	taccaatta	3120
tgatggaagc	cctagaatat	gtgagcttat	aatgcgaaa	atcacagatg	ttaccgtaca	3180
tgaagcttgg	acaggaccaa	ctcgactgca	gttatttgat	cacgctatgg	cgccacttaa	3240
tgatttgcca	gtaaaagaga	ttgtttctag	ctctcacatt	cttgagata	taatattgcc	3300
tagagctgaa	gttatatatg	attatcttaa	gtaataaaaa	taagagttac	ctgaattcgt	3360
aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	attgttatcc	gctcacaatt	ccacacaaca	3420
tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	gggggtgccta	atgagtgagc	taactcacat	3480
taattgcggt	gcgctcactg	cccgttttcc	agtcgggaaa	cctgtcgtgc	cagctgcatt	3540
aatgaatcgg	ccaacgcgcg	gggagaggcg	gtttgcgtat	tgggcgctct	tccgcttctt	3600
cgctcactga	ctcgctgcgc	tcggctggtc	ggctgcggcg	agcggtatca	gctcactcaa	3660
aggcggtaat	acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	aggaaagaac	atgtgagcaa	3720
aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcggt	gctggcgttt	ttccataggc	3780
tccgcccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaaccgga	3840
caggactata	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	3900
cgaccctgcc	gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	ttcgggaagc	gtggcgcttt	3960
ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	cgttcgtcc	aagctgggct	4020
gtgtgcacga	acccccggt	cagccccgacc	gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	4080

ES 2 470 618 T3

agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta 4140  
 gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct 4200  
 aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa 4260  
 gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgttt 4320  
 gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta 4380  
 cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat 4440  
 caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa 4500  
 gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtggag gcacctatct 4560  
 cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgctg tagataacta 4620  
 cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgca gaccacgct 4680  
 caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg 4740  
 gtctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa 4800  
 gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgcct tgctacaggc atcgtgggtg 4860  
 cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggtc ccaacgatca aggcgagta 4920  
 catgatcccc catgttggtc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctctccg atcgttgta 4980  
 gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcaactca tggttatggc agcactgcat aattctctta 5040  
 ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct 5100  
 gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgccggc gtcaatacgg gataataccg 5160  
 cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac 5220  
 tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact 5280  
 gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa 5340  
 atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctcttcctt 5400  
 ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat 5460  
 gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg 5520  
 acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc 5580  
 cctttcgtc 5589

<210> 11  
 <211> 5098  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Plásmido

10

<400> 11  
 tcgctgcttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60  
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120  
 ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

ES 2 470 618 T3

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240  
 attcgccatt caggctgcmc aactgttggg aagggcgcgc ggtgcgggccc tcttcgctat 300  
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360  
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt caggtaactc ttatTTTTat 420  
 tacttaagat aatcatatat aacttcagct ctaggcaata ttatatctgc aagaatgtga 480  
 gagctagaaa caatctcttt tactggcaaa tcattaagtg gcgccatagc gtgatcaaat 540  
 aactgcagtc gagttggctc tgtccaagct tcatgtacgg taacatctgt gatTTTcgca 600  
 tttataagct cacatattct agggcttcca tcataattgg gtattatttt caacatataa 660  
 ttagggcgac aaatttgatc ctttgcttca ttagcatcta aggctttatg tttgtacccc 720  
 attgtagctg tcgcaactct aagTTTTcca tagtctaaag ttctactaa agtatctgaa 780  
 tccacaaaaa gctttggata cccgagcttt ttaggatatg cacttaattc ctttcctact 840  
 gcaattgcag gctcattatc taaatacatc atatgaagat aatctccctt aactccatta 900  
 aagcttacgg gaatagcctg tccgctttct gtataacaac caagtccact cgtatcatgc 960  
 attgccataa tttcaaact gactaagggc tcatcaattt ctaaaggctc tggcacaact 1020  
 ttacgaagtg catccatatc tgtacgatat acaatgttaa aatactcacg attatgaaat 1080  
 ttatagggtc ctctaggaaa tgcaggcgaa gttaatggcg tgctaatttg ttttaattact 1140  
 tcatccttta acataaaagg tacctcattg catactccga aaaattattt taagtgatga 1200  
 aacgccgctt taacttcttt gggaaacgcc actggtttca tcttgccctag atcaacacag 1260  
 gctaccttaa cagtagcctt tgataacatc aggggtgtgc gcacagctc ctgttcaaaa 1320  
 aggattgtag ccccttttac ttctgaaacc tctgtttcca ccataagtaa atcatccaat 1380  
 tttgctgcca cgcaataatc aatggcgagc gttttgacaa caaatgagag ttgttgttcc 1440  
 tctagtaagg tttgttgcgt aaaatttaat gtacgcaaat attctgttct tgctcgttca 1500  
 aaaaaatgca aatagcgagc gtgatacact acgccacctg catcagtatc ttcataatac 1560  
 acacgaacag gaaaagaaaa gccattatcc aacatatgta tatctccttc ttaaagttaa 1620  
 acaggatcct ttctagcact tttctagcaa tattgctggt ccttgctcgc cacctataca 1680  
 taaagttgct aagccttttt ttgcatctct tttttgcatt gcgtgtacaa gagtaacgag 1740  
 tattcttgca cctgatgctc caattggatg accaagggca atagctcctc catttacatt 1800  
 tactttattc atatcaaatt ttaaattcttt tgctactgct aaactttgag ctgcaaaaagc 1860  
 ttcatttgat tctattaaat ctaattcatc aactgtccaa cctgcttttt caatagctgc 1920  
 tttgttgca tagaaaggtc catatcccat tattgctggg tcaactcctg ctgaaccata 1980  
 agaaactatc ttagcaagtg gttttactcc aagctcttta gctttttctg cactcatgat 2040  
 tacaagtact gctgcacagt catttaatcc tgatgatta ccagctgtaa ctgttccatc 2100  
 tttttgaaag gcaggtttta attttgcaag tccttctata gttgatcaa atctagggtg 2160  
 ctcatctgta tcaactacag tttctccctt tctgccttta attactacag gaaatatttc 2220  
 atctttaaat tgacctgatt ttatagcttc ttcagctttt tttgtgatg caagagcaaa 2280

ctcatcttgt tcttctcttg aaatgttcca tctctcagct atgttttctg ctgttattcc 2340  
 catgtggtaa tcattaaatg catcccacaa tccgtcagtg atcatttcat caacaaattt 2400  
 agcgtttccc attctataat cccatctagc gttattcgct aagtaaggag ctctagacat 2460  
 atttccata ccacctgcta ttattacgtc agcatctcct gcttttataa tttgtgctgc 2520  
 taagctaact gttctaagtc ctgaaccaca aaccttatta atagtcatag ctggaatttc 2580  
 aactggtaat cctgctttaa aagatgcctg tcttgctgga ttctgtccta aacctgcttg 2640  
 aagaacattt cctaaaatga cttcattaac atcctctggg tttattcctg cttttttaac 2700  
 tgcttccttt atagctgtag ctccataaat tactgtctgg acatccttaa gagactttcc 2760  
 ataagatcca atcgctgttc ttactgcact agctattaca acttctttca ttctaactaa 2820  
 cctcctaaat tttgatacgg gtcgacctgc aggcattgca gcttggcgta atcatgggca 2880  
 tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaacaatt cacacaacat acgagccgga 2940  
 agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg 3000  
 cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc 3060  
 caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgtctt ccgcttctc gctcactgac 3120  
 tcgctgcgct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtata 3180  
 cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa 3240  
 aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgttt tccataggct ccgccccct 3300  
 gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgcac aggactataa 3360  
 agataccagg cgttcccccc tggaagctcc ctctgtcgtc ctctgttcc gacctgccc 3420  
 cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca 3480  
 cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa 3540  
 cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga gtccaaccg 3600  
 gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 3660  
 tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg 3720  
 acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc 3780  
 tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag 3840  
 attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac 3900  
 gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttgggca tgagattatc aaaaaggatc 3960  
 ttcacctaga tccttttaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag 4020  
 taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt 4080  
 ctatttcggt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag 4140  
 ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca 4200  
 gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact 4260  
 ttatccgctt ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca 4320

ES 2 470 618 T3

gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg 4380  
 tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc 4440  
 atgttggtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttggtcag aagtaagttg 4500  
 gccgcagtgt tctactcat gggtatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcc 4560  
 tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagttg 4620  
 atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc 4680  
 agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc 4740  
 ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca 4800  
 tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa 4860  
 aaggaataa gggcgacacg gaaatgttg atactcatac tcttctttt tcaatattat 4920  
 tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggatata tatttgaatg tatttagaaa 4980  
 aataaaciaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa 5040  
 accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtc 5098

<210> 12  
 <211> 5964  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Plásmido

10

<400> 12  
 tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60  
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120  
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180  
 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240  
 attgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcccc tcttcgctat 300  
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggtg acgccagggt 360  
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt caggtaactc ttatttttat 420  
 tacttaagat aatcatatat aacttcagct ctaggcaata ttatatctgc aagaatgtga 480  
 gagctagaaa caatctcttt tactggcaaa tcattaagtg gcgcatagc gtgatcaaat 540  
 aactgcagtc gagttggtcc tgtccaagct tcatgtacgg taacatctgt gattttcgca 600  
 tttataagct cacatattct agggcttcca tcataattgg gtattatttt caacatataa 660  
 ttagggcgac aaatttgatc ctttgcttca ttagcatcta aggccttatg tttgtacccc 720  
 attgtagctg tcgcaactct aagttttcca tagtctaaag ttctactaa agtatctgaa 780  
 tccacaaaaa gctttggata cccgagcttt ttaggatatg cacttaattc cttcctact 840  
 gcaattgcag gctcattatc taaatacatc atatgaagat aatctccctt aactccatta 900  
 aagcttacgg gaatagcctg tccgctttct gtataacaac caagtcactc cgtatcatgc 960  
 attgccataa tttcaacct gactaagggc tcatcaattt ctaaaggctc tggcacaact 1020

ES 2 470 618 T3

ttacgaagtg	catccatata	tgtacgatata	acaatgttaa	aatactcacg	attatgaaat	1080
ttatagggtc	ctctaggaaa	tgcaggcgaa	gttaatggcg	tgctaatttg	tttaattact	1140
tcatccttta	acataaaaagg	tacctaaaca	gccatgggtc	taagttcatt	ggatatgagt	1200
aaatctgcag	cagttaaaga	ccttatttca	tcaatgggtg	tgtttttatt	aatttcagtg	1260
agaagtaaac	catcattaat	aacctcaatt	actccaagtt	ctgttacaat	tagatttgct	1320
tgagactttg	ccgtgagggg	aagtgtacat	ttttttaaaa	ttttaggttg	acctttattt	1380
gtatgtctca	ttgcaattat	tactttctta	gctccattta	ctaaatccat	agctccacc	1440
ataccagaga	gcatttttcc	aggaacaatc	caattgggcta	tattaccctt	ttcatctacc	1500
tggagagccc	ctaaaacagt	aacatctacg	tgaccaccac	ggattagtga	aaacgaaact	1560
gagctatcga	aaaatgtgcc	gtcaggaagt	actgttgtat	agtctcctcc	tgcatttact	1620
acatctttat	ctgcctcatt	tatttttagga	ctagcgccca	ttccaactat	tccgttttct	1680
gattggaaag	taattttgaa	attttttggt	atataatctg	caaccatggt	aggaagacct	1740
acacctaagt	ttacaagttg	accatttttt	aattctcttg	caactctttt	ggctattatt	1800
tctttcgcta	ggtttttatc	attaatcatt	ttatgcaggc	tcctttacta	tataatttat	1860
aagaactccg	ggggtcattg	ctttttcctt	ttctagtttt	tcacagctaa	ctaaattttc	1920
agcttcaact	attacggttt	tagctgccat	tgccatatag	ggattaaagt	ttttagtagt	1980
acctttatag	aagggtgttc	cggcctcatc	tacaatacta	cctttaatta	atgctacatc	2040
ggctgtaaga	ggtagctcta	acaaatattc	cgttccattt	atagatattt	ttttctttcc	2100
tttttcaatc	aaagttccta	aacctgtttt	agttagtaca	ccacctaagc	cagatccgcc	2160
tgcacgtatt	ctttccacta	gagttccttg	gggagagagc	tctacttcaa	gttcattatt	2220
aaaagttttt	ttgccagtat	ctgggttgct	gcctatatat	gaagcaataa	gcttttttac	2280
ttgattattt	gatattaact	taccaatacc	tgtattagga	taacatgtat	cattacttat	2340
aatcgttaaa	ttctttatat	ttaaattaac	taaaaaatca	attaatttg	ttggagtgcc	2400
acagtttaaa	aaacctccaa	tcataattgt	catcccatct	ttaaagaatg	accttaaatt	2460
ttcaaacta	attattttag	agttcatttg	gatcctttct	agcacttttc	tagcaatatt	2520
getgttcctt	gtccgccacc	tatacataaa	gttgctaagc	ctttttttgc	atctcttttt	2580
tgcattgcgt	gtacaagagt	aacgagtatt	cttgcacctg	atgctccaat	tggatgacca	2640
agggcaatag	ctcctccatt	tacatttact	ttattcatat	caaattttaa	atcttttgct	2700
actgctaaac	tttgagctgc	aaaagcttca	tttgattcta	ttaaactctaa	ttcatcaact	2760
gtccaacctg	ctttttcaat	agctgctttt	gttgcataga	aaggtccata	tcccattatt	2820
gctgggtcaa	ctcctgctga	accataagaa	actatcttag	caagtggttt	tactccaagc	2880
tctttagctt	tttctgact	catgattaca	agtactgctg	cacagtcatt	taatcctgat	2940
gcattaccag	ctgtaactgt	tccatctttt	ttgaaggcag	gttttaattt	tgcaagtctt	3000
tctatagttg	atccaaatct	agggtgctca	tctgtatcaa	ctacagtttc	tccctttctg	3060



ES 2 470 618 T3

cctttaatta ctacaggaac tatttcatct ttaaattgac ctgattttat agcttcttca 3120  
 gctttttttt gtgatgcaag agcaaaactca tcttgttctt ctcttgaaat gttccatctc 3180  
 tcagctatgt tttctgctgt tattcccatg tggaatcat taaatgcatc ccacaatccg 3240  
 tcagtgatca tticatcaac aaatttagcg tttcccatc tatatcccca tctagcgta 3300  
 ttcgctaagt aaggagctct agacatattt tccataccac ctgctattat tacgtcagca 3360  
 tctcctgctt ttataatttg tgctgctaag ctaactgttc taagtcctga accacaaacc 3420  
 ttattaatag tcatagctgg aatttcaact ggtaatcctg ctttaaaga tgcctgtctt 3480  
 gctggattct gtcctaaacc tgcttgaaga acatttecta aaatgacttc attaacatcc 3540  
 tctggtttta ttctgcttt tttaactgct tcctttatag ctgtagctcc taaatctact 3600  
 gctggtacat ccttaagaga ctttccataa gatccaatcg ctgttcttac tgcactagct 3660  
 attacaactt ctttcattct aactaacctc ctaaattttg atacgggtcg acctgcaggc 3720  
 atgcaagctt ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca 3780  
 caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaatagag 3840  
 tgagctaact cacattaatt gcggtgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt 3900  
 cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc 3960  
 gctcttccgc ttctcgcctc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg 4020  
 tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa 4080  
 agaacatgtg agcaaaaaggc cagcaaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcggtgctgg 4140  
 cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga 4200  
 ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg 4260  
 tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctccctcgg 4320  
 gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc 4380  
 gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 4440  
 gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca 4500  
 ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtc tacagagttc ttgaagtggg 4560  
 ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggat ctgcgctctg ctgaagccag 4620  
 ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg 4680  
 gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc 4740  
 cttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt 4800  
 tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca ctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt 4860  
 ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttacca tgcttaatca 4920  
 gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg 4980  
 tcgtgtagat aactacgata cgggagggtc taccatctgg cccagtgct gcaatgatac 5040  
 cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg 5100  
 ccgagcgeag aagtggctct gcaactttat ccgctccat ccagtctatt aattgttgcc 5160

ES 2 470 618 T3

gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta 5220  
 caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac 5280  
 gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggtttagc tccttcggtc 5340  
 ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatgggt atggcagcac 5400  
 tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact 5460  
 caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaaa 5520  
 tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt 5580  
 cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca 5640  
 ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa 5700  
 aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac 5760  
 tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg 5820  
 gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc 5880  
 gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaaata 5940  
 ggcgtatcac gaggcccttt cgtc 5964

- <210> 13
- <211> 4151
- <212> DNA
- <213> Artificial

5

- <220>
- <223> Plásmido

10

<400> 13  
 gatccagatc tcatcaccat caccatcaact aagcttaatt agctgagctt ggactcctgt 60  
 tgatagatcc agtaatgacc tcagaactcc atctggattt gttcagaacg ctcggttgcc 120  
 gccgggcggt ttttattggt gagaatccaa gctagcttgg cgagatttcc aggagctaag 180  
 gaagctaaaa tggagaaaa aateactgga tataccaccg ttgatatac ccaatggcat 240  
 cgtaaagaac attttgaggc atttcagtca gttgctcaat gtacctataa ccagaccgtt 300  
 cagctggata ttacggcctt tttaaagacc gtaaagaaaa ataagcaca gttttatccg 360  
 gcctttatcc acattcttgc ccgcctgatg aatgctcacc cggaatttcc tatggcaatg 420  
 aaagacggtg agctggtgat atgggatagt gttcaccctt gttacaccgt tttccatgag 480  
 caaactgaaa cgttttcacc gctctggagt gaataccacg acgatttccg gcagtttcta 540  
 cacatatatt cgcaagatgt ggcgtgttac ggtgaaaacc tggcctattt ccctaaaggg 600  
 tttattgaga atatgttttt cgtctcagcc aatccctggg tgagtttccac cagttttgat 660  
 ttaaactggt ccaatatgga caacttcttc gccccggtt tcaccatgca tgggcaaata 720  
 ttatacgcaa ggcgacaagg tgctgatgcc gctggcgatt caggttcacc atgccgtctg 780  
 tgatggcttc catgtcggca gaatgcttaa tgaattacaa cagtactgcg atgagtggca 840  
 gggcggggcg taattttttt aaggcagtta ttggtgcctt taaacgcctg ggtaaatgac 900

ES 2 470 618 T3

tctctagctt gaggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcgtt 960  
 ttatctgttg tttgtcggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccc ctctagagct 1020  
 gcctcgcgcg tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg 1080  
 tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg 1140  
 gtgttgccgg gtgtcggggc gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata 1200  
 ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga 1260  
 aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg cttcctcgtc 1320  
 cactgactcg ctgcgctcgg tctgtcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc 1380  
 ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 1440  
 ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 1500  
 cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 1560  
 actataaaga taccagcgtt tccccctgg aagtcctc gtgcgctctc ctgttccgac 1620  
 cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctccctcg ggaagcgtgg cgctttctca 1680  
 atgctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 1740  
 gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 1800  
 caaccggta agacacgact tatcgccact ggagcagcc actggtaaca ggattagcag 1860  
 agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 1920  
 tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 1980  
 tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa 2040  
 gcagcagatt acgcgagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 2100  
 gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa 2160  
 aaggatctt acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 2220  
 atatgagtaa acttggctcg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 2280  
 gatctgtcta tttcgttcat ccatagctgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat 2340  
 acgggagggc ttaccatctg gccccagtcg tgcaatgata ccgagagacc cacgctcacc 2400  
 ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc 2460  
 tgcaacttta tccgctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag 2520  
 ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg 2580  
 ctgctcgtt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 2640  
 atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttcgggt cctccgatcg ttgtcagaag 2700  
 taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 2760  
 catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga 2820  
 atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta atacgggata ataccgccc 2880  
 acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc 2940  
 aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacc actcgtgcac ccaactgatc 3000

ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc 3060  
 cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctactactct tcctttttca 3120  
 atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat 3180  
 ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt 3240  
 ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgatatca cgaggccctt 3300  
 tcgtcttcac ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcgga taacaattat 3360  
 aatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag aggagaaatt 3420  
 aaccatgggc caactcttca aatcatttga tgcgtcggaa aaaacacagc tcactgtttt 3480  
 tccgtttgcc ggcggctatt cggcgtcgtt tcgccctctc catgcttttt tgcaggggga 3540  
 gtgcgagatg ctcgctgccg agccgccggg acacggcacg aatcaaactg cagccattga 3600  
 ggatctcgaa gagctgacgg atttgtacaa gcaagaactg aaccttcgcc ctgatcggcc 3660  
 gtttgtgctg ttcggacaca gtatgggagg aatgatcacc ttcaggctgg cgcaaaagct 3720  
 tgagcgtgaa ggcacttttc cgcaggcggg tatcatttct gcaatccagc cgctcatat 3780  
 tcagcggaaag aaagtgtccc acctgcctga tgatcagttt ctgatcata ttatccaatt 3840  
 aggcggaatg cccgcagagc ttgttgaaaa taaggaggtc atgtcctttt tcctgccttc 3900  
 tttccgatca gattaccggg ctcttgaaca atttgagctt tacgatctgg cccagatcca 3960  
 gtcgcctggt catgtcttta acgggcttga tgataaaaaa tgcatacgag atgcggaagg 4020  
 gtggaagaag tgggcaaaag acatcacatt ccatcaattt gacggcgggc acatgttctt 4080  
 gctgtcacia acggaagaag tcgcagaacg gatttttgcg atcttgaatc agcatccgat 4140  
 cattcaaccg g 4151

<210> 14  
 <211> 5964  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Plásmido

10

<400> 14  
 tcgctgcttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60  
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcggc tcagcgggtg 120  
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180  
 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcagggccc 240  
 attcgcatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300  
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caagggcatt aagttgggta acgccagggt 360  
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgccaa gcttgcattg ctgcaggctc 420  
 acccgtatca aaatttagga ggtagtag aatgaaagaa gttgtaatag ctagtgcagt 480  
 aagaacagcg attggatctt atggaaagtc tcttaaggat gtaccagcag tagatttagg 540

ES 2 470 618 T3

agctacagct ataaaggaag cagttaaaaa agcaggaata aaaccagagg atgttaatga 600  
 agtcatttta ggaaatgttc ttcaagcagg tttaggacag aatccagcaa gacaggcatc 660  
 ttttaaagca ggattaccag ttgaaattcc agctatgact attaataagg tttgtggttc 720  
 aggacttaga acagttagct tagcagcaca aattataaaa gcaggagatg ctgacgtaat 780  
 aatagcaggt ggtatggaaa atatgtctag agctccttac ttagcgaata acgctagatg 840  
 gggatataga atgggaaacg ctaaatttgt tgatgaaatg atcactgacg gattgtggga 900  
 tgcatttaat gattaccaca tgggaataac agcagaaaac atagctgaga gatggaacat 960  
 ttcaagagaa gaacaagatg agtttgctct tgcatcacia aaaaaagctg aagaagctat 1020  
 aaaatcaggt caatttaaag atgaaatagt tcctgtagta attaaaggca gaaagggaga 1080  
 aactgtagtt gatacagatg agcaccctag atttggatca actatagaag gacttgcaaa 1140  
 attaaaacct gccttcaaaa aagatggaac agttacagct ggtaatgcat caggattaa 1200  
 tgactgtgca gcagtacttg taatcatgag tgcagaaaaa gctaaagagc ttggagtaaa 1260  
 accacttgct aagatagttt cttatggttc agcaggagtt gaccagcaa taatgggata 1320  
 tggacctttc tatgcaacia aagcagctat tgaaaaagca ggttggacag ttgatgaatt 1380  
 agatttaata gaatcaaatg aagcttttgc agctcaaagt ttagcagtag caaaagattt 1440  
 aaaatttgat atgaataaag taaatgtaa tggaggaget attgcccttg gtcaccaat 1500  
 tggagcatca ggtgcaagaa tactcgttac tcttgtacac gcaatgcaaa aaagagatgc 1560  
 aaaaaaaggc ttagcaactt tatgtatagg tggcggacaa ggaacagcaa tattgctaga 1620  
 aaagtgctag aaaggatcca aatgaactct aaaataatta gatttgaaaa ttaagggtca 1680  
 ttctttaaag atgggatgac aattatgatt ggaggttttt taaactgtgg cactccaacc 1740  
 aaattaattg attttttagt taatttaaat ataaagaatt taacgattat aagtaatgat 1800  
 acatgttatc ctaatacagg tattggtaag ttaatatcaa ataatacagt aaaaaagctt 1860  
 attgcttcat atataggcag caaccagat actggcaaaa aactttttaa taatgaactt 1920  
 gaagtagagc tctctcccca aggaactcta gtggaaagaa tacgtgcagg cggatctggc 1980  
 ttaggtggtg tactaactaa aacaggttta ggaactttga ttgaaaaagg aaagaaaaaa 2040  
 atatctataa atggaacgga atatttgta gagctacctc ttacagccga tgtagcatta 2100  
 attaaaggta gtattgtaga tgaggccgga aacaccttct ataaaggtag tactaaaaac 2160  
 tttaatccct atatggcaat ggcagctaaa accgtaatag ttgaagctga aaatttagtt 2220  
 agctgtgaaa aactagaaaa ggaaaaagca atgacccccg gagttcttat aaattatata 2280  
 gtaaaggagc ctgcataaaa tgattaatga taaaaccta gcgaaagaaa taatagccaa 2340  
 aagagttgca agagaattaa aaaatgggtca acttgtaaac ttaggtgtag gtcttctac 2400  
 catggttgca gattatatac caaaaaattt caaaattact ttccaatcag aaaacggaat 2460  
 agttggaatg ggcgctagtc ctaaaataaa tgaggcagat aaagatgtag taaatgcagg 2520  
 aggagactat acaacagtac ttctgacgg cacatthttc gatagctcag tttcgthttc 2580  
 actaatccgt ggtggtcacg tagatgttac tgttttaggg gctctccagg tagatgaaaa 2640

ES 2 470 618 T3

gggtaatata gcccaattgga ttgttcctgg aaaaatgctc tctgggatgg gtggagctat 2700  
 ggatttagta aatggagcta agaaagtaat aattgcaatg agacatacaa ataaagggtca 2760  
 acctaaaatt ttaaaaaaat gtacacttcc cctcacggca aagtctcaag caaatctaata 2820  
 tgtaacagaa cttggagtaa ttgaggttat taatgatggg ttacttctca ctgaaattaa 2880  
 taaaaacaca accattgatg aaataaggtc ttttaactgct gcagatttac tcatatccaa 2940  
 tgaacttaga cccatggctg ttttaggtacc ttttatgtta aaggatgaag taattaaaca 3000  
 aattagcagc ccattaactt cgcctgcatt tcctagagga ccctataaat ttcataatcg 3060  
 tgagtatttt aacattgtat atcgtacaga tatggatgca cttcgtaaag ttgtgccaga 3120  
 gcctttagaa attgatgagc ccttagtcag gtttgaaatt atggcaatgc atgatacgag 3180  
 tggacttggg tgttatacag aaagcggaca ggctattccc gtaagcttta atggagttaa 3240  
 gggagattat cttcatatga tgtatttaga taatgagcct gcaattgcag taggaaggga 3300  
 attaagtga taccctaaaa agctcgggta tccaaagctt tttgtggatt cagatacttt 3360  
 agtaggaact ttagactatg gaaaacttag agttgcgaca gctacaatgg ggtacaaaca 3420  
 taaagcctta gatgctaag aagcaaagga tcaaatttgt cgcctaatt atatgttgaa 3480  
 aataatacc aattatgatg gaagccctag aatatgtgag cttataaatg cgaaaatcac 3540  
 agatgttacc gtacatgaag cttggacagg accaactcga ctgcagttat ttgatcacgc 3600  
 tatggcgcca cttaatgatt tgccagtaaa agagattggt tctagctctc acattcttgc 3660  
 agatataata ttgcctagag ctgaagtat atatgattat cttaaagtaat aaaaataaga 3720  
 gttacctgaa ttcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca 3780  
 caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagag 3840  
 tgagctaact cacattaatt gcgttgcgt cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt 3900  
 cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc 3960  
 gctcttccgc ttctcgtctc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg 4020  
 tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa 4080  
 agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaggcc gcgttgctgg 4140  
 cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga 4200  
 ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg 4260  
 tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctccctcgg 4320  
 gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc 4380  
 gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 4440  
 gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca 4500  
 ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtgg 4560  
 ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag 4620  
 ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaccacc gctggtagcg 4680

ES 2 470 618 T3

gtggTTTTTT tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc 4740  
 ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggAACGA aaactcacgt taagggattt 4800  
 tggTcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt 4860  
 ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggTctga cagttaccaA tgcttaatca 4920  
 gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg 4980  
 tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac 5040  
 cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaagg 5100  
 ccgagcgcag aagtggTcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgTtgcc 5160  
 gggAagctag agtaagtagt tcgccagttA atagtttgcg caacgTtgTt gccattgcta 5220  
 caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac 5280  
 gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggTtagc tccttcggtc 5340  
 ctccgatcgt tgtcagaagt aagtTggccg cagtgttatc actcatggTt atggcagcac 5400  
 tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact 5460  
 caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgTcaa 5520  
 tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgTt 5580  
 cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagTtcg atgtaacceA 5640  
 ctctgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggTgagcaa 5700  
 aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac 5760  
 tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca gggTtattgt ctcatgagcg 5820  
 gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata acaaatagg ggttccgcgc acatttcccc 5880  
 gaaaagtgcc acctgacgTc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaaa 5940  
 ggcgtatcac gaggcccttt cgTc 5964

<210> 15  
 <211> 7849  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Plásmido

10

<400> 15  
 aactacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt 60  
 ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata 120  
 atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt 180  
 tgcggcattt tgccttctg tttttgctca ccagaaaacg ctggTgaaag taaaagatgc 240  
 tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat 300  
 ccttgagagt tttcggccccg aagaacgttC tccaatgatg agcactttta aagtTctgct 360  
 atgtggcgcg gtattatccc gtgttgacgc cgggcaagag caactcggTc gccgcataca 420  
 ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcattc ttacggatgg 480

ES 2 470 618 T3

catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 540  
 cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 600  
 ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 660  
 cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 720  
 cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 780  
 tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 840  
 agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 900  
 ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 960  
 gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 1020  
 atatatactt tagattgatt taccocgggt gataatcaga aaagcccca aaacaggaag 1080  
 attgtataag caaatattta aattgtaaac gttaatattt tgttaaaatt cgcgttaaat 1140  
 ttttgtaaa tcagctcatt ttttaacca taggccgaaa tcggcaaat cccttataaa 1200  
 tcaaaagaat agcccagat agggttgagt gttgttccag tttggaaca gagtccacta 1260  
 ttaaagaacg tggactccaa cgtcaaagg cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggccca 1320  
 ctacgtgaac catcacccaa atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat 1380  
 cggaacccta aaggagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg 1440  
 agaaaggaag ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc 1500  
 acgctgcgcg taaccaccac acccgccgcg cttaatgcmc cgctacaggg cgcgtaaaag 1560  
 gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa atccctaac gtgagttttc 1620  
 gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt 1680  
 tctgcgctga atctgctgct tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt 1740  
 gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 1800  
 accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 1860  
 accgcctaca tacctcgtc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa 1920  
 gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 1980  
 ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag 2040  
 atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggccggacag 2100  
 gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa 2160  
 cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 2220  
 gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg 2280  
 gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcttat ccctgatctc 2340  
 tgtggataac cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcggcgca gccgaacgac 2400  
 cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg 2460  
 atgccgcata gtttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc 2520



ES 2 470 618 T3

gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc 2580  
 cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcacctgc 2640  
 atcaccgaaa cgcgcgaggg agctgaggta aagctcatca gcgtggtcgt gcagcgattc 2700  
 acagatgtct gcctgttcat ccgctgccag ctctgtgagt ttctccagaa gcgttaatgt 2760  
 ctggcttctg ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttg tcaactgatgc 2820  
 ctccgtgtaa gggggatttc tgttcatggg ggtaatgata ccgatgaaac gagagaggat 2880  
 gctcacgata cgggttactg atgatgaaca tgcccggtta ctggaacgtt gtgagggtaa 2940  
 acaactggcg gtatggatgc ggcgggacca gagaaaaatc actcagggtc aatgccagcc 3000  
 gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc ggccgccatg ccggcgataa tggcctgctt 3060  
 ctgccgaaa cgtttggtgg cgggaccagt gacgaaggct tgagcgaggg cgtgcaagat 3120  
 tccgaatacc gcaagcgaca ggccgatcat cgtcgcgctc cagcgaaagc ggtcctcgcc 3180  
 gaaaatgacc cagagcgtg ccggcacctg tcctacgagt tgcatgataa agaagacagt 3240  
 cataagtgcg gcgacgatag tcatgccccg cgcccaccgg aaggagctga ctgggttgaa 3300  
 ggctctcaag ggcacggtc gagatccccg tgcctaata gaagagctaac ttacattaat 3360  
 tgcgttgccg tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg 3420  
 aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgccagggtg gtttttcttt 3480  
 tcaccagtga gacgggcaac agctgattgc cttcacctgc ctggccctga gagagttgca 3540  
 gcaagcggtc cacgctgggt tgccccagca ggcgaaaatc ctgtttgatg gtggttaacg 3600  
 gcgggatata acatgagctg tcttcggat cgtcgtatcc cactaccgag atatccgcac 3660  
 caacgcgcag cccggactcg gtaatggcg gcattgcgcc cagcggccatc tgatcgttgg 3720  
 caaccagcat cgcagtggga acgatgccct cattcagcat ttgcatggtt tgttgaaaac 3780  
 cggacatggc actccagtcg ctttcccgtt ccgctatcgg ctgaatttga ttgagagtg 3840  
 gatatttatg ccagccagcc agacgcagac gcgccgagac agaacttaat gggcccgcta 3900  
 acagcgcgat ttgctgggta cccaatgcga ccagatgctc cacgcccagt cgcgtaccgt 3960  
 cttcatggga gaaaataata ctggtgatgg gtgtctggtc agagacatca agaaataacg 4020  
 ccggaacatt agtgcaggca gcttccacag caatggcatc ctggatcatc agcggatagt 4080  
 taatgatcag cccactgacg cgttgcgcga gaagattgtg caccgcccgt ttacaggctt 4140  
 cgacgccgct tcgttctacc atcgacacca ccacgctggc acccagttga tcggcgcgag 4200  
 atttaatcgc cgcgacaatt tgcgacggcg cgtgcagggc cagactggag gtggcaacgc 4260  
 caatcagcaa cgactgtttg cccgccagtt gttgtgccac gcggttggga atgtaattca 4320  
 gctccgccat cgccgcttcc actttttccc gcgttttcgc agaaacgtgg ctggcctggt 4380  
 tcaccacgcg ggaacggtc tgataagaga caccggcata ctctgcgaca tcgtataacg 4440  
 ttactggttt cacattcacc accctgaatt gactctcttc cgggcgctat catgccatac 4500  
 cgcgaaaggt tttgcgccat tcgatggtgt ccgggatctc gacgctctcc cttatgcgac 4560  
 tectgcatta ggaageagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc cgccgcaagg 4620

aatggtgcat	gccggcatgc	cgccctttcg	tcttcaagaa	ttaattccca	attccccag	4680
catcaaataa	aacgaaaggc	tcagtcgaaa	gactgggcct	ttcgttttat	ctgttgtttg	4740
tcggtgaacg	ctctcctgag	taggacaaat	ccgccgggag	cggatttgaa	cgttgcaag	4800
caacggcccg	gaggggtggc	ggcaggacgc	ccgccataaa	ctgccaggaa	ttaattcccc	4860
aggcatcaaa	taaaacgaaa	ggctcagtcg	aaagactggg	cctttcgttt	tatctgttgt	4920
ttgtcgggta	acgctctcct	gagtaggaca	aatccgccgg	gagcggattt	gaacgttgcg	4980
aagcaacggc	ccggaggggtg	gcgggcagga	cgcccgccat	aaactgccag	gaattaattc	5040
cccaggcatc	aaataaaaac	aaaggctcag	tcgaaagact	gggcctttcg	ttttatctgt	5100
tgtttgtcgg	tgaacgctct	cctgagtagg	acaaatccgc	cgggagcggg	tttgaacggt	5160
gcgaagcaac	ggcccggagg	gtggcgggca	ggacgcccgc	cataaactgc	caggaattaa	5220
ttccccaggc	atcaataaaa	acgaaaggct	cagtcgaaa	actgggcctt	tcgttttatc	5280
tgttgtttgt	cggtgaacgc	tctcctgagt	aggacaaatc	cgccgggagc	ggatttgaac	5340
gttgcaagc	aacggcccgg	aggggtggcg	gcaggacgcc	cgccataaac	tgccaggaat	5400
taattcccca	ggcatcaaat	aaaacgaaa	gctcagtcga	aagactgggc	ctttcgtttt	5460
atctgttgtt	tgctcgtgaa	cgctctcctg	agtaggacaa	atccgccggg	agcggatttg	5520
aacgttgca	agcaacggcc	cggaggggtg	cgggcaggac	gcccgccata	aactgccagg	5580
aattggggat	cggaattaat	tcccggttta	aaccggggat	ctcgatccc	cgaaattaat	5640
acgactcact	ataggggaat	tgtgagcggg	taacaattcc	cctctagaaa	taattttgtt	5700
taactttaag	aaggagatat	acatatgttg	gataatggct	tttcttttcc	tgttcgtgtg	5760
tattatgaag	atactgatgc	aggtggcgta	gtgtatcacg	ctcgtatatt	gcattttttt	5820
gaacgagcaa	gaacagaata	tttgcgtaca	ttaaatttta	cgcaacaaac	cttactagag	5880
gaacaacaac	tcgcatttgt	tgtcaaaaac	ctcgccattg	attattgcgt	ggcagcaaaa	5940
ttggatgatt	tacttatggt	ggaaacagag	gtttcagaag	taaaaggggc	tacaatcctt	6000
tttgaacaga	gactgatgcg	caacaccctg	atgttatcaa	aggctactgt	taaggtagcc	6060
tgtgttgatc	taggcaagat	gaaaccagtg	gcgtttccca	aagaagttaa	agcggcgttt	6120
catcacttaa	aactcgaggg	ctcttctctg	tttgccaagg	gtaccaatgt	tttaatggcg	6180
gatgggtcta	ttgaatgtat	tgaaaacatt	gaggttggtg	ataaggatcat	gggtaaagat	6240
ggcagacctc	gtgaggtaat	taaattgccc	agaggaagag	aaactatgta	cagcgtcgtg	6300
cagaaaagtc	agcacagagc	ccacaaaagt	gactcaagtc	gtgaagtgcc	agaattactc	6360
aagtttacgt	gtaatgcgac	ccatgagttg	gttgtagaaa	cacctcgtag	tgtccgccgt	6420
ttgtctcgta	ccattaaggg	tgtcgaatat	tttgaagtta	ttacttttga	gatgggcca	6480
aagaaagccc	ccgacggtag	aattgttgag	cttgtcaagg	aagtttcaaa	gagctaccca	6540
atatctgagg	ggcctgagag	agccaacgaa	ttagtagaat	cctatagaaa	ggcttcaaat	6600
aaagcttatt	ttgagtggac	tattgaggcc	agagatcttt	ctctgttggg	ttcccatggt	6660

ES 2 470 618 T3

cgtaaagcta cctaccagac ttacgctcca attctttatg agaatgacca ctttttcgac 6720  
 tacatgcaaa aaagtaagtt tcatctcacc attgaaggtc caaaagtact tgcttattta 6780  
 cttggtttat ggattggtga tggattgtct gacagggcaa ctttttcggt tgattccaga 6840  
 gatacttctt tgatggaacg tgttactgaa tatgctgaaa agttgaattt gtgcgccgag 6900  
 tataaggaca gaaaagaacc acaagttgcc aaaactgtta atttgtactc taaagttgtc 6960  
 agaggaatg gtattcgcaa taatcttaat actgagaatc cattatggga cgctattggt 7020  
 ggcttaggat tcttgaagga cgggtgcaaa aatattcctt ctttcttgtc tacggacaat 7080  
 atcggctactc gtgaaacatt tcttgctggt ctaattgatt ctgatggcta tgttactgat 7140  
 gagcatggtg ttaaagcaac aataaagaca attcatactt ctgtcagaga tggtttggtt 7200  
 tcccttgctc gttcttttagg cttagtagtc tccggttaacg cagaacctgc taaggttgac 7260  
 atgaatgtca ccaaacataa aattagttat gctatttata tgtctggtgg agatgttttg 7320  
 cttaacgttc tttcgaagtg fgccggctct aaaaaattca ggctgctcc cgccgctgct 7380  
 tttgcacgtg agtgccgagg attttatttc gagttacaag aattgaagga agacgattat 7440  
 tatgggatta ctttatctga tgattctgat catcagtttt tgcttggatc ccaggttgct 7500  
 gtccatgcat gcggtggcct gaccggtctg aactcaggcc tcacgacaaa tcctggtgta 7560  
 tccgcttggc aggtcaacac agcttatact gcgggacaat tggtcacata taacggcaag 7620  
 acgtataaat gtttcagacc ccacacctc ttggcaggat gggaacctc caacgttcct 7680  
 gccttggtggc agcttcaatg actgcaggaa ggggatccgg ctgctaacaa agcccgaag 7740  
 gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag caataactag cataaccctc tggggcctct 7800  
 aaacgggtct tgaggggttt tttgctgaaa ggaggaacta tatccggat 7849

<210> 16

<211> 392

<212> PRT

5 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 16

Met Lys Glu Val Val Ile Ala Ser Ala Val Arg Thr Ala Ile Gly Ser  
 1 5 10 15

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

Ala Ile Lys Glu Ala Val Lys Lys Ala Gly Ile Lys Pro Glu Asp Val  
 35 40 45

Asn Glu Val Ile Leu Gly Asn Val Leu Gln Ala Gly Leu Gly Gln Asn  
 50 55 60

Pro Ala Arg Gln Ala Ser Phe Lys Ala Gly Leu Pro Val Glu Ile Pro  
 65 70 75 80

Ala Met Thr Ile Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Arg Thr Val Ser

ES 2 470 618 T3

					85						90						95
Leu	Ala	Ala	Gln	Ile	Ile	Lys	Ala	Gly	Asp	Ala	Asp	Val	Ile	Ile	Ala		
			100					105					110				
Gly	Gly	Met	Glu	Asn	Met	Ser	Arg	Ala	Pro	Tyr	Leu	Ala	Asn	Asn	Ala		
		115					120					125					
Arg	Trp	Gly	Tyr	Arg	Met	Gly	Asn	Ala	Lys	Phe	Val	Asp	Glu	Met	Ile		
	130					135					140						
Thr	Asp	Gly	Leu	Trp	Asp	Ala	Phe	Asn	Asp	Tyr	His	Met	Gly	Ile	Thr		
145					150					155					160		
Ala	Glu	Asn	Ile	Ala	Glu	Arg	Trp	Asn	Ile	Ser	Arg	Glu	Glu	Gln	Asp		
				165					170					175			
Glu	Phe	Ala	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Lys	Ala	Glu	Glu	Ala	Ile	Lys	Ser		
			180					185					190				
Gly	Gln	Phe	Lys	Asp	Glu	Ile	Val	Pro	Val	Val	Ile	Lys	Gly	Arg	Lys		
		195					200					205					
Gly	Glu	Thr	Val	Val	Asp	Thr	Asp	Glu	His	Pro	Arg	Phe	Gly	Ser	Thr		
	210					215					220						
Ile	Glu	Gly	Leu	Ala	Lys	Leu	Lys	Pro	Ala	Phe	Lys	Lys	Asp	Gly	Thr		
225					230					235					240		
Val	Thr	Ala	Gly	Asn	Ala	Ser	Gly	Leu	Asn	Asp	Cys	Ala	Ala	Val	Leu		
				245					250					255			
Val	Ile	Met	Ser	Ala	Glu	Lys	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly	Val	Lys	Pro	Leu		
			260					265					270				
Ala	Lys	Ile	Val	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Gly	Val	Asp	Pro	Ala	Ile	Met		
		275					280					285					
Gly	Tyr	Gly	Pro	Phe	Tyr	Ala	Thr	Lys	Ala	Ala	Ile	Glu	Lys	Ala	Gly		
	290					295					300						
Trp	Thr	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Leu	Ile	Glu	Ser	Asn	Glu	Ala	Phe	Ala		
305					310					315					320		
Ala	Gln	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Lys	Asp	Leu	Lys	Phe	Asp	Met	Asn	Lys		
				325					330					335			
Val	Asn	Val	Asn	Gly	Gly	Ala	Ile	Ala	Leu	Gly	His	Pro	Ile	Gly	Ala		
			340					345					350				
Ser	Gly	Ala	Arg	Ile	Leu	Val	Thr	Leu	Val	His	Ala	Met	Gln	Lys	Arg		
		355					360					365					

ES 2 470 618 T3

Asp Ala Lys Lys Gly Leu Ala Thr Leu Cys Ile Gly Gly Gly Gln Gly  
 370 375 380

Thr Ala Ile Leu Leu Glu Lys Cys  
 385 390

<210> 17  
 <211> 1179  
 <212> ADN

5 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 17

atgaaagaag ttgtaatagc tagtgcagta agaacagcga ttggatctta tggaaagtct 60  
 cttaggatg taccagcagt agatttagga gctacagcta taaaggaagc agttaaaaa 120  
 gcaggaataa aaccagagga tgtaatgaa gtcatttag gaaatgttct tcaagcaggt 180  
 ttaggacaga atccagcaag acaggcattct tttaaagcag gattaccagt tgaattcca 240  
 gctatgacta ttaataaggt ttgtggttca ggacttagaa cagttagctt agcagcacia 300  
 attataaaag caggagatgc tgacgtaata atagcaggtg gtatggaaaa tatgtctaga 360  
 gctccttact tagcgaataa cgctagatgg ggatatagaa tgggaaacgc taaatttggt 420  
 gatgaaatga tcaactgacgg attgtgggat gcatttaatg attaccacat gggaaataca 480  
 gcagaaaaca tagctgagag atggaacatt tcaagagaag aacaagatga gtttgctctt 540  
 gcatcaciaa aaaaagctga agaagctata aaatcaggtc aatttaaaga tgaatatggt 600  
 cctgtagtaa ttaaaggcag aaagggagaa actgtagttg atacagatga gcaccctaga 660  
 tttggatcaa ctatagaagg acttgcaaaa taaaacctg ccttcaaaaa agatggaaca 720  
 gttacagctg gtaatgcatc aggattaaat gactgtgcag cagtacttgt aatcatgagt 780  
 gcagaaaaag ctaaagagct tggagtaaaa ccacttgcta agatagtttc ttatggttca 840  
 gcaggagttg acccagcaat aatgggatat ggaccttct atgcaacaaa agcagctatt 900  
 gaaaaagcag gttggacagt tgatgaatta gatttaatag aatcaaatga agcttttgca 960  
 gctcaaagtt tagcagtagc aaaagattta aaatttgata tgaataaagt aaatgtaaat 1020  
 ggaggagcta ttgcccttgg tcatccaatt ggagcatcag gtgcaagaat actcgttact 1080  
 cttgtacacg caatgcaaaa aagagatgca aaaaaggct tagcaacttt atgtataggt 1140  
 ggcgacaag gaacagcaat attgctagaa aagtgctag 1179

<210> 18  
 <211> 244  
 <212> PRT

10 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 18

Met Leu Lys Asp Glu Val Ile Lys Gln Ile Ser Thr Pro Leu Thr Ser  
 1 5 10 15

15 Pro Ala Phe Pro Arg Gly Pro Tyr Lys Phe His Asn Arg Glu Tyr Phe

ES 2 470 618 T3

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

Asp Tyr Leu Lys

<210> 19

<211> 735

<212> ADN

5 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 19

atgttaaagg atgaagtaat taaacaaatt agcacgccat taacttcgcc tgcatttcct 60

agaggaccct ataaatttca taatcgtgag tattttaaca ttgtatatcg tacagatatg 120

gatgcacttc gtaaagttgt gccagagcct ttagaaattg atgagccctt agtcaggttt 180  
 gaaattatgg caatgcatga tacgagtgga cttggttggt atacagaaag cggacaggct 240  
 attcccgtaa gctttaatgg agttaaggga gattatcttc atatgatgta tttagataat. 300  
 gagcctgcaa ttgcagtagg aagggaatta agtgcataat ctaaaaagct cgggtatcca 360  
 aagctttttg tggattcaga tacttttagta ggaactttag actatggaaa acttagagtt 420  
 gcgacagcta caatggggta caaacataaa gccttagatg ctaatgaagc aaaggatcaa 480  
 atttgtcgcc ctaattatat gttgaaaata ataccaatt atgatggaag ccctagaata 540  
 tgtgagctta taaatgcaa aatcacagat gttaccgtac atgaagcttg gacaggacca 600  
 actcgactgc agttatttga tcacgctatg gcgccactta atgatttgcc agtaaaagag 660  
 attgtttcta gctctcacat tcttgcagat ataatttgc ctagagctga agttatatat 720  
 gattatctta agtaa 735

<210> 20  
 <211> 4616  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Plásmido

10

<400> 20  
 gcgcccgaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttgccg attcattaat gcagctggca 60  
 cgacaggttt cccgactgga aagcgggag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120  
 cactcattag gcaccccagg ctttacctt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180  
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagctcta 240  
 atacgactca ctatagggaa agctcggtag cacgcatgct gcagacgcgt tacgtatcgg 300  
 atccagaatt cgtgatggaa ggtaccttt atgttaaagg atgaagtaat taaacaatt 360  
 agcagccat taacttcgcc tgcatttct agaggáccct ataaatttca taatcgtgag 420  
 tattttaaca ttgtatatcg tacagatatg gatgcacttc gtaaagttgt gccagagcct 480  
 ttagaaattg atgagccctt agtcaggttt gaaattatgg caatgcatga tacgagtgga 540  
 cttggttggt atacagaaag cggacaggct attcccgtaa gctttaatgg agttaaggga 600  
 gattatcttc atatgatgta tttagataat gagcctgcaa ttgcagtagg aagggaatta 660  
 agtgcataat ctaaaaagct cgggtatcca aagctttttg tggattcaga tacttttagta 720  
 ggaactttag actatggaaa acttagagtt gcgacagcta caatggggta caaacataaa 780  
 gccttagatg ctaatgaagc aaaggatcaa atttgtcgcc ctaattatat gttgaaaata 840  
 ataccaatt atgatggaag ccctagaata tgtgagctta taaatgcaa aatcacagat 900  
 gttaccgtac atgaagcttg gacaggacca actcgactgc agttatttga tcacgctatg 960  
 gcgccactta atgatttgcc agtaaaagag attgtttcta gctctcacat tcttgcagat 1020  
 ataatttgc ctagagctga agttatatat gattatctta agtaatagaa ttcagagtta 1080  
 catctgaatt cgtcgacaag cttctcgagc ctaggctagc tctagaccac acgtgtgggg 1140

ES 2 470 618 T3

gcccgagctc gcggccgctg tattctatag tgtcacctaa atggccgcac aattcactgg 1200  
 ccgctcgtttt acaacgctcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccttg 1260  
 cagcacatcc ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggccccgacc gatcgcctt 1320  
 cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggaaattgta agcgttaata ttttgtaaa 1380  
 attcgcgtta aatttttggt aatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa 1440  
 aatcccttat aatcaaaaag aatagaccga gataggggtg agtgttggtc cagtttgaa 1500  
 caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 1560  
 gggcgatggc cactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggt cgaggtgccg 1620  
 taaagcacta aatcgggaacc ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 1680  
 ggcgaacgtg gcgagaaaag aaggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 1740  
 aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca 1800  
 gggcgcgta ggtggcactt ttcgggaaa tgtgcgcgga acccctattt gttatTTTT 1860  
 ctaaatacat tcaaataatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata 1920  
 atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttccctttt 1980  
 tgcggcattt tgccttcctg ttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 2040  
 tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtgaagat 2100  
 ccttgagagt tttcggcccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 2160  
 atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgataca 2220  
 ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 2280  
 catgacagta agagaattat gcagtgtcgc cataaccatg agtgataaca ctgcgccaa 2340  
 ctacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 2400  
 ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 2460  
 cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 2520  
 cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 2580  
 tgcaggacca cttctgcgct cggcccttc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 2640  
 agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 2700  
 ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 2760  
 gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 2820  
 atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 2880  
 cctttttgat aatctcatga acaataaaac tgtctgctta cataaacagt aatacaaggg 2940  
 gtgttatgag ccatattcaa cgggaaacgt cttgctctag gccgcgatta aattccaaca 3000  
 tggatgctga tttatatggg tataaatggg ctccgcgataa tgtcgggcaa tcaggtgcga 3060  
 caatctatcg attgtatggg aagcccgatg cgccagagtt gtttctgaaa catggcaaag 3120  
 gtagcgttgc caatgatggt acagatgaga tggtcagact aaactggctg acggaattta 3180



ES 2 470 618 T3

tgctcttcc gaccatcaag cattttatcc gtactcctga tgatgcatgg ttactcacca 3240  
 ctgcatccc cgggaaaaca gcattccagg tattagaaga atatcctgat tcaggtgaaa 3300  
 atattggtga tgcgctggca gtgttcctgc gccggttgca ttcgattcct gtttgtaatt 3360  
 gtccttttaa cagcgatcgc gtatttcgctc tcgctcaggc gcaatcacga atgaataacg 3420  
 gtttggttga tgcgagtgat tttgatgacg agcgtaatgg ctggcctggt gaacaagtct 3480  
 ggaaagaaat gcataaactt ttgccattct caccggattc agtcgctact catggtgatt 3540  
 tctcacttga taaccttatt tttgacgagg ggaaattaat aggttgatt gatggtggac 3600  
 gagtcggaat cgcagaccga taccaggatc ttgccatcct atggaactgc ctcggtgagt 3660  
 tttctccttc attacagaaa cggctttttc aaaaatatgg tattgataat cctgatatga 3720  
 ataaattgca gtttcatttg atgctcgatg agtttttcta agaattaatt catgacccaaa 3780  
 atccctaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3840  
 tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3900  
 ctaccagcgg tggtttgtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3960  
 ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 4020  
 cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatect gttaccagtg 4080  
 gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg atagttaccg 4140  
 gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 4200  
 acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc 4260  
 gaagggagaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 4320  
 agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 4380  
 tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 4440  
 agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt 4500  
 cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc 4560  
 gctcgcgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaaga 4616

<210> 21  
 <211> 5098  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Plásmido

10

<400> 21  
 gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcggtggccg attcattaat gcagctggca 60  
 cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120  
 cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180  
 tgtgagcggg taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagctcta 240  
 atacgactca ctatagggaa agctcgggtac cacgcatgct gcagacgcgt tacgtatcgg 300  
 atccagaatt cgtgatgggt tatctgtcga cccgatcaa aatttaggag gttagttaga 360

ES 2 470 618 T3

atgaaagaag ttgtaatagc tagtgcagta agaacagcga ttggatctta tggaaagtct 420  
 ctaaggatg taccagcagt agatttagga gctacagcta taaaggaagc agttaaaaaa 480  
 gcaggaataa aaccagagga tgtaaatgaa gtcattttag gaaatgttct tcaagcaggt 540  
 ttaggacaga atccagcaag acaggcatct tttaaagcag gattaccagt tgaattcca 600  
 gctatgacta ttaataaggt ttgtggttca ggacttagaa cagttagctt agcagcacia 660  
 attataaaag caggagatgc tgacgtaata atagcaggtg gtatggaaa tatgtctaga 720  
 gctccttact tagcgaataa cgctagatgg ggatatagaa tgggaaacgc taaatttggt 780  
 gatgaaatga tcaactgacgg attgtgggat gcatttaatg attaccacat gggaaataca 840  
 gcagaaaaca tagctgagag atggaacatt tcaagagaag aacaagatga gtttgctctt 900  
 gcatcaciaa aaaaagctga agaagctata aaatcaggtc aatttaaaga tgaatagtt 960  
 cctgtagtaa ttaaaggcag aaagggagaa actgtagttg atacagatga gcaccctaga 1020  
 tttggatcaa ctatagaagg acttgcaaaa ttaaacctg ccttcaaaa agatggaaca 1080  
 gttacagctg gtaatgcac aggattaaat gactgtgcag cagtacttgt aatcatgagt 1140  
 gcagaaaag ctaaagagct tggagtaaaa ccacttgcta agatagtttc ttatggttca 1200  
 gcaggagtg acccagcaat aatgggatat ggaccttct atgcaaaaa agcagctatt 1260  
 gaaaaagcag gttggacagt tgatgaatta gatttaatat aatcaaatga agcttttgca 1320  
 gctcaaagtt tagcagtagc aaaagattta aaatttgata tgaataaagt aaatgtaaat 1380  
 ggaggagcta ttgcccttg tcatccaatt ggagcatcag gtgcaagaat actcgttact 1440  
 cttgtacacg caatgcaaaa aagagatgca aaaaaaggct tagcaacttt atgtataggt 1500  
 ggcggacaag gaacagcaat attgctagaa aagtgctaga aaggatcctt aaaaataact 1560  
 ctgatctgaa ttcgtcgaca agcttctcga gcctaggcta gctctagacc acacgtgtgg 1620  
 gggcccgagc tcgcccgcgc tgtattctat agtgtcacct aaatggccgc acaattcact 1680  
 ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttaccaac ttaatcgctt 1740  
 tgcagcacat cccccttctg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc 1800  
 ttccaacag ttgcccagcc tgaatggcga atggaaattg taagcgtaa tttttgtta 1860  
 aaattcgcgt taaatttttg ttaaatcagc tcatttttta accaataggc cgaaatcggc 1920  
 aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg 1980  
 aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat 2040  
 cagggcgatg gccactacg tgaacctca ccctaataca gtttttggg gtcgaggtgc 2100  
 cgtaaagcac taaatcgga ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaag 2160  
 ccggcgaacg tggcgagaaa ggaaggggag aaagcgaaa gagcgggcgc tagggcgctg 2220  
 gcaagtgtag cggtcacgct gcgctgaacc accacaccg ccgcttaaa tgcgccccta 2280  
 cagggcgctg caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttattt 2340  
 ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa 2400

ES 2 470 618 T3

taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tattcccttt 2460  
 tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat 2520  
 gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag 2580  
 atccttgaga gttttcgcgc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg 2640  
 ctatgtggcg cggtattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata 2700  
 cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat 2760  
 ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa cactgcgggc 2820  
 aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg 2880  
 ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac 2940  
 gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact 3000  
 ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa 3060  
 gttgcaggac cacttctgcg ctccggcctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct 3120  
 ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaaagccc 3180  
 tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga 3240  
 cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac 3300  
 tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggatgaag 3360  
 atcctttttg ataatctcat gaacaataaa actgtctgct tacataaaca gtaatacaag 3420  
 ggggtgttatg agccatattc aacgggaaac gtcttgctct aggccgcgat taaattccaa 3480  
 catggatgct gatttatatg ggtataaatg ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc 3540  
 gacaatctat cgattgtatg ggaagcccga tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa 3600  
 aggtagcgtt gccaatgatg ttacagatga gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt 3660  
 tatgcctctt ccgaccatca agcattttat ccgtactcct gatgatgcat ggttactcac 3720  
 cactgcgatc cccgggaaaa cagcattcca ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga 3780  
 aaatattggt gatgcgctgg cagtgttctt gcgccggtt cattcgattc ctgtttgtaa 3840  
 ttgtcctttt aacagcgatc gcgtatttct tctcgtctag gcgcaatcac gaatgaataa 3900  
 cggtttggtt gatgcgagtg attttgatga cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt 3960  
 ctggaaagaa atgcataaac ttttgccatt ctaccggat tcagtcgtca ctcatggtga 4020  
 tttctcactt gataacctta tttttgacga ggggaaatta ataggttgta ttgatgttgg 4080  
 acgagtcgga atcgcagacc gataccagga tcttgccatc ctatggaact gcctcggatg 4140  
 gttttctcct tcattacaga aacggctttt tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat 4200  
 gaataaattg cagtttcatt tgatgctcga tgagtttttc taagaattaa ttcatgacca 4260  
 aaatcccta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 4320  
 gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaccac 4380  
 cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa 4440  
 ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc 4500

ES 2 470 618 T3

accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaate	ctgttaccag	4560
tggctgctgc	cagtggcgat	aagtcgtgtc	ttaccgggtt	ggactcaaga	cgatagttac	4620
cggataaggc	gcagcggtcg	ggctgaacgg	ggggttcgtg	cacacagccc	agcttggagc	4680
gaacgacctt	caccgaactg	agatacctac	agcgtgagct	atgagaaagc	gccacgcttc	4740
ccgaagggag	aaaggcggac	aggtatccgg	taagcggcag	ggtcggaaca	ggagagcgca	4800
cgagggagct	tccaggggga	aacgcctggt	atctttatag	tctgtcggg	tttcgccacc	4860
tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	cgtcaggggg	gcgagaccta	tggaaaaacg	4920
ccagcaacgc	ggccttttta	cggttctctg	ccttttgctg	gccttttgct	cacatgttct	4980
ttcctgcggt	atcccctgat	tctgtggata	accgtattac	cgcttttgag	tgagctgata	5040
ccgctcgccg	cagccgaacg	accgagcgca	gcgagtcagt	gagcgaggaa	gcggaaga	5098

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de acetona partiendo de la acetil-Coenzima A, que comprende las etapas de:

- 5 A. una reacción enzimática de acetil-CoA para dar acetoacetil-CoA catalizada por una  $\beta$ -cetotiolasa  
 B. una reacción enzimática de acetoacetil-CoA para dar acetoacetato y CoA catalizada por una acetoacetato-CoA hidrolasa, una acil-CoA-tioesterasa, una acil-CoA sintetasa o una acil-CoA-tiocinasa  
 C. una descarboxilación de acetoacetato para dar acetona y CO<sub>2</sub>, catalizada por una acetoacetato descarboxilasa

10 caracterizado por que  
 en la etapa B de procedimiento, la coenzima A no es transferida a una molécula aceptora, y  
 la reacción enzimática en la etapa B de procedimiento es catalizada por un polipéptido con una actividad de acetoacetato-CoA hidrolasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica por lo menos en un 90 % a la  
 15 secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1, 3 ó 5.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1,  
 caracterizado por que

20 la reacción enzimática en la etapa A de procedimiento es catalizada por un polipéptido con una actividad de cetotiolasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica por lo menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 16.

3. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 o 2,  
 caracterizado por que

25 la reacción enzimática en la etapa C de procedimiento es catalizada por un polipéptido con una actividad de acetoacetato descarboxilasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica por lo menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 18.

4. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 hasta 3,  
 caracterizado por que

30 la reacción en la etapa C de procedimiento se efectúa espontáneamente.

5. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 hasta 4,  
 caracterizado por que

35 es llevado a cabo por medio de un microorganismo.

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5,  
 caracterizado por que

el microorganismo contiene por lo menos:

- 40 a un ácido nucleico que codifica proteicamente por lo menos un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2  
 y  
 b un ácido nucleico que codifica proteicamente el polipéptido con una actividad de acetoacetato-CoA hidrolasa y con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 90 % a la SEQ ID No. 1,  
 45 3 ó 5, y  
 c un ácido nucleico que codifica proteicamente por lo menos un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3  
 siendo utilizados los ácidos nucleicos a, b y c para asegurar la expresión del polipéptido en el microorganismo.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6,  
 caracterizado por que

50 el ácido nucleico a se escoge entre:

aa una secuencia de ADN descrita por la secuencia 17 o por su cadena complementaria,

bb unas secuencias de ADN, que se hibridan en condiciones rigurosas para dar las secuencias de ADN  
 descritas dentro de aa

55 cc unas secuencias de ADN, que sin la degradación del código genético se hibridarían para dar las secuencias de ADN definidas en aa y bb.

8. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 6 o 7,  
 caracterizado por que

el ácido nucleico c se escoge entre:

60 dd una secuencia de ADN descrita por la secuencia 19 o por su cadena complementaria,

ee unas secuencias de ADN, que se hibridan en condiciones rigurosas para dar las secuencias de ADN  
 descritas dentro de dd

ff unas secuencias de ADN, que sin la degradación del código genético se hibridarían para dar las secuencias de ADN descritas dentro de dd y ee.

65

9. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 6 hasta 8, caracterizado por que el ácido nucleico b se escoge entre:
- 5 gg una secuencia de ADN descrita por la secuencia 2 o por su cadena complementaria,  
 hh unas secuencias de ADN, que se hibridan en condiciones rigurosas para dar las secuencias de ADN descritas dentro de gg  
 ii unas secuencias de ADN, que sin la degradación del código genético se hibridarían para dar las secuencias de ADN descritas dentro de gg y hh.
- 10 10. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 6 hasta 8, caracterizado por que el ácido nucleico b se escoge entre:
- 15 jj una secuencia de ADN descrita por la secuencia 4 o por su cadena complementaria,  
 kk unas secuencias de ADN, que se hibridan en condiciones rigurosas para dar las secuencias de ADN descritas dentro de jj  
 ll unas secuencias de ADN, que sin la degradación del código genético se hibridarían para dar las secuencias de ADN descritas dentro de jj y kk.
- 20 11. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 6 hasta 8, caracterizado por que el ácido nucleico b se escoge entre:
- 25 mm una secuencia de ADN descrita por la secuencia 6 o por su cadena complementaria,  
 nn unas secuencias de ADN, que se hibridan en condiciones rigurosas para dar las secuencias de ADN descritas dentro de mm  
 oo unas secuencias de ADN, que sin la degradación del código genético se hibridarían para dar las secuencias de ADN descritas dentro de mm y nn.
- 30 12. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 6 hasta 11, estando situados los ácidos nucleicos a, b y c en una cadena de nucleótidos, y ésta se escoge entre el conjunto formado por:
- 35 el plásmido pSKatt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 7,  
 el plásmido pKSatt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 8,  
 el plásmido pUC19att, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 9,  
 el plásmido pUC18att, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No.10,  
 y el plásmido pUC19ayt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 11.
- 40 13. Ácido nucleico escogido entre el conjunto formado por:
- 45 el plásmido pSKatt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 7,  
 el plásmido pKSatt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 8,  
 el plásmido pUC19att, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 9,  
 el plásmido pUC18att, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No.10,  
 y el plásmido pUC19ayt, con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 11.

Figura 1

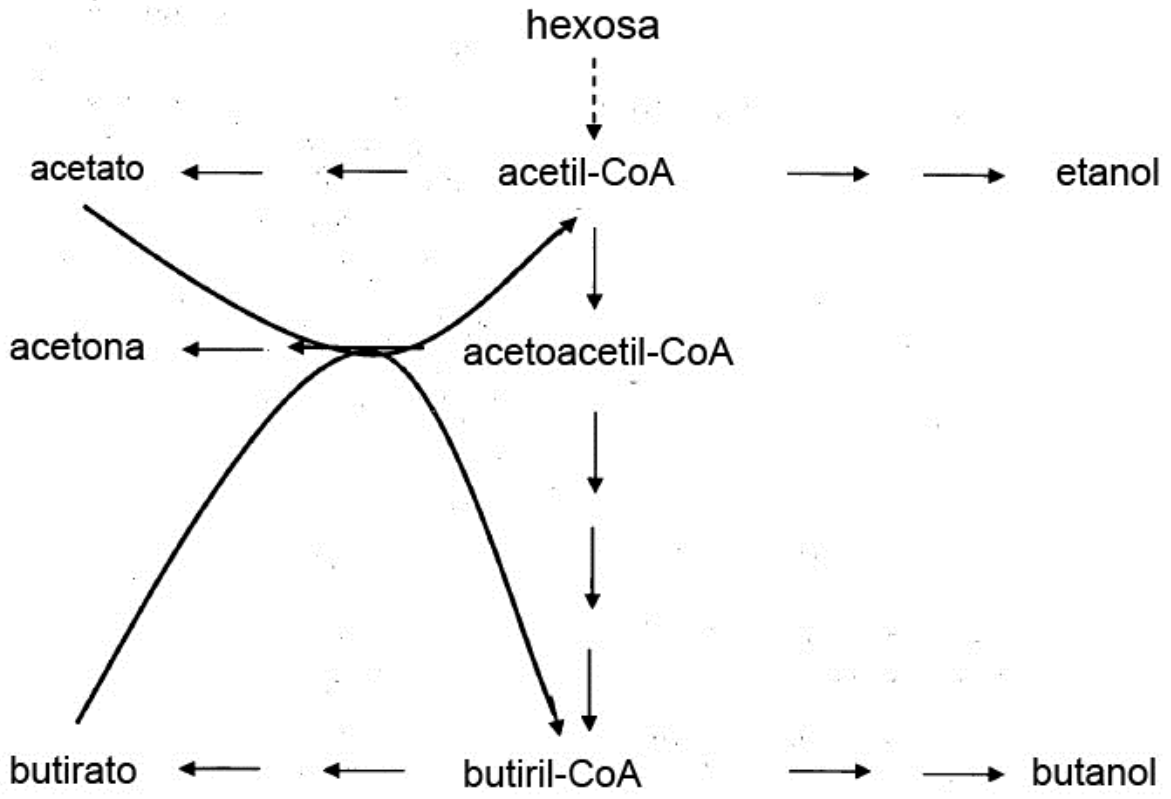


Figura 2

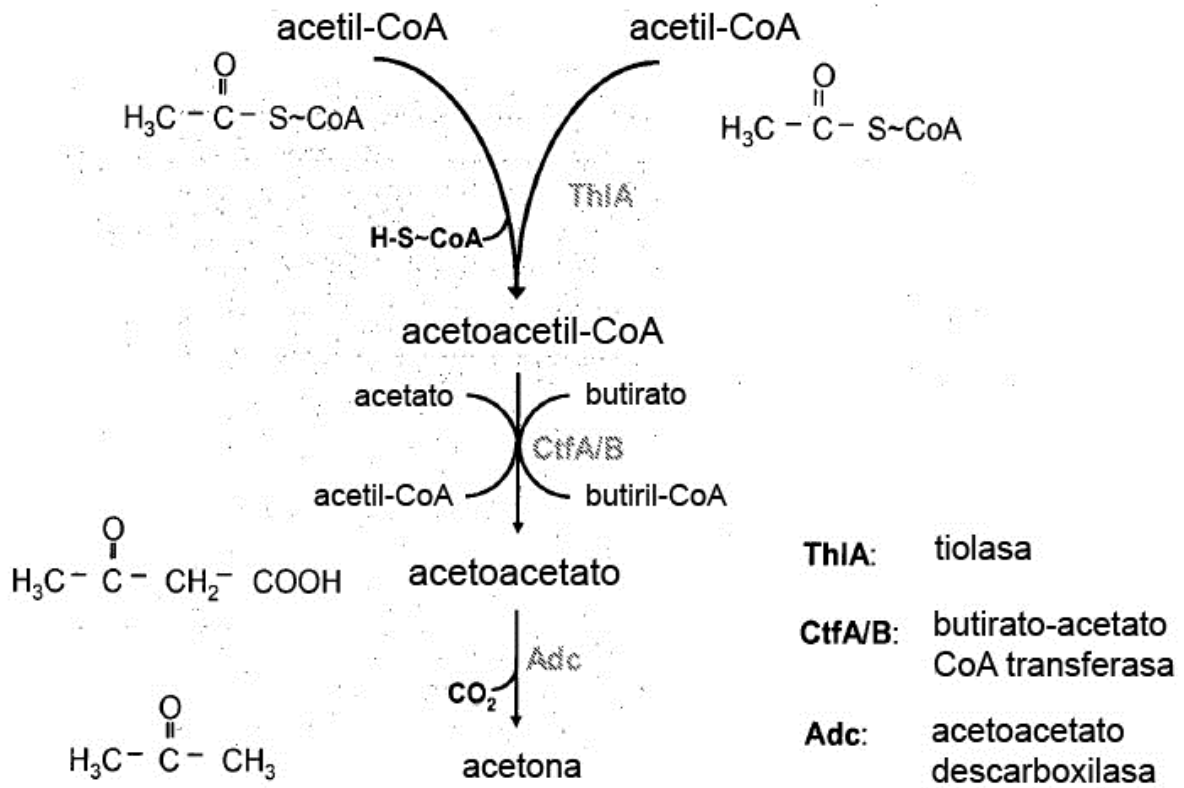




Figura 3

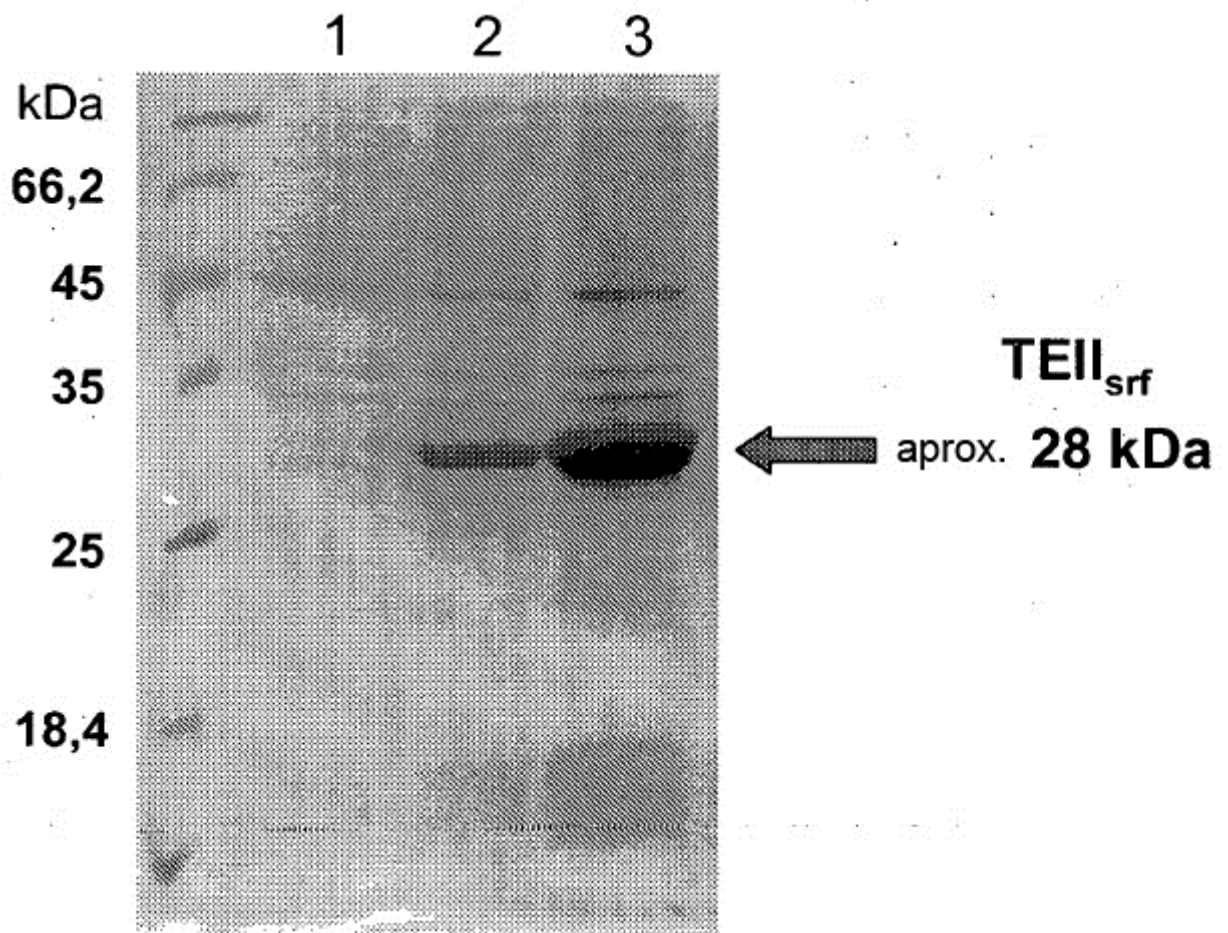


Figura 4

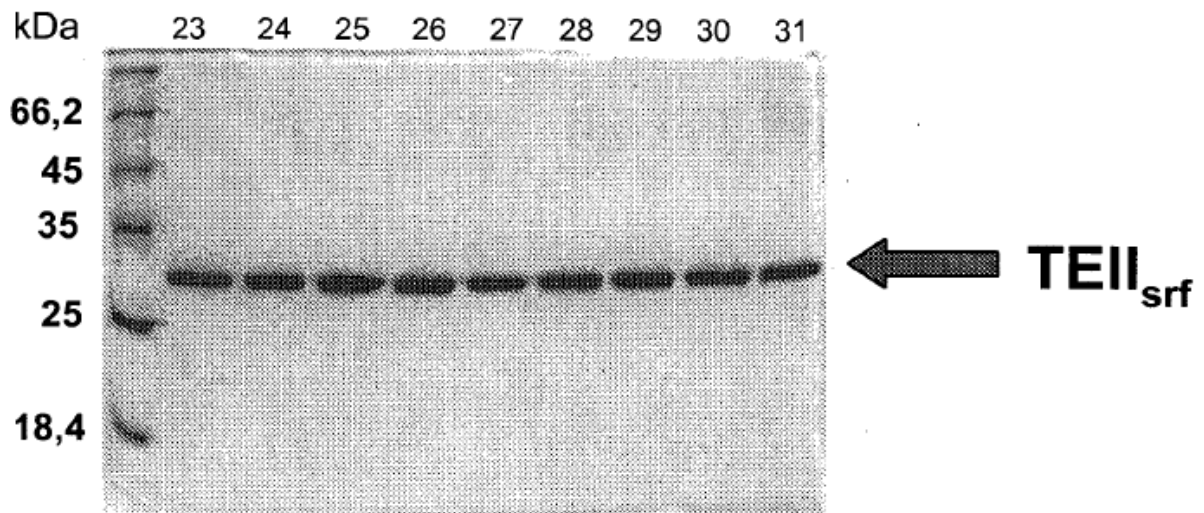
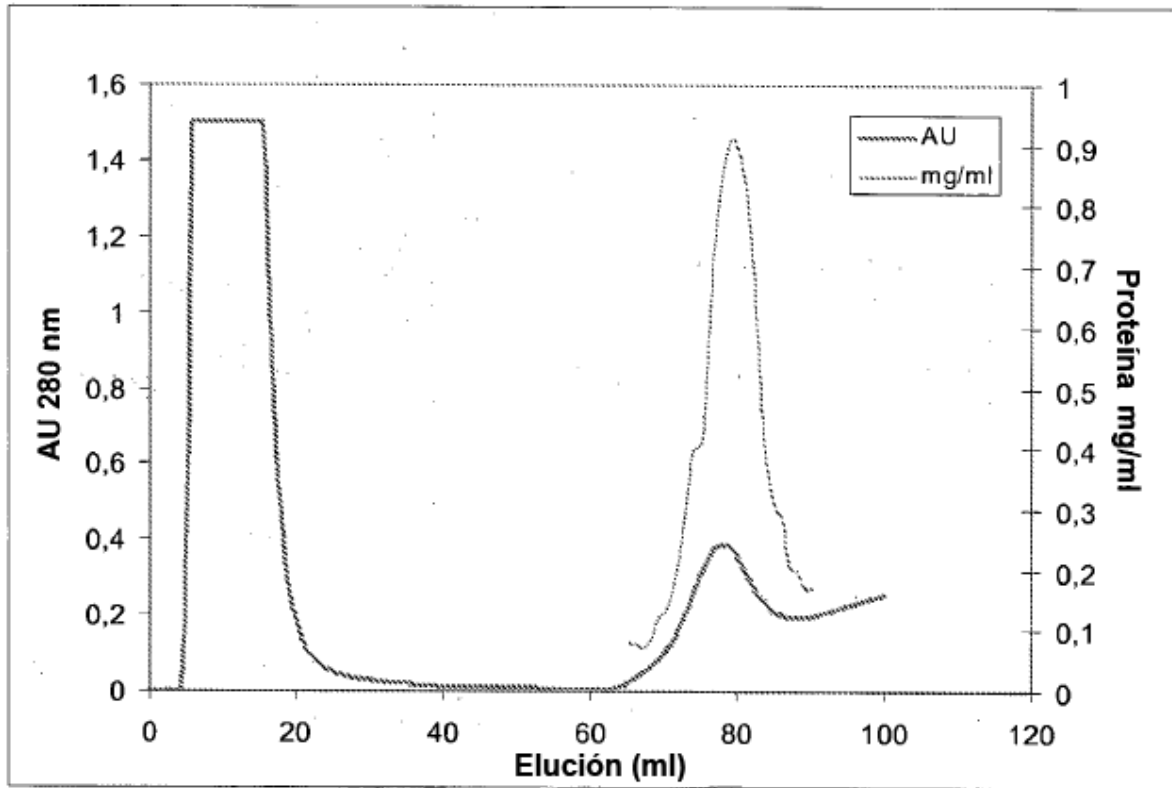


Figura 5

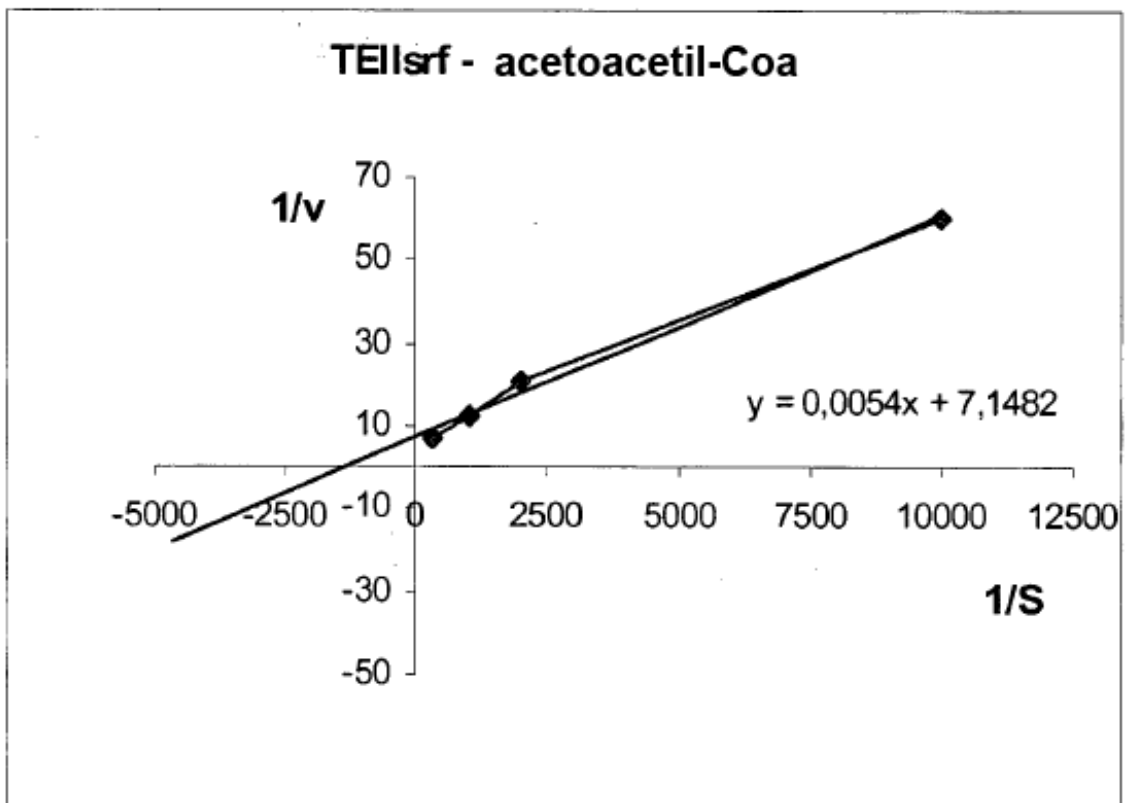
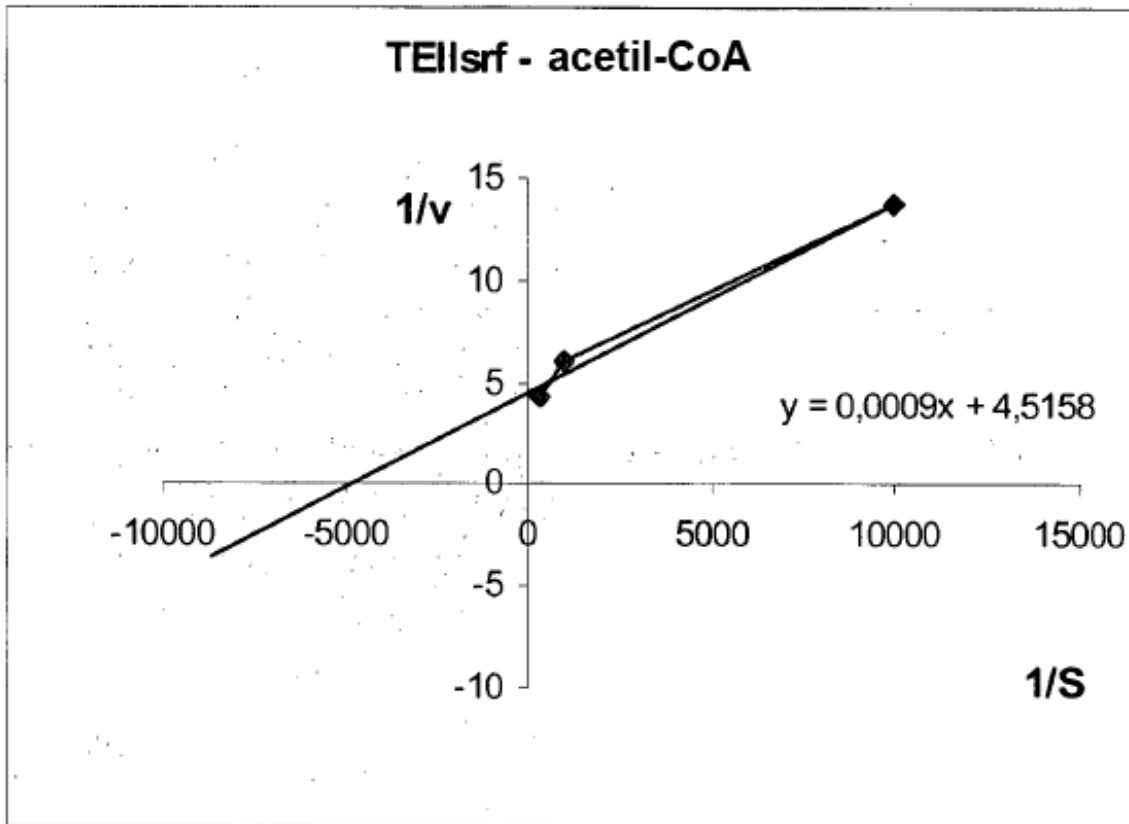


Figura 6

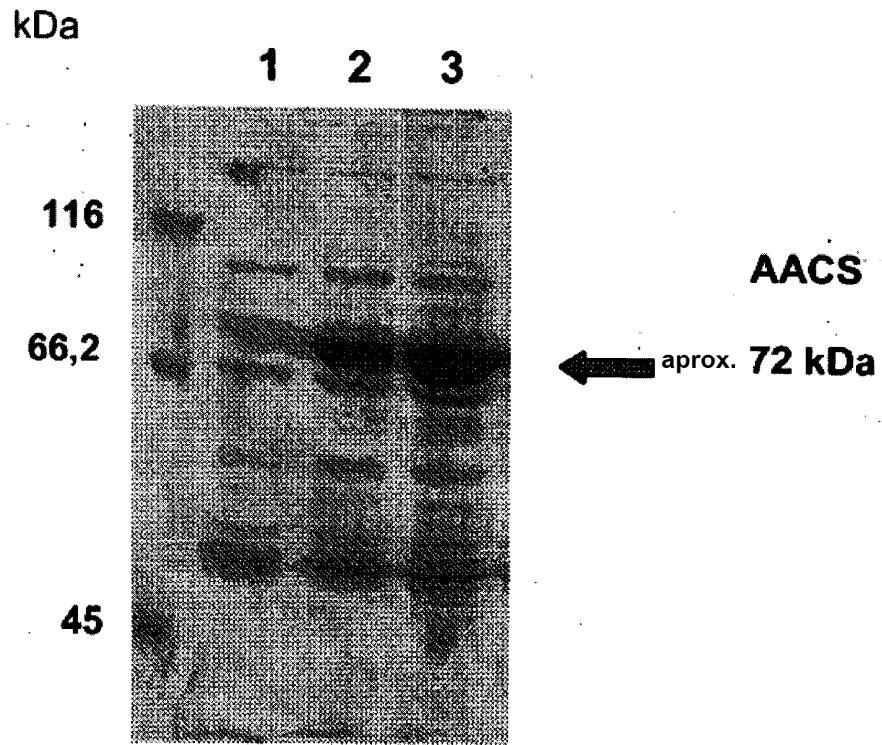


Figura 7

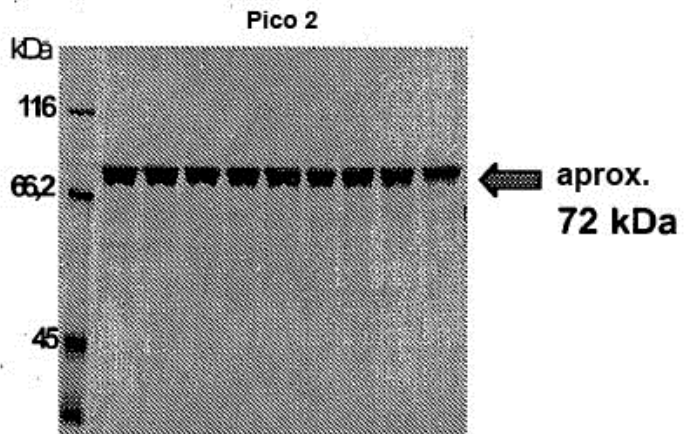
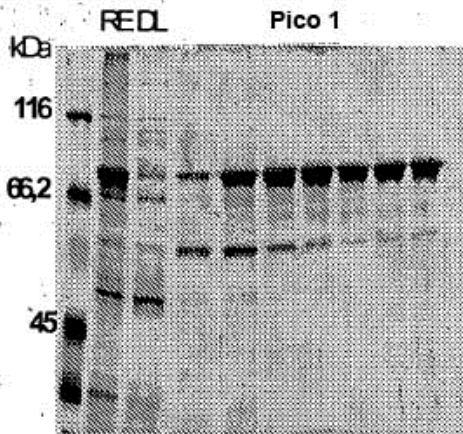
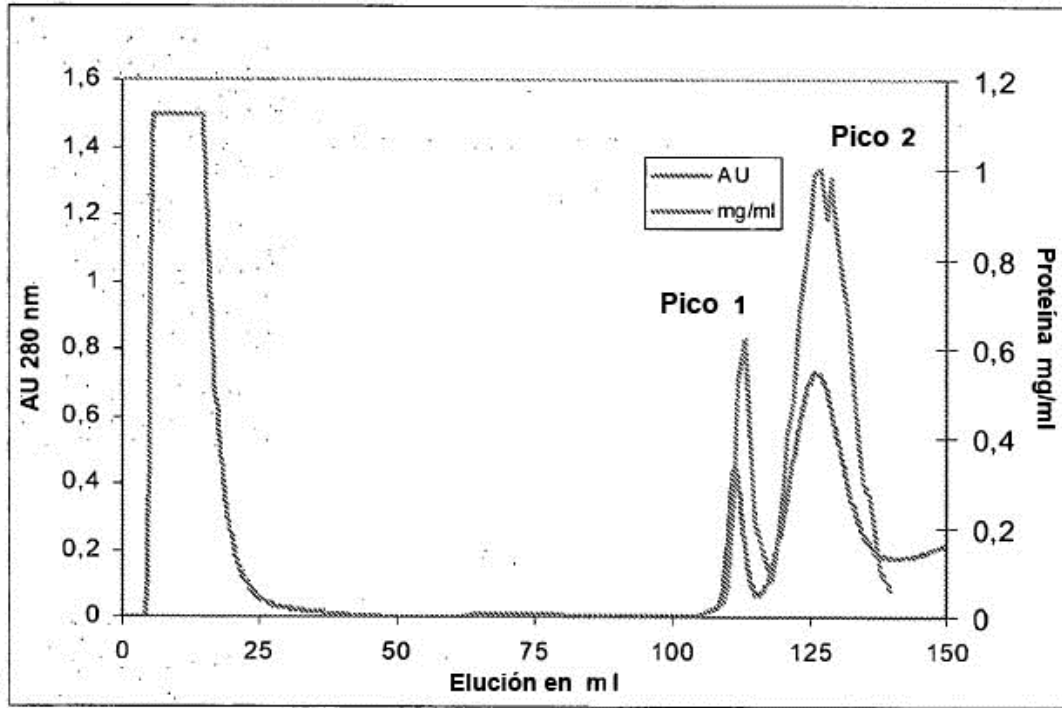


Figura 8

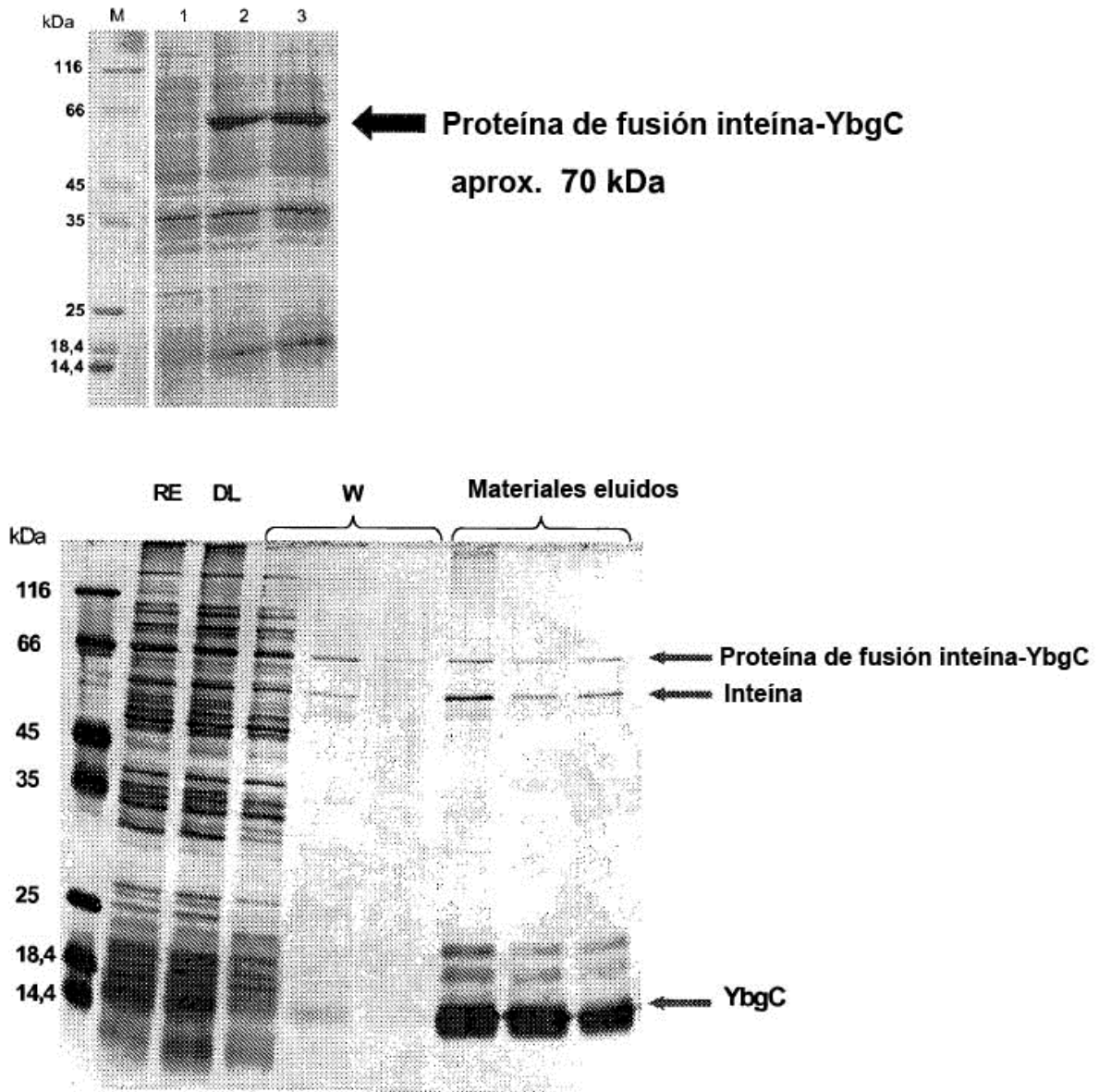


Figura 9

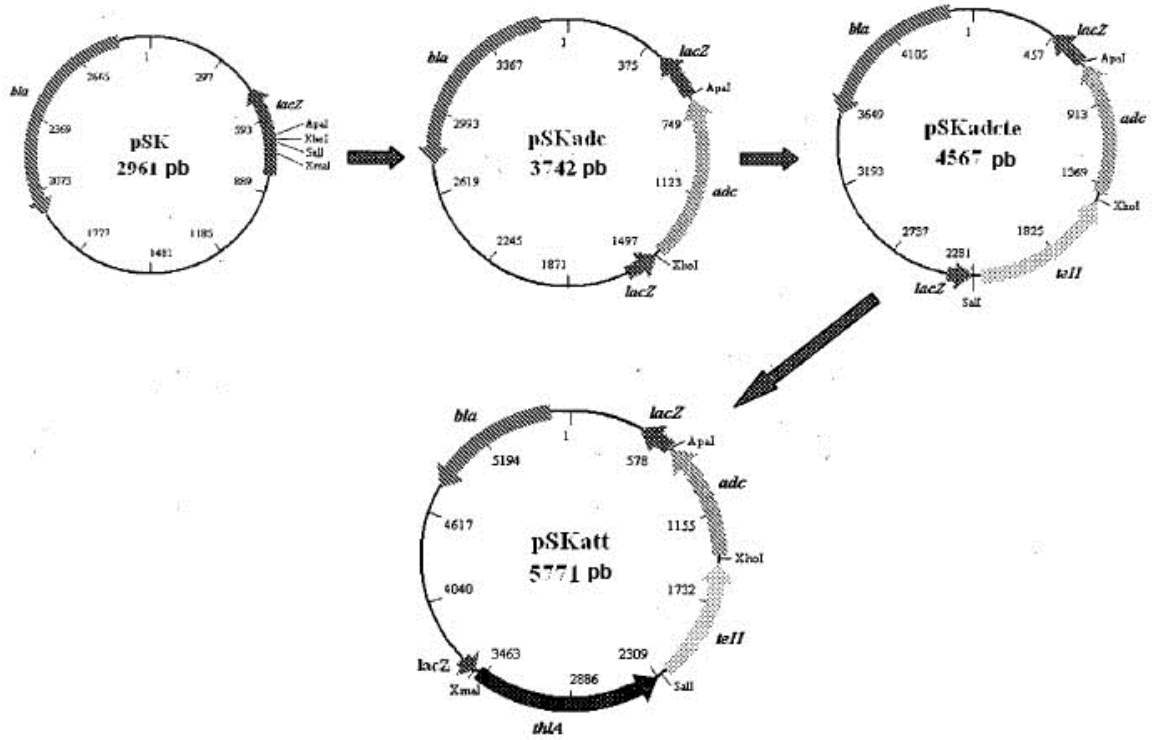
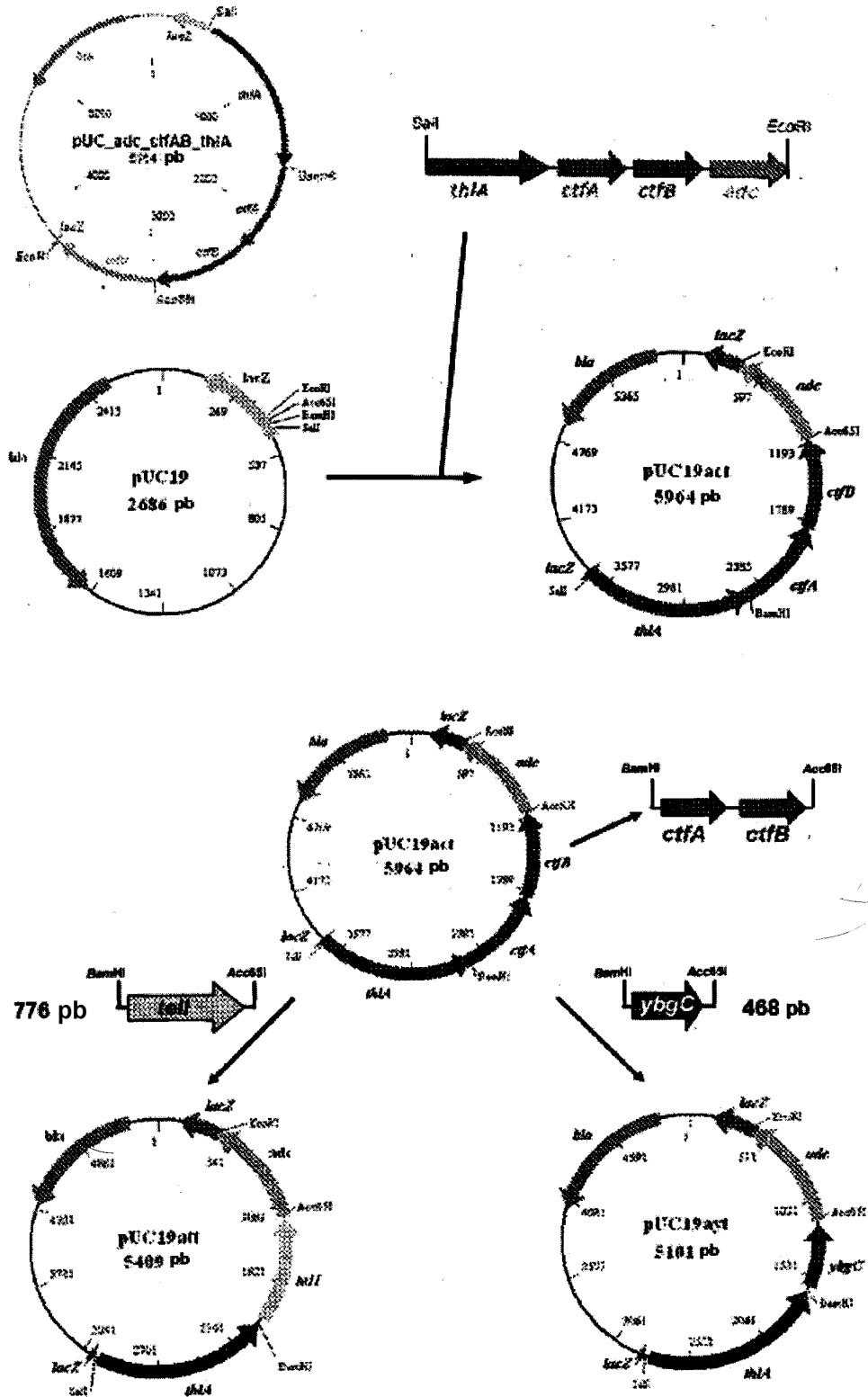


Figura 10





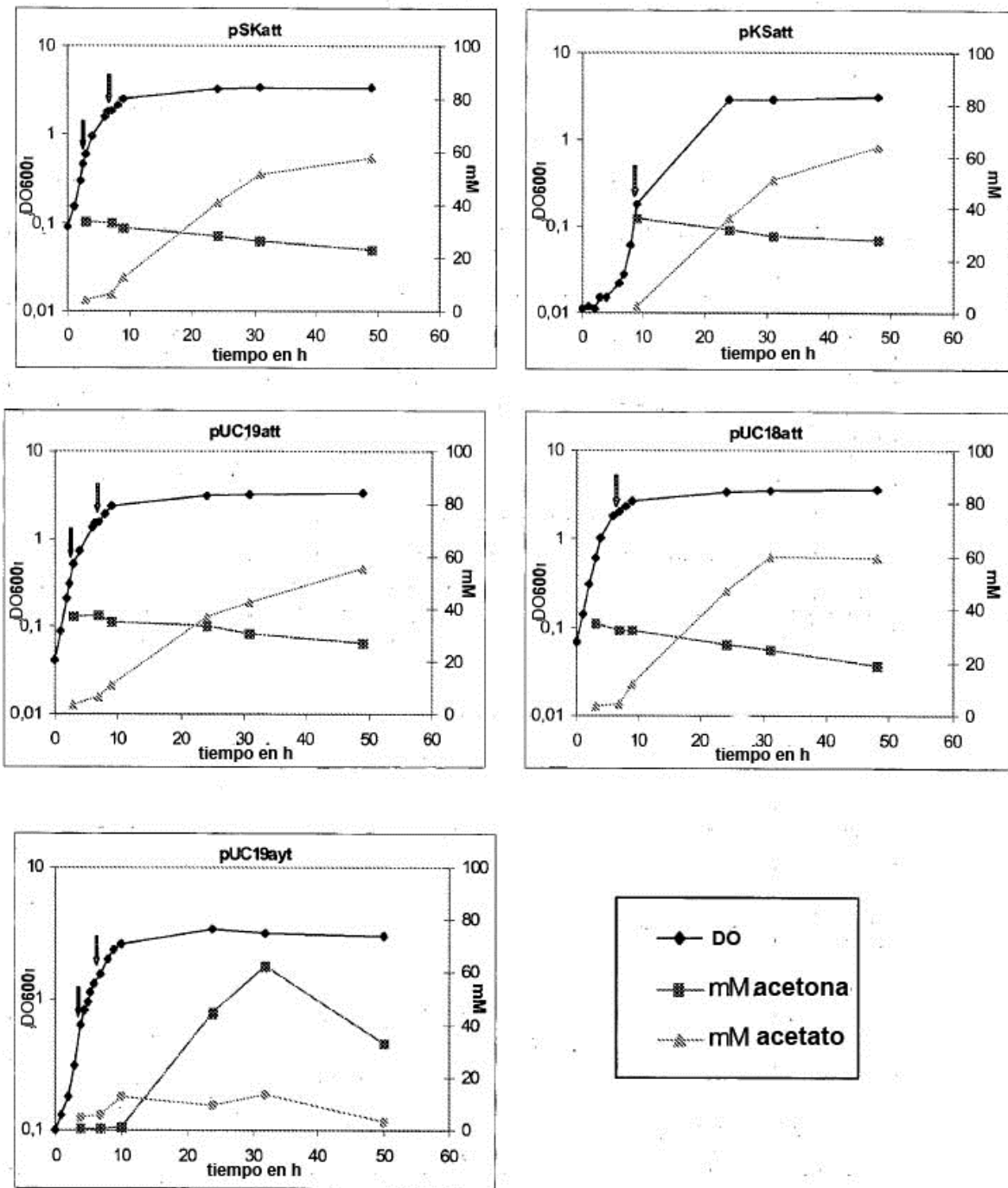


Figura 11

Figura 12

