

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 398**

21 Número de solicitud: 201300612

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/38 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.12.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100.0%)
Av. Blasco Ibañez, 13
46010 Valencia ES

72 Inventor/es:

PORCAR MIRALLES , Manuel ;
VILANOVA SERRADOR, Cristina ;
LATORRE CASTILLO, Amparo y
BAIXERAS ALMELA, Joaquín

54 Título: **Cepas de Pseudomonas sp. y usos de las mismas**

57 Resumen:

Cepas de Pseudomonas sp. y usos de las mismas.
La presente invención hace referencia a la cepa Pseudomonas sp. CECT8327 y/o mutantes de la misma, así como a su uso para la degradación de terpenos cíclicos y acíclicos y/o derivados terpénicos cíclicos y acíclicos, a su uso como agente antifúngico, además de como agente productor de surfactantes. La presente invención describe también una composición que comprende dicha cepa, sola o en combinación con al menos un segundo agente antifúngico. Así, la presente invención puede englobarse en el campo del medio ambiente, aplicándose particularmente en técnicas de biorremediación, degradación de residuos y metabolismo de terpenos en todo tipo de reacciones industriales.

DESCRIPCIÓN

Cepas de *Pseudomonas* sp. y usos de las mismas.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a una cepa aislada de *Pseudomonas* sp. (en adelante cepa CECT8327 o cepa de la invención), y a su uso para la degradación de terpenos en general y derivados terpénicos; así como a su uso como agente antifúngico o como agente productor de surfactantes. La presente invención se engloba en el sector del medio ambiente, aplicándose particularmente en técnicas de biorremediación, degradación de residuos ambientales de terpenos y derivados terpénicos en todo tipo de reacciones industriales.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La resina de coníferas es una mezcla compleja de metabolitos secundarios de dichas plantas. La resina protege los tejidos dañados de los árboles frente a insectos fitófagos y patógenos de las plantas. Los principales componentes de la resina son los terpenos cíclicos, los flavonoides y los ácidos grasos. Los terpenos son los metabolitos de la resina mejor caracterizados porque pueden ser fácilmente identificados con técnicas tales como la cromatografía de gases. Los terpenos cíclicos más abundantes en la resina de pino son los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos (TRAPP S y CROTEAU R. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annu. Rev. Plant. Phys.* 2001. Vol. 52, páginas: 689-724). Dado que muchos de los terpenos de la resina muestran propiedades antibacterianas y antifúngicas, son considerados fitoalexinas que explican la toxicidad de la misma (GRAY JR y HARBORNE JB. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry* 1994, Vol. 37, páginas: 19-42).

Adicionalmente muchos terpenos exhiben características interesantes para la industria química, especialmente en la producción de fragancias, aceites esenciales y aditivos alimentarios; así como en medicina por sus propiedades citotóxicas, cardiotónicas y antiinflamatorias. No obstante, desde un punto de vista ambiental los terpenos y los derivados terpénicos que no son biodegradables bajo condiciones ambientales naturales, representan uno de los principales contaminantes ambientales. Dichos compuestos se encuentran contaminando el agua efluente de plantas industriales tales como el agua de las fábricas de pasta de papel (SUNTIO LR. et al. A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluents. *Chemosphere.* 1988, Vol. 17, páginas: 1249-1290), representando toneladas de residuos anuales procedentes de los materiales basados en terpenos.

Hasta la fecha, en el estado de la técnica se conocen muy pocos microorganismos con capacidad para degradar terpenos. Además entre los microorganismos conocidos con esta capacidad, o bien degradan únicamente terpenos cíclicos (MOHN WW. et al. Physiological and Phylogenetic Diversity of Bacteria Growing on Resin Acids. *Syst. Appl. Microbiol.* 1999, Vol. 22, páginas: 68-78), o bien degradan solo terpenos acíclicos (LINOS A. et al. Biodegradation of cis-1, 4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. *Applied and environmental microbiology.* 2000, Vol. 66, páginas: 1639-45). Por todo ello, el reciclaje es hasta la presente invención la única alternativa posible ante la acumulación de este tipo de materiales (ABRAHAM E. et al. Recent Developments in Polymer Recycling. 2011; Páginas: 47-100. ISBN: 978-81-7895-524-7; BOONDAMNOEN O. et al. Recycling waste natural rubber latex by blending with polystyrene: characterization of mechanical properties. *Advanced Materials Development and Performance (AMDP2011).* International Journal of Modern Physics: Conference Series. 2012, Vol. 6, páginas 391-396).

En definitiva, no existe un tratamiento eficaz para la degradación de los distintos tipos de terpenos, cíclicos y acíclicos, así como de los derivados terpénicos, sin necesidad de discriminar el tipo de terpeno concreto. Por ello, los terpenos en general, y los derivados terpénicos de cualquier tipo, continúan siendo un problema, como contaminantes medio-

ambientales, por su difícil degradación. A la vista de lo anterior, existe una necesidad permanente de desarrollar métodos para la degradación y eliminación de los terpenos y derivados terpénicos cíclicos y acíclicos, incluyendo la biorremediación bacteriana.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 Definiciones

A los efectos de la presente invención, la expresión "derivado terpénico" se refiere a materiales, sustratos y sustancias cuya estructura química este total o parcialmente basada en terpenos tanto cíclicos como acíclicos.

10 A los efectos de la presente invención por el término "degradación" se entiende el proceso por el que un terpeno o derivado terpénico pierde uno o varios átomos de carbono, o por el que un terpeno o derivado terpénico se descompone en moléculas más simples.

A efectos de la presente invención, se entiende por el término "degradación", la transformación de la estructura compleja del compuesto, preferentemente, terpenos o derivados terpénicos, en otra de estructura más sencilla.

15 Por la expresión "tratamiento de compuesto hidrofóbico" se entiende el aumento de su biodisponibilidad en procesos de biorremediación.

En la presente invención, las expresiones "terpeno acíclico" y "terpeno lineal" se usan indistintamente y hacen referencia a todo terpeno que no tiene una estructura cíclica.

20 En la presente invención por las expresiones "cepa de la invención" y "cepa CECT8327" se entiende la cepa CECT8327, cepa aislada de *Pseudomonas* sp y mutantes de la misma.

25 A efectos de la presente invención, los términos "mutante", "cepas mutantes" y "mutantes de la misma", se refieren específicamente a las cepas bacterianas que son generadas u obtenidas mediante técnicas de mutación espontánea o inducida, a partir de la cepa perteneciente a *Pseudomonas* sp CECT8327, que se describe y ejemplifica en el presente documento. Las cepas mutantes descritas en el presente documento y obtenidas a partir de la cepa CECT8327 como material de partida, mantienen o mejoran una o varias de las propiedades de la cepa de la invención, que incluye al menos su capacidad para degradar terpenos cíclicos y acíclicos y derivados terpénicos; pudiendo incluir adicionalmente, su capacidad antifúngica, su capacidad de producir agentes surfactantes en presencia de compuestos hidrofóbicos, su utilización como biofactorías y su capacidad para degradar imazalil. La persona experta en la técnica es capaz de realizar las técnicas apropiadas para verificar si las cepas mutantes obtenidas presentan dichas propiedades. Posibles métodos para determinar dichas propiedades se recogen en el apartado Ejemplos.

35 La obtención de cepas mutantes a partir de la cepa CECT8327 puede llevarse a cabo por medio de la aplicación de uno o varios métodos de mutagénesis. El método se selecciona, sin limitación, de la lista que comprende mutagénesis química, mutagénesis por radiaciones y mutagénesis por elementos transponibles. Las mutaciones espontáneas pueden ocurrir debido a la acción de las radiaciones naturales e incluso durante la replicación del ADN debido a errores en la lectura de las bases. La frecuencia de mutación puede aumentarse significativamente con el uso de métodos de mutación inducida. Tanto Las mutaciones espontáneas como las inducidas se producen como resultado de cambios estructurales en el genoma como por ejemplo, pero sin limitación, cambio en el número de cromosomas, cambio en el orden de uno o varios genes dentro del cromosoma o cambio en la secuencia de bases dentro de un gen (mutación puntual). Como agentes que provocan mutagénesis química se usan, sin limitación, agentes que reaccionan con el ADN, aunque el ADN no se esté replicando, ocasionando cambios químicos en las bases que provocan un apareamiento incorrecto y agentes intercalantes o análogos de bases. Entre agente que reacciona con el ADN, sin

limitación, están el ácido nitroso, hidroxilamina, agente alquilante (etil metano sulfonato [EMS], metil metano sulfonato [MMS], dietil sulfato [DES], diepoxi butano [DEB], N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina [NTG], N-metil- N-nitroso urea (gas mostaza), agente intercalante (acridina, bromuro de etidio o dihidroetidio).

- 5 La mutagénesis por radiaciones puede ser producida, pero sin limitarse, a radiaciones ultravioleta o radiaciones ionizantes como los rayos X o los rayos gamma.

La mutagénesis por elementos transponibles puede ser producida, pero sin limitarse, a la inserción de una secuencia de inserción o de un transposón en una secuencia de uno o varios genes de la cepa bacteriana de la presente invención.

- 10 A efectos de la presente invención, el término "similitud" se refiere al grado de similitud de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico comparadas mediante la alineación de sus secuencias. El grado de similitud entre dos secuencias de ácidos nucleicos que se comparan es una función del número nucleótidos idénticos que se localizan en posiciones comparables. El porcentaje de similitud de dos secuencias de ácidos nucleicos, a efectos de la presente
15 invención, se determina mediante los programas informáticos ClustalW, BLAST, FASTA o Smith-Waterman.

- A efectos del presente documento y haciendo referencia a la "Lista de Secuencias" que lo acompaña, se incluye la traducción al castellano de las palabras que aparecen en inglés en dicha "Lista de Secuencias". Así, "source": fuente; "mol_type": tipo de molécula; "unassigned
20 DNA": ADN no asignado; y "organism": organismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención soluciona el problema planteado en el apartado anterior mediante la identificación y uso de una cepa aislada de *Pseudomonas* sp. , la cepa CECT8327 y mutantes de la misma.

- 25 Por lo tanto, el primer aspecto de la presente invención hace referencia a la cepa aislada perteneciente a *Pseudomonas* sp. CECT8327 y cepas mutantes de la misma, donde las cepas mutantes son obtenidas a partir de la cepa de la invención como material de partida y donde las cepas mutantes mantienen una o varias de las propiedades de la cepa de la invención, propiedades que incluye al menos su capacidad para degradar terpenos cíclicos y acíclicos y
30 derivados terpénicos; pudiendo incluir adicionalmente, su capacidad antifúngica y su capacidad de producir agentes surfactantes en presencia de compuestos hidrofóbicos, además de su capacidad para degradar imazalil y como biofactoría para la producción de sustancias o compuestos a escala industrial partiendo de resina rica en terpenos y/o derivados terpénicos, como fuente de carbono.

- 35 En la presente invención por las expresiones "cepa de la invención" y "cepa CECT8327" se entiende la cepa CECT8327, cepa aislada de *Pseudomonas* sp. , .y mutantes de la misma, como se han definido anteriormente.

- Sorprendentemente, los inventores de la presente invención, han aislado y caracterizado la cepa de *Pseudomonas* sp. CECT8327 en comunidades microbianas asociadas a una fuente de
40 microorganismos no considerada hasta la fecha en el estado de la técnica como posible fuente de microorganismos, en concreto la resina de *Pinus sylvestris* (*P. sylvestris*, o pino silvestre, en adelante), que incluye la resina asociada a las agallas generadas por el insecto *Retinia resinella* Linnaeus, grupo del orden Lepidoptera (NIEUKERKEN EJ. et al. Animal biodiversity: An outline of higher level classification and survey of taxonomic richness. Order Lepidoptera Linnaeus, 1758.En: Zhang, ZQ (ed). Magnolia Press: New Zealand. 2011, paginas: 212-221).
45

Es conocido en el estado de la técnica que las larvas de *Retinia* causan pequeñas heridas en el *P. sylvestris*, que inducen la secreción de resina, la cual es manipulada por la larva para

5 construir una cápsula de resina a modo de una dura capa protectora. También es conocido que las agallas son nódulos contruidos con la resina exudada por el pino, en el interior de las cuales viven las larvas de *Retinia*. Cada larva se desarrolla dentro de la agalla de resina durante cerca de dos años, completamente aislada del ambiente externo por su refugio rico en terpenos.

10 La identificación de la cepa CECT8327 es un hallazgo inesperado por varios motivos. En primer lugar porque la fuente de la que se ha aislado la cepa, la resina, como es bien conocido en el estado de la técnica, es mayoritariamente rica en terpenos cíclicos, y estos, a priori, de acuerdo a los conocimientos generales, inhiben el crecimiento de los microorganismos (WANG J. et al. Robust antimicrobial compounds and polymers derived from natural resin acids. Chem Commun. 2012. Vol: 48, paginas: 916-8), por lo que no era esperable aislar de la resina, la cepa con las propiedades descritas en la presente invención. Pero, además, sorprendentemente, la cepa de la presente invención es capaz de degradar otro tipo de terpenos no presentes en la resina en la que se ha aislado la cepa *Pseudomonas* sp. CECT8327, los terpenos acíclicos.

20 A la vista de lo anterior, en concreto, la sorprendente capacidad de la cepa CECT8327 y mutantes de la misma, para la degradación tanto de terpenos cíclicos como acíclicos y derivados terpénicos, dichas cepas pueden ser utilizadas industrialmente en la degradación de los mismos. Consecuentemente, la presente invención puede aplicarse en técnicas de biorremediación.

El segundo aspecto de la presente invención hace referencia a una composición que comprenda al menos la cepa CECT8327, y/o posibles mutantes de la misma, tal y como se definen en el primer aspecto de la invención.

25 Por ello, siguiendo con lo explicado anteriormente en relación a las posibles aplicaciones de la cepa CECT8327, el tercer aspecto de la presente invención hace referencia al uso de la cepa CECT8327 y/o mutantes de la misma, o a una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, según se ha definido anteriormente, para la degradación de terpenos, tanto acíclicos como cíclicos y derivados terpénicos.

30 La degradación de terpenos por la cepa CECT8327 y/o por los mutantes de la misma, o por una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, posibilita el aprovechamiento energético de los mismos con fines biotecnológicos, en concreto como biofactoría para la producción de sustancias o compuestos a escala industrial partiendo de los terpenos y/o derivados terpénicos como fuente de carbono.

35 El cuarto aspecto de la presente invención es el uso de la cepa CECT8327 y/o de los mutantes de la misma, o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, como biofactoría en la producción de sustancias o compuestos de interés empleando resina como fuente de carbono. Esta aplicación se lleva a cabo mediante la inclusión del gen o los genes de interés que codifican la sustancia o compuesto deseado en el genoma de la cepa CECT8327.

40 La persona experta en la técnica conoce perfectamente como insertar el gen o los genes de interés en el genoma de la cepa de la invención manteniendo las propiedades sorprendentes de la cepa de la invención usada como material de partida. Entre ellas, y sin carácter limitante, están la transformación con vectores integrativos o la transformación con vectores episomales.

45 Sorprendentemente, además, la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, o una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, muestran acción antifúngica al inhibir el crecimiento de hongos. Esta capacidad antifúngica de la cepa de la invención o de una composición que comprenda una cantidad

efectiva de la misma, permite su uso en el control de hongos fitopatógenos, permitiendo un ahorro en el uso de fungicidas y reduciendo su impacto ambiental.

5 Por ello, el quinto aspecto de la presente invención es el uso de la cepa CECT8327 y/o de los mutantes de la misma, o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, como fungicida. Como se ha mencionado
10 previamente, la composición descrita en la presente invención, puede comprender además, al menos otro agente antifúngico, siendo preferido el imazalil. Por lo tanto, la presente invención describe también, el uso de una composición que comprende una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma en combinación con otro agente antifúngico, preferentemente el imazalil, para el control de hongos fitopatógenos.

15 La capacidad inesperada de la cepa CECT8327 y/o de los mutantes de la misma, para combinar las actividades previamente citadas, de degradación de terpenos cíclicos y acíclicos, derivados terpénicos y su acción antifúngica, da lugar a aplicaciones industriales adicionales de la cepa o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la misma, debido a la presencia de terpenos y derivados terpénicos en biomásas, al permitir la degradación de terpenos y derivados terpénicos al mismo tiempo que muestra propiedades antifúngicas.

20 A la vista de lo anterior el sexto aspecto de la presente invención hace referencia al uso de la cepa CECT8327 y/o a los mutantes de la misma, o de una composición que comprenda al menos la cepa CECT8327, y/o posibles mutantes de la misma, para la degradación de terpenos cíclicos y acíclicos y derivados terpénicos y como antifúngico, para inhibir el crecimiento de hongos.

25 Adicionalmente, y de modo inesperado, la cepa de la invención es capaz de crecer en presencia del fungicida imazalil como única fuente de carbono, de ahí su uso o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la misma, para la descontaminación de fluidos que contienen imazalil.

30 Otro efecto inesperado de la cepa CECT8327 y/o de los posibles mutantes de la misma, o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, es su capacidad para crecer en presencia de medios líquidos que contengan compuestos hidrofóbicos. Este efecto inesperado se basa en la producción de agentes surfactantes que facilitan la emulsión de los compuestos hidrofóbicos, para su posterior tratamiento. Por ello, el séptimo aspecto de la presente invención hace referencia al uso de la cepa CECT8327 y/o de los mutantes de la misma, o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, para la producción de agentes surfactantes que faciliten la degradación o tratamiento de compuestos hidrofóbicos.
35

DESCRIPCIÓN DE LOS FIGURAS

40 Figura 1. Peso seco total (T) y peso seco bacteriano (C) (expresados en g/mL, según se muestra en el eje vertical de la gráfica) de los cultivos en medio RM (medio basado en resina) de las cepas ensayadas y evolución de la cantidad estimada de resina (R) en el medio. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo expresado en días.

Figura 2. Microscopía electrónica de cultivos con láminas de látex no inoculados (A) e inoculados (B, C y D) con la cepa CECT8327, obtenidas tras 15 días de crecimiento a 30°C.

Figura 3. Imágenes de medio de cultivo mínimo suplementado con diesel no inoculado (A) e inoculado (B) con la cepa de la invención CECT8327.

45 Figura 4. Diámetro de colonia (d, expresado en mm) de tres hongos aislados de la resina (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium decumbens*) en ensayos de confrontación con la cepa CECT8327, en medio rico (graficas B, D y F) y en medio mínimo con resina como

única fuente de carbono (graficas A, C y E). El eje horizontal representa el tiempo de cultivo medido en días. En cada grafica C corresponde al hongo confrontado con la cepa CECT8327; y A corresponde al hongo no confrontado con la cepa CECT8327. Las graficas A y B corresponden a ensayos llevados a cabo con *Aspergillus terreus*, mientras que las graficas C y D corresponden a *Aspergillus flavus* y las graficas E y F a *Penicillium decumbens*

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en la cepa CECT8327, del género *Pseudomonas* sp., y cualquiera de sus mutantes, según se define a lo largo del presente documento, identificada a partir de muestras de resina de *P. sylvestris* y de agallas del lepidóptero *R. resinella*. Sorprendentemente, y tras la caracterización de la cepa de la invención a nivel de secuencia (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) y a nivel fenotípico, se identificaron un conjunto de características metabólicas y ecológicas, mencionadas anteriormente, que convierten a la cepa CECT8327 en una cepa esencial en distintos procesos biotecnológicos que impliquen la degradación de terpenos cíclicos y acíclicos, y derivados terpénicos, así como la actividad antifúngica o la generación de surfactantes para el tratamiento posterior de compuestos hidrofóbicos.

La cepa CECT8327 tolera y degrada cantidades significativas de resina. La Figura 1 muestra que la cepa de la presente invención degrada 1,5 gramos de resina por litro de medio mínimo, con resina como única fuente de carbono, después de cuatro días de crecimiento exponencial en dicho medio. El protocolo usado para determinar el contenido de resina tuvo únicamente en cuenta la cantidad de resina convertida en biomasa, contribuyendo al incremento del peso seco de la bacteria. Por ello, la cantidad de resina degradada es una estimación a la baja, siendo la cantidad real de resina degradada muy superior.

En una realización preferida de la presente invención, la cepa CECT8327 y/o mutantes de la misma, degradan los terpenos cíclicos seleccionados del grupo que comprende diterpenos, monoterpenos y sesquiterpenos.

La cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, son capaces de degradar los monoterpenos monocíclicos, limonoides, presentes en una amplia gama de alimentos funcionales y fitonutrientes naturales. En una realización preferida de la invención, la cepa CECT8327 degrada limoneno, presente, por ejemplo, en las peladuras de cítricos. Por ello, un aspecto de la invención es su uso en el tratamiento de biomásas ricas en limonenos como paso previo a su fermentación por parte de microorganismos sensibles a estos terpenos, como las levaduras. En concreto la degradación de limoneno de biomásas procedentes del procesamiento de cítricos para la mejora en la producción de etanol, mediante fermentación alcohólica de las biomásas pre-tratadas mediante levaduras, a partir de cascara de naranja.

El contenido génico de la cepa CECT8327 analizado a partir de las secuencias metagenómicas, detectó un grupo o clúster de genes correspondientes a la SEQ ID NO: 1. La presencia de este paquete génico indica el fuerte valor adaptativo de este grupo de genes en un ambiente rico en terpenos. Además, la cepa de la invención comprende la secuencia parcial 16S correspondiente a la SEQ ID NO: 2.

En una realización preferida de la presente invención, la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, comprenden la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 1 en su material genómico. En una realización aún más preferida de la invención, la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, comprenden una secuencia con una similitud de al menos 70% respecto a la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1.

Por otro lado, la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, de la presente invención, ventajosa e inesperadamente, tienen capacidad para degradar terpenos totalmente distintos a los presentes en la resina, los terpenos acíclicos. En una realización preferida de la presente

invención, los terpenos acíclicos degradados son el látex, la goma vulcanizada o caucho y la gutapercha.

5 En este sentido, también es sorprendente la elevada velocidad de degradación mostrada por la cepa CECT8327 al ser capaz de degradar visiblemente látex en dos semanas, observándose al microscopio electrónico grietas en la estructura del mismo (ver Figura 2). Otro aspecto sorprendente de la cepa CECT8327 es la forma de degradar el látex. La cepa CECT8327 actúa de forma local mediante el contacto íntimo entre la misma y el sustrato, al cual se fija incluso bajo vigorosa agitación del medio, observándose una perfecta adhesión y produciéndose una excavación en forma de nicho u hornacina debido a la desintegración del látex en las
10 inmediaciones de cada célula adherida al mismo (ver Figura 2). Así, la cepa CECT8327 puede usarse en el tratamiento de materiales acumulados a gran escala, tales como guantes u otros residuos sólidos, actuando directamente sobre su superficie, por lo que el tratamiento de estos materiales a escala industrial no requeriría de un pre-tratamiento para solubilizarlos en medio líquido.

15 Además, la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, sorprendentemente se caracterizan por mostrar un efecto combinado al ser capaces de degradar eficazmente terpenos cíclicos y acíclicos y derivados terpénicos, al mismo tiempo que son antifúngicos. Un aspecto preferido de la presente invención hace referencia a un método combinado para la degradación de terpenos cíclicos y acíclicos y derivados terpénicos y para la inhibición del crecimiento de
20 hongos, que comprende la puesta en el medio de una cantidad efectiva de la cepa CECT8327 o de una composición que la comprenda.

En una realización preferida de la invención relativa a la acción antifúngica de la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, el uso de inhibir el crecimiento de hongos es sobre hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. En resumen, la cepa de la
25 invención es también un agente de control biológico, especialmente para la industria agroalimentaria.

En una realización preferida de la presente invención, la cepa CECT8327 se usa como fungicida en tratamientos post-cosecha. En la presente invención, por tratamiento post-cosecha se entiende el proceso de almacenaje de las cosechas y los procesos necesarios para la
30 transformación y la adecuada conservación de los alimentos al estado natural o fresco. En otra realización preferida de la presente invención, la cepa CECT8327 se usa en el control de hongos en la industria agroalimentaria, en concreto en los productos para la alimentación humana y/o animal procesados, y más particularmente en ensaladas de cuarta gama, mejorando la seguridad de los mismos.

35 La cepa de la presente invención es capaz de crecer en presencia de agentes antifúngicos. La Tabla 1 muestra la comparación del crecimiento mediante conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de la cepa CECT8327 en medio de cultivo sólido LB y medio de cultivo sólido LB suplementado con distintas concentraciones de un fungicida comúnmente usado en la industria agroalimentaria, el fungicida imazalil. En una realización preferente de la invención, la cepa
40 CECT8327 se usa como fungicida en combinación con el imazalil, típico de la industria agroalimentaria.

A la vista de lo anterior, en una realización preferida, la presente invención hace referencia a una composición que comprende al menos la cepa CECT8327 y otro agente antifúngico. En una realización aún más preferida, el otro agente antifúngico es imazalil.

45

Tabla 1

Medio de cultivo	UFC/mL
LB	3.84E+07
LB+500ppm imazalil	8.80E+06
LB+1500ppm imazalil	5.60E+06

5 Como se ha mencionado anteriormente, la cepa CECT8327 es capaz de crecer en un medio con compuestos hidrofóbicos, En una realización preferida, la cepa CECT8327 y/o mutantes de la misma, son capaces de crecer en presencia de hidrocarburos, mediante la producción de agentes surfactantes que posibilitando el tratamiento posterior de dicho hidrocarburo. En una realización aún mas preferida de la invención, esta capacidad surfactante se aplicaría al tratamiento de medios líquidos que contengan diesel, (ver Figura 3) y/u otros compuestos hidrofóbicos, como, y sin carácter limitativo, aceites, parafinas y grasas.

10 DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

De acuerdo con lo establecido en el Tratado de Budapest, la cepa de la invención del género *Pseudomonas* fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), situada en el Parc Cientific de la Universitat de Valencia, calle Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia, (España).

15 La fecha de depósito es 22 de abril de 2013 y el número de depósito correspondiente es CECT8327.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Colección de muestras.

20 Se recogieron muestras de resina ambiental asociada al pino albar (*Pinus sylvestris*) (obtenidas de secreciones naturales del pino) y de resina asociada a las agallas inducidas por *R. resinella* del bosque "Fuente del Tajo" (Mora de Rubielos, Teruel, España) en septiembre del 2011. Se extrajeron las larvas de las agallas. Tanto las agallas como la resina fueron molidas individualmente y suspendidas en tampón PBS estéril (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na_2HPO_4 1.44 g/L, KH_2PO_4 0.24 g/L, pH ajustado a 7.4).

25 Ejemplo 2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Se estableció un medio mínimo selectivo con resina de pino como la única fuente de carbono. Como factor de selección, se obtuvo una solución concentrada al 10% (peso/volumen) de resina mediante la disolución de las muestras de resina mencionadas en el apartado anterior en etanol. Se eliminaron los restos de plantas y otras partículas insolubles en suspensión mediante centrifugación (2,000xg, 5 min). El sobrenadante se filtró y esterilizó a través de un filtro de 0.2µm de diámetro de poro. Se preparó, un medio mínimo (2 g/L $NaNO_3$, 1 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $MgSO_4$, 0.5 g/L KCl, 0.2 g/L pectona bacteriológica; y 15 g/L de agar para el medio sólido). Una vez esterilizado con autoclave, este medio mínimo se mantuvo a 80°C y se mezcló con la solución resina:etanol 10% (peso/volumen), obteniendo un medio selectivo (RM) con concentraciones crecientes de resina (desde 0.5% a 8% v/v). Tanto las muestras de resina del pino, como las muestras de resina asociadas a las agallas, fueron sembradas en placas con RM e incubadas a 30°C durante 14 días.

Ejemplo 3. Extracción de ADN.

Las colonias de microorganismos observadas en las placas después de la incubación se lavaron con PBS estéril. Se aisló el ADN metagenómico de la suspensión microbiana usando el kit Power Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories).

5 Ejemplo 4. Secuenciación de ADN, ensamblado y análisis bioinformático.

El ADN metagenómico fue pirosecuenciado y las lecturas obtenidas fueron posteriormente ensambladas de novo con el programa informático NEWBLER (454 LifeSciences Roche). A partir del ensamblado, se realiza una predicción de genes con la herramienta MetaGeneAnnotator y se identificó el origen filogenético y la función de dichos genes mediante
10 búsquedas BLASTX en la base de datos nr (no redundante) del NCBI. Para obtener una reconstrucción global del metabolismo a partir de los resultados del BLASTX, se utiliza la herramienta KAAS (KEGG Automatic Annotation System).

Ejemplo 5. Análisis de similitud de secuencia y sintenia del clúster de genes de degradación de diterpenos.

15 La secuencia del genoma de la cepa CECT8327 correspondiente al clúster de genes de degradación de diterpenos fue comparada con otras secuencias similares descritas para otras especies del mismo género. Para ello, se realizaron alineamientos múltiples con ClustalW y se comparó el orden génico dentro del clúster con el paquete GenoPlotR del software R.

20 Ejemplo 6. Caracterización de la capacidad de la cepa CECT8327 para degradar terpenos presentes en la resina.

La cepa CECT8327 encontrada en el análisis metagenómico fue aislada y crecida en un medio con resina de pino como única fuente de carbono. Para cuantificar la capacidad de degradar resina, se estime la masa de resina en el medio de cultivo a varios tiempos por diferencia entre la masa seca total y la masa seca correspondiente a las bacterias crecidas en dicho medio.
25 Esta última masa se estimó a partir de un cultivo en medio rico LB, donde puede ser cuantificada de forma exacta por no existir componentes no solubles en el medio de cultivo. El contenido en resina durante la fase exponencial del cultivo en medio RM decreció de 5.4 g/L a 4.1 g/L después de 4 días, indicando una degradación cercana al 25% de la resina presente originalmente en el medio (ver Figura 1). El crecimiento de la cepa de la invención en medio
30 RM se acompañó por la secreción de un sideróforo fluorescente, probablemente pioverdina, normalmente producida por diferentes especies de Pseudomonas bajo condiciones de ausencia de hierro.

Ejemplo 7. Caracterización de la capacidad de la cepa CECT8327 para degradar un material basado en terpenos lineales: el látex.

35 La cepa CECT8327 creció además en medio con látex como única fuente de carbono produciendo un sideróforo fluorescente. Se observe una unión celular al látex en los cultivos de la cepa CECT8327, y el crecimiento de esta cepa se correlacione con la aparición de fisuras en la superficie de muchas de las partículas de látex. Además, a partir de los 15 días, se observó una notable degradación del látex a nivel local, con la producción de hoyos u hornacinas
40 asociadas a la interacción célula-látex (Figura 2).

Ejemplo 8. Ensayos de crecimiento en medio con compuestos hidrofóbicos, tipo hidrocarburos.

La cepa CECT8327 fue inoculada en medio mínimo (2 g/L NaNO_3 , 1 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L MgSO_4 , 0.5 g/L KCl, 0.2 g/L pectona bacteriológica) suplementado con diesel, y se cultivo durante 7 días a 30°C en condiciones de agitación. Los cultivos se dejaron en reposo tras los 7
45 días y se observó el nivel de emulsionado de la capa superficial de diesel. El medio inoculado

con la mencionada cepa presentó un emulsionado mayor que el medio no inoculado (ver Figura 3), debido a la secreción de agentes surfactantes por parte de *Pseudomonas* CECT8327.

Ejemplo 9. Ensayos de tolerancia a biomásas ricas en terpenos y a fungicidas.

5 Para evaluar la tolerancia de la cepa a otros terpenos y a fungicidas, se suplemento un medio de cultivo estándar como el LB (Luria-Bertani) con peladuras de naranja y con distintas concentraciones de imazalil (un agente fungicida ampliamente utilizado en la industria alimentaria), respectivamente. En el caso del medio suplementado con imazalil, se cuantifica el crecimiento mediante conteo de unidades formadoras de colonias en placa (ver Tabla 1), y no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de la cepa de la invención en estos
10 medios con respecto al medio control, no suplementado con ningún compuesto terpénico ni fungicida, por lo que la cepa demostró ser totalmente tolerante a estos compuestos.

Ejemplo 10. Ensayos de inhibición del crecimiento de hongos.

15 Las propiedades antifúngicas de la cepa CECT8327 fueron testadas con distintos aislados fúngicos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en medio mínimo con resina como única fuente de carbono y en medio rico LB (medio Luria-Bertani) mediante ensayos de confrontación. Estos ensayos se basaron en co-cultivar diferentes aislados fúngicos en medios sólidos en presencia o en ausencia de la cepa de la invención. Las esporas fúngicas fueron inoculadas en puntos situados en el centro de las placas Petri, mientras que, en los casos correspondientes, la cepa de la invención fue inoculada en líneas horizontales paralelas
20 situadas a 2cm del hongo. El diámetro de las colonias fúngicas fue medido durante los 7 días siguientes. En todos los casos se observó una parada irreversible en el crecimiento fúngico entre el primer y el tercer día de crecimiento en presencia de *Pseudomonas* sp CECT8327, como se muestran en La Figura 4.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa aislada perteneciente a *Pseudomonas* sp. CEC18327 y mutantes de la misma donde las cepas mutantes son obtenidas a partir de la cepa CECT8327 como material de partida y mantienen o mejoran una o varias de las propiedades biológicas de la cepa CECT8327, que incluye al menos su capacidad para degradar terpenos cíclicos y acíclicos y/o derivados terpénicos cíclicos y acíclicos.
2. Cepa, según la reivindicación 1, caracterizada por comprender una secuencia con una similitud de al menos 70% respecto a la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1.
- 10 3. Cepa, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizada porque su genoma comprende al menos un gen, introducido artificialmente, donde el al menos gen codifica para una sustancia o compuesto para su producción a escala industrial.
4. Composición que comprende la cepa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
5. Composición según la reivindicación 4 que comprende al menos un segundo agente antifúngico.
- 15 6. Composición según la reivindicación 5, donde el al menos segundo agente antifúngico es imazalil.
7. Uso de la cepa definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o de la composición definida en la reivindicación 4, para la degradación de terpenos cíclicos y/o acíclicos y/o derivados terpénicos cíclicos y/o acíclicos.
- 20 8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado porque los terpenos cíclicos se seleccionan del grupo que comprende: diterpenos, monoterpenos y sesquiterpenos.
9. Uso según la reivindicación 8, donde el monoterpeno es un limonoide.
10. Uso según la reivindicación 9, donde el limonoide es limoneno.
- 25 11. Uso según la reivindicación 10 en el tratamiento de biomásas para la producción de etanol por fermentación alcohólica.
12. Uso según la reivindicación 7, para la degradación de terpenos acíclicos seleccionados del grupo que comprende: látex, goma vulcanizada, goma no vulcanizada o gutapercha.
13. Uso de la cepa definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o de la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 4-6, como antifúngico.
- 30 14. Uso según la reivindicación 13 en tratamientos post-cosecha.
15. Uso de la cepa definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o de la composición definida en la reivindicación 4, para la degradación de imazalil.
- 35 16. Uso de la cepa definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o de la composición de la reivindicación 4, como biofactoría en la producción de sustancias o compuestos industriales empleando la resina como fuente de carbono.
17. Uso de la cepa definida en una cualquiera de Las reivindicaciones 1-2 o de la composición de la reivindicación 4, como productor de agentes surfactantes en el tratamiento de un compuesto hidrofóbico.
18. Uso según la reivindicación 17, donde el compuesto hidrofóbico es un hidrocarburo.
- 40 19. Uso, según la reivindicación 18, donde el hidrocarburo es diesel.

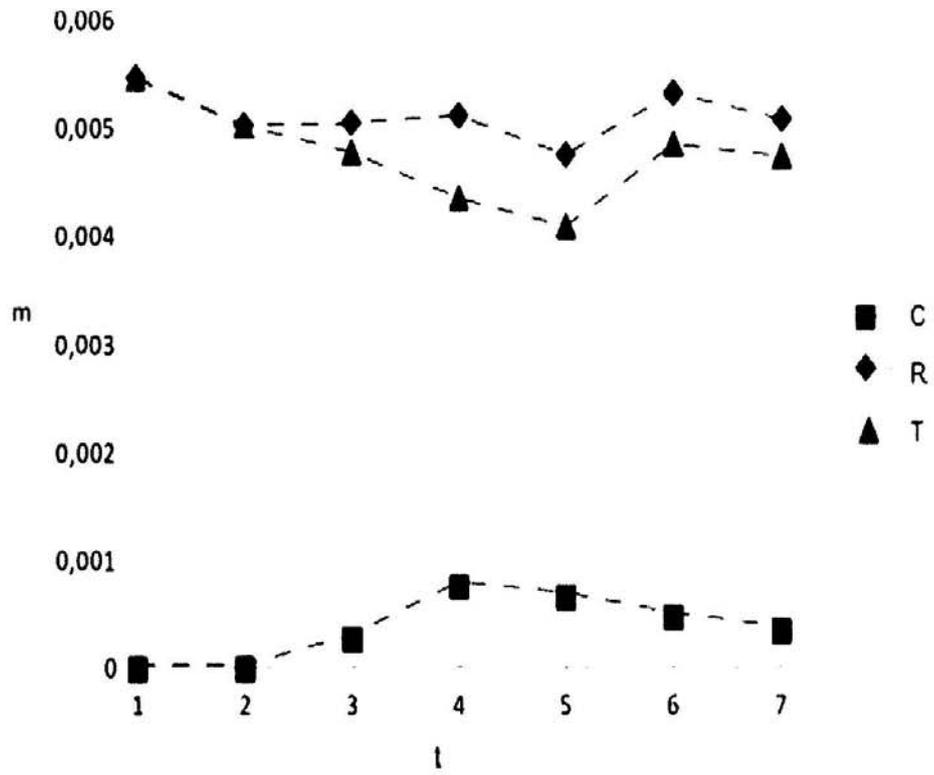


FIGURA 1

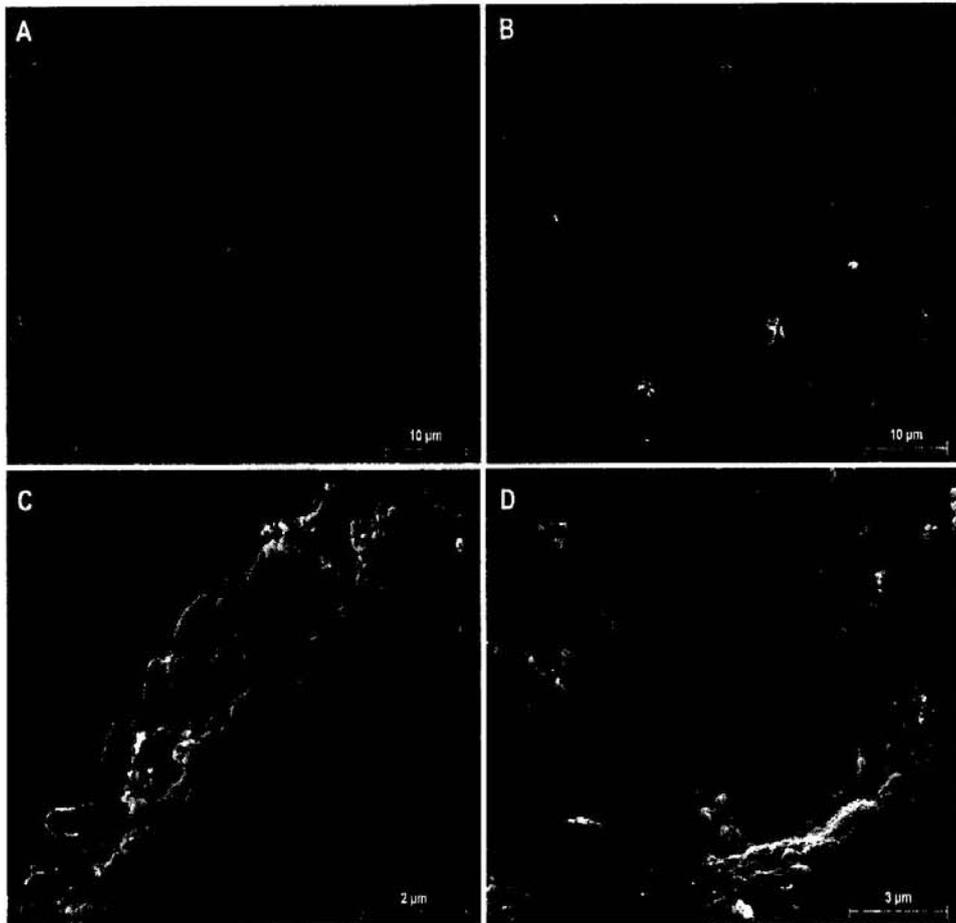


FIGURA 2

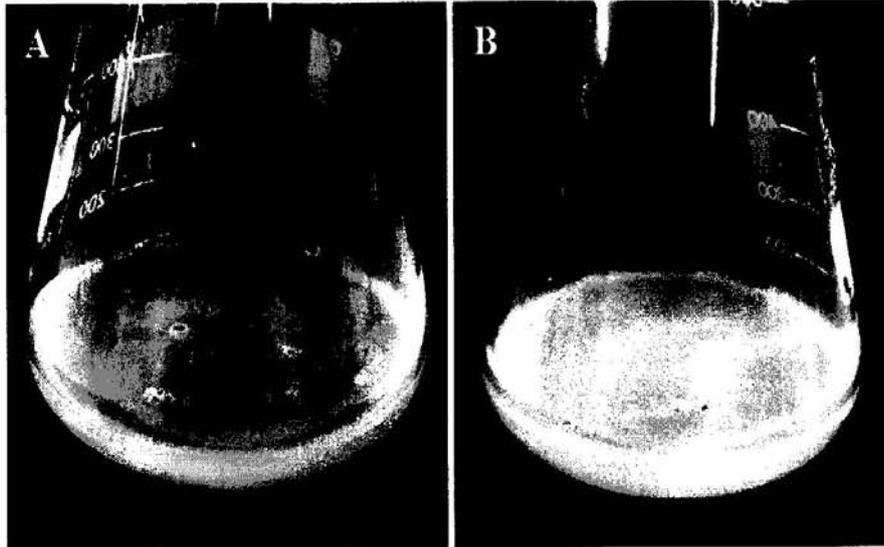


FIGURA 3

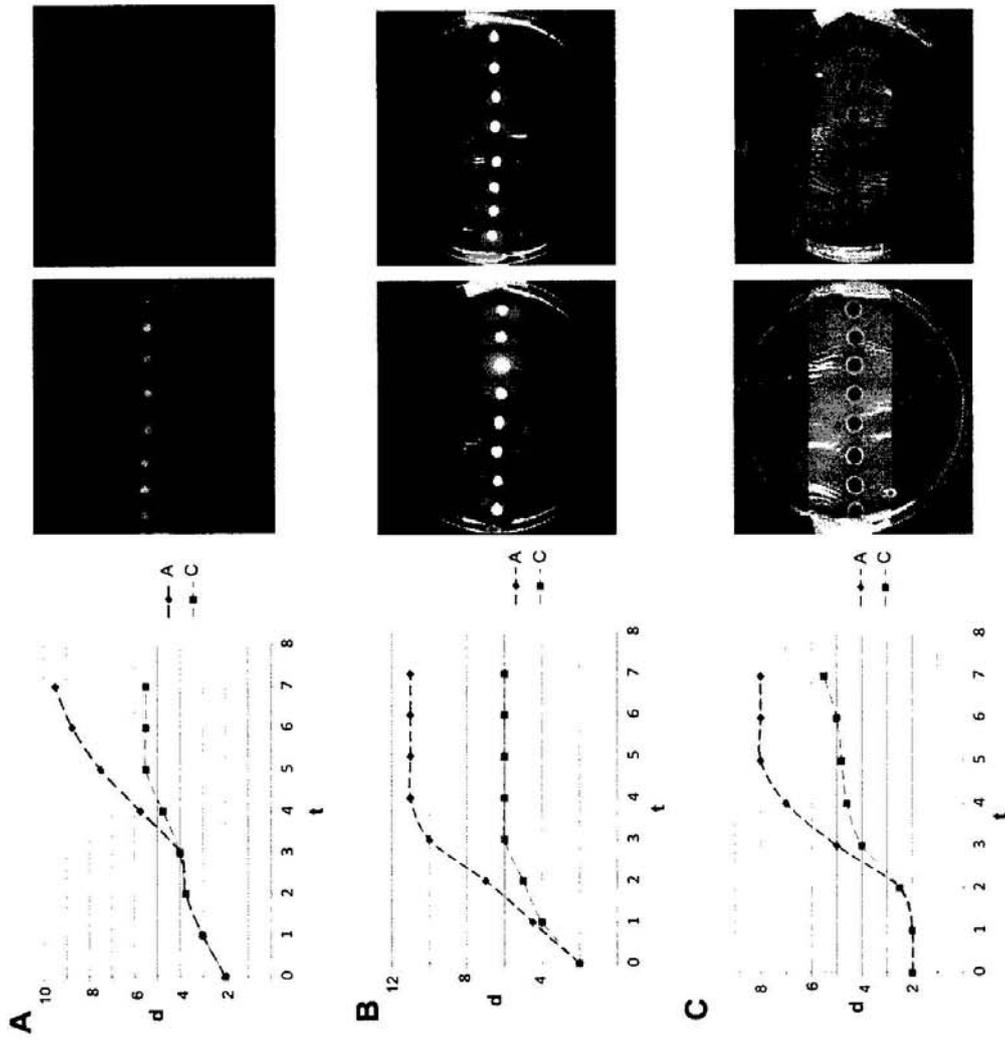


FIGURA 4

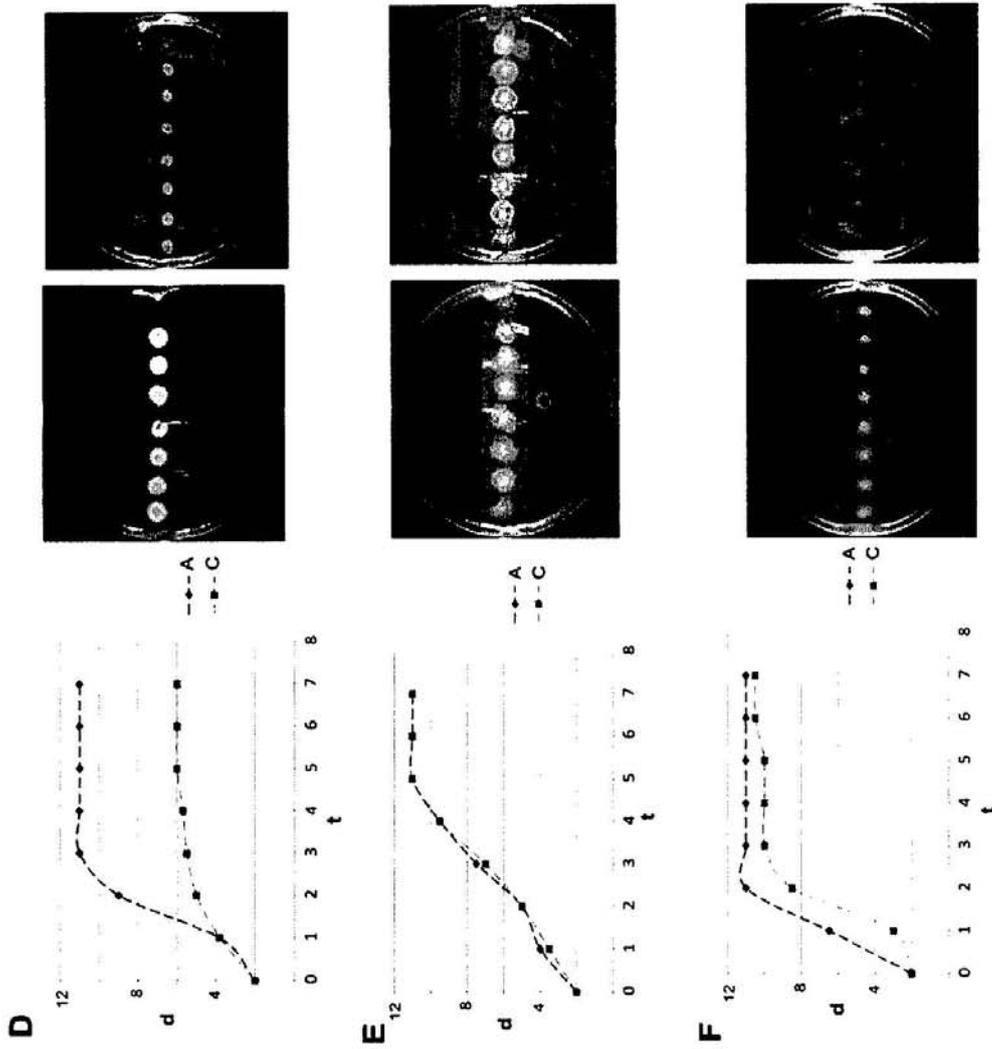


FIGURA 4 (continuación)

Lista de Secuencias

```

<110> Universitat de València
<120> CEPAS DE PSEUDOMONAS SP. Y USOS DE LAS MISMAS
<130> P-06339
<160> 2
<170> BiSSAP 1.2
<210> 1
<211> 36620
<212> DNA
<213> Pseudomonas
<220>
<221> source
<222> 1..36620
<223> /mol_type="unassigned DNA"
      /organism="Pseudomonas"

<400> 1
gcggtctgtc cgtagtgccg caaggcaccc aggatttgct cgtcggctctg cgcttcgaca      60
cccgggggtca gtcagcgac gatgaaaggc ttgagcgag gctgcgccgc caatcgacgt      120
agccagcgca cgagtgagac gccagccacg cgatcggttt cggcaactcag gtaattggca      180
tcgatcagcg gcggaaccgc cggatccgtc gactggatac gtatttcgcc ctggctctgc      240
ggctcgagaa aataaccgcc gagggtcagg ccgggttctt tgatgatcat caccgggtg      300
ccatcaccga gcattgaata caggctgacg ccgatttgcg cgtcgggctg gtccaggcct      360
gcgcggggtt tgacgaagcc cccggcctca tgagccgcat gggatcatcg gcctttcttg      420
cggacaaagt agttgagcaa cgaccgaacc agtccgaagc cggcaaagca atggttaaag      480
cttcacgcg tcacccgata ttgcatggcg atatacaggt gctcgcgag attgcggccg      540
acattggccg aatcgtgac gacattgatg ccaagcctgg tgagcaattc ggcaggcccg      600
atgctgaaa gctgcaagag ctccggtgtt tcgatggcac cggcgcacag tatcgcttcg      660
cacctgatgc ccatgctgtg caaccctgag gcatcgcgca cctgaacggc cactgcgcgg      720
tcaccttca actcgtatcg ctgcacggta ctggccgtcg tgaccgtcag gttgggtcgg      780
ctacgcacgg ggtcgagaaa tgctttggct gcgctgaagc gttggccgcc ccagggtggtc      840
tgcggtggt aaccaaacc gccatgacct actgcgtcca catcgttggg atcggccaca      900
cgcggtgtac cggcctgccc ggctgcagcg atgacggcgt cgcacaattc atcgttgcg      960
gggtgaatgc tgactttcag cgggccgcc gtgccgcgcc acggtgcgct gccagttga      1020
tggtcttcca gcgcgacgaa ctgccgccc atgtccttcc agccccagcc ctgcagcct      1080
tgcgcctccc aggcacgta atcggccgga gcgcctgta cgtagacat gccgttaacc      1140
gaactggaac cgcaattgc cctgcccttg agccacagct catcggccat tcctcacca      1200
cgcgaggcct gatagtcca aacatgcggg ttaccggctg cgagcaactt gccaatgcca      1260
cgcggcatcg agatcaacgg gctggagtgt tccggcccac tctgatcaa cagcaccgag      1320

```

ES 2 525 398 A1

Lista de Secuencias

acactcggat	cgtgggagag	ccggtttgcc	atgacgcagc	cagccgaacc	cgacccaca	1380
atgatgtagt	cataggtttt	gagcattttt	attattctgc	gttgcgacgt	gtgcggggac	1440
tgtagaactg	cactaccccg	tgcacaacgg	acagatgtgc	ggatctgttc	ggtgactggc	1500
gctggcaatt	tgttgcacag	ggtctagcca	ctcttcttgc	tcgaccaga	cgctgtgcc	1560
agtctggaac	ccgtgcgaaa	aagacattct	tcaagaatat	gtccaataac	tctaaaaatt	1620
aaccgcgct	ctgacgtaga	gattcccca	tgaatcaata	cagcccccg	cagaaccaat	1680
ggcctgaatc	cttcgacccc	agcgtgacc	gacacagacg	gcgtgcccaa	cgcacacggg	1740
atctgatgtt	gaccacgatg	taccagttgg	cactggaaaa	ggactatcgg	gaaattaccg	1800
tgcaagacct	gctggaccgc	tcgggtatcg	cgcggtcgac	gttctatgcc	cattttcggg	1860
acaaggagga	cctgctggtc	gcaggctatg	gcgtcatggg	cgaccgggtc	gtcaagccgg	1920
gcacgggcag	cggtgggtcg	cgtgtggtgc	tggacgtgtg	cggtatggtta	ttcgttgcca	1980
cccgcacgca	tgacgcgctg	accacctcgt	tgatgggagg	cgccctgcgg	gagatcgttc	2040
ttgccatct	cgaaaacctg	ctgatcattc	aggctccgca	acacatgaag	cggtatgggg	2100
cctatggggg	cgatgagctg	cgcgccgaaa	tcgctgtgcg	cagcctggtc	ggagggctgc	2160
ttgccatgty	gttatggtgg	gtgcgccagg	actactgcca	tagccccgcy	caaatcagcy	2220
agcgtttcaa	cgccctgatg	agcgcagggg	tctgccccga	aaatccggaa	agcgtactgg	2280
taaccggctg	agcgcagcaga	tttacgagcy	ggctcgccat	gacgccgatg	ccaacgcttc	2340
agggctcatg	ctgggcgcaa	agtacaagct	cagcgcagca	gggatacgtg	gcctgtcggg	2400
cggccatgac	cggttcggcg	ttgagcggcg	tgccaatcag	gcaggcatcg	atgcacgatg	2460
tatcactcgt	aagtctgcga	tattcgccca	cgcccgactt	ttagtcagtg	cgaccaggct	2520
cggcaatcgc	catgtcctac	gcatgttaat	gccccaaaa	aggccctgaa	ctcaggttca	2580
gggccttgtt	ctcagtgcca	actggacgcy	tgagcgaggc	tcaggccttc	agcgcctcat	2640
cgatggcggc	tgtaaacgt	gcgtcatctg	cggccacgtc	cggcgcaaaa	cgcccgatga	2700
ccttgccgct	gcgaccgacc	aaaaacttct	cgaaattcca	cagcacttcc	tcggggttgc	2760
cgtctcgat	gccgtagccc	ttcaggcgt	cgcggaacgg	gccatcgcca	gtggcggaag	2820
gctgggcagc	agtcagttcg	ctgtacaggg	gatgcttgtc	agcgccagca	accgagattt	2880
tcgagaacag	cggaagtgc	acgtcgtagg	tcgtggagca	gaacgactgg	atttcgctgt	2940
cgctgccagg	ctcctgctct	ttgaagtgt	tcgccgaaa	gcccagcact	tccaggccct	3000
cgccatgctt	gctctggtaa	agcttctcca	gcccctcgta	ttgaggcgtc	aggccgcatt	3060
tggaggccac	attgaccagc	agcaggacct	tgcccttgta	ctgaccaga	ttgctggaag	3120
tgccgtcgat	ctgtttcagc	gggatgtcgt	acagcgaagt	gctcatgcct	gtctccttga	3180
atggtgggta	ctttgaccgg	tggtcatgcc	aggacacacc	ttaaagcgtc	cgaccgataa	3240
tttctttcat	aatttccgag	gtgccgccgt	aaattcgcy	aacgcgggca	tcgaccacg	3300
ccctgctgat	cttgatttcg	ctcatgaagc	cgtagccacc	gtgcagctgc	aaaaactcgt	3360

ES 2 525 398 A1

Lista de Secuencias			
cgagcagctt	gccttgcac	tcggagccca	ggagtttggc catggcggcg atgtccggcg 3420
tcaattcacc	ccgcatgact	ttgtccaggc	aatcgtcgcac gaacacccgc agcatggtcg 3480
cctgagcctt	ggcctcggcc	agcttgaagc	gggtgttctg gaaatccagc accggcttgc 3540
caaacacctt	gcgctcacgg	gtgtactcga	tggtttcctc cagcagggtg tcgatcgact 3600
gcgcgcccg	aatggcgatg	atcaagcgct	cccattgcaa ctgatgggtg aggtatttga 3660
aacctatgcc	ctcttcgccc	aggcgattgc	cgacaggcac ccgacctga tcgaaaaaca 3720
actctgaggt	atcctggcct	ttcagaccga	tcttctccag caagcggccc ttggagaacc 3780
ccggacggtc	ttcttcaacg	cacaccaggg	tcagttcctt ggcgatggga tcgagcttgg 3840
tcgcggaac	caccagaccg	gcgttgccac	cgttggtgat gaaggtcttc tggccgttga 3900
cgatgtattc	gtcgtcctcg	cgcgcaacg	aggtgcgcac cgaacgcagg tcgctgccga 3960
tgcccggttc	gctcatggcg	atcacgccga	tcaactcacc gctgacctg cgcggcagcc 4020
acttctgttt	ctgctcctcg	ctgccatagg	caacgatgta cggcgtgacg atctcggagt 4080
gagtggtgaa	gcccacggcc	gtggcattgg	cccgggccag ttctctgatc atcaccgccg 4140
aatgcccga	gtcgcctccc	gagccgcat	actcctcagg gacggtgaa cagagcaagc 4200
ccgtctcgcc	ggccttgagc	cacagctcct	tgggcacgat gccgtttttt tcccactcat 4260
gcaggtgcgg	cagatttcc	cgctcgacga	aacggcgggc ctgatcacgg aacatgttgt 4320
gatcttcacg	aaagacgcgg	cgcatgacgg	ttctcccctt accttcttat tgttgtcag 4380
ttacttgtcc	tggtagctgg	gcgcgctt	ctcgacgaag gcggccacgg cttcctcatg 4440
gtcggcgggt	tgatgagcga	tggactgata	ggcggccgac agttcgagca gagaatccag 4500
gcgcatatgc	tgacctcgc	gcagcagccg	tttgacacagg cgcaaggcgt ggcggggatt 4560
actggcaatg	cgcttgcca	gcgctgggc	ctcggactgc agggtttcat gggcgcagac 4620
ctgttccacc	agtccccagt	ccagcgctt	ggtcgcgtcg atggggtcgc cggtaaaagc 4680
catcaggctg	gctttgggaa	tgccgatgat	gcgcggaac agccaggcgc caccgtcacc 4740
ggggacgata	cccaggcgca	cgaaactctc	ggcgaacacc gcggtgggcg acgccaggcg 4800
gatgtcgcac	atgcaggcca	ggtcaagtcc	ggcggccgat gccggcccgt tgacggcggc 4860
gatgatcggg	atgtccagct	cgtaacgcgc	cagcggaatg cgctggatgc cgtcgcgata 4920
ggtgtcgcgc	agttcataag	gctgaccggc	gaagatgcca ctgcgctcgc gcatgtcctt 4980
gacgttgccg	ccggcgaga	acgcgctgcc	attgccggtc agcaccatca ctgcgcccgt 5040
gcggtcacgg	cgcaggttcg	cgcacagttg	cacgaattct tctatctgtt ccggcgaggt 5100
cagcgcgttg	cgagtgtccg	gatggttcat	gcgcacggtc acgacagggc cttcacgctc 5160
gatgtgcaaa	aacgcggcca	tgccgatact	ccacagcttg agttgtcagt catcaatggc 5220
cagaaacctt	cgccacctgc	cgcgagacc	tgggtgccta tcctctggct ccagtgcgtg 5280
accgagccga	attcaccacg	ccaggccac	aatctacggg tgtacaactg caaggcatat 5340
tcctgggtaa	aaccgatggc	gccgtggacg	gcgtgggcaa tattcgcgcc ctgggtggcg 5400

ES 2 525 398 A1

Lista de Secuencias			
gcctcggccg	tggtgacctt	ggccacggca	accgaaaacc agttcaatgc ccggtcggat 5460
tcggcaaacy	ccgcttctgc	ggcgctgttg	gcagccgcag cctgctcggc gaacaccgcc 5520
agttgctgct	ggatcgccctg	aaacgctccg	atgggtttgc caaactgatt gcggttgaccg 5580
gcgtaactcc	ccgctcatgtc	aagcaacgtg	ctcaaggcgc ctgcaatctg tgcgctgcgc 5640
atcagtgccc	cgccggtttg	cagcacttcg	ctgttcagac cgctgggcag cggcgcgcgg 5700
tccagcaccg	tggcttcgct	gaaaaacagt	gcatcccggg gttctccggc aatggtcaag 5760
ctttgttcga	tacgctgagc	ctgcccgcgt	gccaacacca ccagcatggg cccgccagca 5820
tcgctgtcgg	caatggcgac	aaccgattcg	acatgccgcc cccaggggac atcaggcagc 5880
accccgtca	cccgtctcgc	attgagcaaa	agcctagggt tggcgcagat gctcaagctc 5940
cccgttcgcy	gctcaagccc	gcagcagccc	aacaaccagt tggctaacag cgcctcggtc 6000
aacggcacgg	gaacggcaaa	tcgccccgcc	gctcgcgcga tcacgtaaag gtcggcccag 6060
ccagcgtcgg	ccccaccag	ggattcaggc	gcggcggcca gggtaaagcc agagtcttcg 6120
acggcttccc	ataacgccgc	aggccatacg	ccgccttcgc tggcgttgac cgtttcactg 6180
tccacgccgt	cgctgagcag	gcgttcgatg	gtggattcaa ataattcgcg catgattatc 6240
gcaaccccag	gccacgggcy	atgatcccgc	gaagaatttc gcgagtgccg ccgcycaatg 6300
aaaaagaag	cgccatctgc	gtcagatacy	ccagaacctg tgcgtgatcy cttccaccgc 6360
gctgcccagg	ttcgatgtcc	agcaatcgtc	gcgcaagctc agggatgtcc tgcctaaagg 6420
tgttaccag	atccttcacg	caagaagcgg	cccacgccgg gtgttcaccg ttggccagtt 6480
gcgccgtaac	cgccagtgac	atgttgcgca	gtgtcgcgag cctcgcctg aggcgaccga 6540
cttcagacgc	ctgcagcgcy	tcgggttggc	taccgatggc atcgatcatg gttttgatca 6600
acgccatgga	actgagaaaa	cgttccgggc	cgctgcgctc gaacgccagc tcggccgtga 6660
cctgctccca	gcccttgccct	tcgttgccga	tcagcgcate atcggccagc actacgtcgt 6720
cgaaaaagac	ctcgttgaaa	tgctcgcgcy	ccgccagatc gcgaatcggga cgcacggtga 6780
tgccgggcaa	tcgcaggtcg	acgatgaatt	gcgacatgcc ttcgatcccgc ccgttctgct 6840
tatcgcgggt	gcgcagcaac	gcgatcatgt	agtgggagtg gtgagcgttg gtggtccata 6900
ctttctgacc	gttgaccgcy	cagccctcag	cgctcgcgaa tgcgggtggag cgaatggagg 6960
ccaggtccga	accggagccy	ggctcgtca	tgccgatgca aaaatagctc tcgccgcgac 7020
agatcgcggg	caagtagcgg	tctcgcgtgy	cgggggtgcc gaatttggtg atcagcggcc 7080
cgctttgccy	atcggcgatc	cagtgtgccy	acaccgggtgc gccggccgcy agcagctctt 7140
cgctgacgac	gtagcgcgca	aagaaaccgg	cctgattgcc tccgtattcc ttgggcagcy 7200
ccatgccgag	ccagcctttg	gcgcccagcy	ccttgctgaa gctggcgtcg aagcccatcc 7260
aggattgtgc	tcgctgtcgy	ggcggataat	cggccagcgt atcagcgaga aagcggcgca 7320
cctcggcgcy	caacgcttct	gcctcagcag	gaatccggct gtaggtaaatt tcattgatgg 7380
ccatgaatgc	tctcgaaaac	tgggcatgca	aaacgcggaa aagacatccy caggacgtgc 7440

ES 2 525 398 A1

Lista de Secuencias						
gtgaccgttt	cgttcattcc	cgacctgtgc	gtggcaggtc	gggaatgaac	gcgcggtatt	7500
tacagcgcgg	tttgcgctc	ggctttttcg	aacatcgc	tgatgtcgcc	ggaggtcacc	7560
ggcttgccgt	cttcacgacc	atgatcggcg	ccgccaaggc	ccagggcccg	ctcgactttg	7620
acgtgagtgg	cttgcgcgcg	cagggcgcca	acgggtcagt	tctcgcgtcc	caggatggag	7680
aacggatcgt	acgagaactc	gcgcatggca	ttgaggtggg	tcagcttgtc	gatggtctgg	7740
tcgggaagat	gcttgaggcc	ttcccatgcg	gtttccggcg	actccggcca	ggtgcagtcg	7800
gaatgcgggt	aatcgtcttc	ccaagtgacc	atgtcttcgt	tcatgaagct	caggttctgc	7860
aggccgaact	tgtcttcaat	gaagcaggtg	atgatgtgct	tgtggaagat	atcgtctggc	7920
atctgcccgc	cgaagttaga	attggtccaa	gccttatgat	ggcgatgggt	gaagtcggca	7980
cgttcgagca	ggatggcac	ccaaccgatg	ctgccttccg	agagcgccat	gcgcaggtcg	8040
gggaatttct	tccacatcgg	cgcccagatc	cagtcggctg	cggagttggc	gatggagatc	8100
ggcatggaag	tgatccacgc	gtcgatgggc	gacaggtccg	aagcgtgatt	ggccttgacg	8160
ccggtgccga	tatggcagca	gataccacc	ttgttgcg	aacaggcttt	ccacagcggg	8220
tcccagtagt	cgctgtggat	cgatgggtaa	ccgtggatgg	ccgggttatt	ggacagcgac	8280
agtgcgtgta	cgccctgcct	tgccatgcgg	gtcacttcgg	cggcggcggc	ctgcatgtcc	8340
caccacggca	ccagcatcaa	ggggatgaaa	cggcccggcg	cggcattgca	ccagtcatgt	8400
aagtgccaat	cgttgtaggc	ctggatcgca	gcgaacgaca	catcccggtc	ggcatggacc	8460
tggaagcgct	gcccggcaaa	gccaggggaa	gtcgggaagc	acagtgagcc	caacacaccg	8520
ttggcgctca	tgatcatccac	gcgatccttg	atgttccagg	tgccacgacg	catctggtcg	8580
taaccagggg	gctccatgcc	atattcttct	ttcggacggc	ccaccaccga	gttcaggccc	8640
atgtagccgg	tagcctgttc	ctcgaagacc	cagacatccc	ggtcaccggt	tttcaactacg	8700
tgccgctcgc	gacctttgaa	gcgtgcgggc	atgtgacggg	cgaacgcatac	tggcggttcg	8760
atggcgtggt	cgtcgacgct	gacgagaatc	agatcatcaa	ttttcattgt	tcttcccttc	8820
tcaacggggt	gtttgttgtt	gtgcctgaat	catagatcac	cattggttta	aattaaacac	8880
tttatttgat	tgtgttcata	taaattcggg	tgaacgcggg	agctgcagcc	gcgcataaaa	8940
aaccgcgccc	ttgatgggcg	cgggttcggc	ggatcgacag	cggttgggcg	gtggatcagt	9000
cccagatcac	gtgaacctcg	tgagggcccc	gcagttgcgc	gccgacgatc	tgtggcgcg	9060
gtttatcagg	gtccaggcgg	atattcggca	tcagggtcaag	aattgcgctg	agcgcgcagt	9120
tgatctcggg	cttggcgacg	aactggccaa	tgacatgtg	cgggcccagg	ccaaaccgga	9180
atgaaggccg	cggcttgca	tcgatatcga	atcggtcagc	gttctcgaac	gcatcttctgt	9240
cgcggttggc	cgacgacacg	atgcactgca	ccatcgcccc	tttggggatc	ttcacaccac	9300
ggatttcagt	gtcctgcgcg	gtctgacgta	ctttgaaggt	cgccacgggc	tcgaaacgca	9360
cggcctcgtc	gatggccttg	ttcaccaggc	tgcgatcggt	gcgcaccggt	tccagggtct	9420
gcgggttctg	cagcagcaag	gtaatcaatg	taccaagggt	gcgcgctcgtg	gtttcgctgg	9480

ES 2 525 398 A1

Lista de Secuencias			
ccgctggcag	caaggaccgg	acaaaggtcg	cgatttcgatg gtcattccaga gaacggccct 9540
gatattcggc	gctgatcaaa	cgactgatca	ggtcgtcacc gtccgctcct cgcgcgcggc 9600
gctcggccac	caccactttg	accacgtcat	acagcgccctg ggcggcatgc atggcggcac 9660
cgcgtcgggc	ggcagccttt	tctgggtcga	cttgcggccc ggcaaggatg gccagcggcc 9720
aagcggcgta	ctgctcgatt	tcttcgggct	tgtcttcagg aaaaccgatc agggcataga 9780
tcacccggt	cggaataac	agagcgaagt	ccatgaggtc cgccgacttg gctgccacta 9840
gcggttgat	gtattcgtcg	cgaatcacc	ggtcgatctt ggtttccttc cagcggttga 9900
ccgtctctgg	catgaacacc	ggctgcagca	gattgcggat attcttgtgc gcatcgccgt 9960
ccatcgccgt	gagaatcaag	ccgtcgaaga	aagcccccac cccttcggcg atgaaccgcg 10020
tggtgaagt	tttcgctcg	cgcattcacc	ccatcacgtc gtcattttg aacagcgtga 10080
aggcgggtcg	attcgggtcc	aggccggcaa	tcgatggcac gccaaaggctg gccatgaagt 10140
tgccttcgag	aattggcgtg	gtcctgcgca	tctcggcgta gaccgcttgc aagtcaacat 10200
cgtgccacg	gtaattactg	gcgacgttgg	cgaactccct gttcagattg ctttgcgcct 10260
gaacggacat	gatcatctcc	tctcttgttg	tttattatgg gtcgatacgc ccggtggcaa 10320
gaccaggttc	agccaatata	ggcgaaatgc	tgaacgtaat ggccgaatct gactcaataa 10380
tcccttgata	aggccgaatc	agtcaccagc	agggtgtcaa tccagccgct cgatgatggg 10440
cgcggtgcc	atgcccggcg	cgcagcagat	ggcttgcagg ccatagcggg cgcctcgtcg 10500
ctcagactca	tgagcaagg	tggtcatcag	gcgcgcgccg ctggcaccca ggggatgacc 10560
cagcgaatg	gcccaccat	tgacgttgag	gcggtcatgc gccacaccgg tttcccgcg 10620
ccataccagc	ggcaccgggg	caaacgcctc	gttgacttcg aacagatcga tgtcgttgat 10680
gtacagccc	gctttcttca	gcactttggc	tgtggcagcg atgggcccgg tcagcatcag 10740
cgtgggtca	gcccctacgg	tggtgaacgc	gatgatccgc gcccgagggt tcagcccctg 10800
gcgccgagcc	gcttcagcgt	ccattagcaa	caaggccgcg gcgcccgtcg atatctgcga 10860
cgagttgcca	gcggtgacct	tgccgttgtc	cgggcggaag ctggttttga ggggtggacag 10920
ttttcgcgt	gaggtgtcgc	ggcgtatgg	ttcgtccgac agcaagcccg cagtcacctg 10980
cgcattcgtt	ttttcgcgta	acgcgtgcac	cgggacgggc accagctgac tgtcgaataa 11040
gccagcgtcg	ctggcctcgc	cagcgcgctg	atggctgggt atggcgtaat cgtccagatc 11100
gtcgcgactg	aggttccagc	ggtcagcaat	gcgctcggcc gcctcggcct gactggtcag 11160
ctcgtaacgc	tcgctggcca	tccagccgaa	cgctcggccg tgcaggctgc ggttgetgcc 11220
catgggcacg	cgactcatgt	tttccgcccc	ccccgccacg ataatgtcgg ccatcccggc 11280
ggcaatgaag	cctcgcgccga	catgcaccgc	cgcttcgcca gagccacact tgcggtccag 11340
ggtcaggccc	ggcacgctct	ctggccagcc	ggcaccgagc aacgccgtgc gcgcatggt 11400
ggccgactgc	tcgccgatct	gggtgacgca	accgaagatc acgtcatcca ccgtcccgg 11460
cgaagatca	ttacgctcga	ccagcgcatt	gatcaatagc gaccccagggt ggtcggcgcg 11520

ES 2 525 398 A1

Lista de Secuencias

cacgctggcg	aggctgccgc	ggaaccggcc	cacgggctg	cgcaaggcgt	cgatgatcac	11580
gacctctttc	ataacacgct	ccctttcagg	ccactgccag	gcaactgcctt	attgtcttca	11640
tagcgataga	cgccgtgccc	ggtcttgcca	cccagacgcc	ccgccgcgac	catcttgata	11700
atcaacgggc	atggtcgaaa	cttctctccc	agggctctgt	gcagataacg	cagcaccgac	11760
aatcgctgt	ccaaccggg	caggtcggc	agttccagcg	gccccatggg	gtggttaaaa	11820
cccatgcgca	gcgagtgct	gatgtcctcg	gccgtggcaa	taccttctcg	cagcatgtac	11880
atcgcttctg	tgccgagcat	cgccgacatg	cggctgggtg	tcagccccgg	cgactcgttg	11940
acgatgatcg	atgtcttgcc	catggcatcg	cacaaatccc	gcgtgcgagc	cacggtttca	12000
tcgctggtgg	ccaagccgcg	caccagctcg	accagtttca	tcttgctcac	cgggttgaaa	12060
aagtgcctgc	cgataaacag	gtctgcactg	tctatcgacg	ccgcgatctc	ggtaacgctc	12120
aatgccgaag	tggtgctgc	gatgatcgca	tcgggcgcca	gcaacggcgc	tgcttgggcg	12180
acgatggcct	ttttgattgc	cagttgctcg	gaaaccgtct	ccaccagcca	gtttgacca	12240
ctggccgct	cgctcaggtc	gctggctgtg	cttagcctgg	ccagcgcagc	cttcgcttgt	12300
gcggtactga	ttttgcccaa	ggacacgcca	ctggtgagaa	tcgcttcgat	ggcaccgcgg	12360
gccttgggtca	atgactgggc	attggtgtcc	accagaaccg	tttgagccc	tcgctgaca	12420
aagccgtggg	cgatcccggg	gccccatcagc	cctgctccga	cgacgaccac	ttgtttattt	12480
ttatcgatac	tcagccgag	acctttgatt	ggaccagtga	cttttcacc	acgacattgc	12540
gcaaggatcc	gatccccctca	acgctggctt	cgaccacatc	gccccgattg	aggaagatgc	12600
cggtgccccat	gccgaccccg	gctggggagc	cgggtgaagag	cacgtcgcca	caggcgaaac	12660
tcgagcgtg	ttgaacgaaa	gcgatcagct	caccacatc	ccaggtcatg	tcggccgtgt	12720
tgccgtcctg	gcggtctgc	ccattgacct	tcaagagcag	gcgtaacctg	ggcgaaccgg	12780
cgggaagttc	gtccttggtc	agaatccacg	gccccagccc	gggtgctctg	tcctggcttt	12840
tggccgcgaa	cgatccatg	ccgatgccct	tgggaccact	gcgctgaagg	tcgcccggcg	12900
tgacgtcgtt	gcccacgggtg	tagcccaata	cgcaggccag	tggatcgtcg	aggtcgaccg	12960
tatcgggtcc	gatcaccgcc	accagttcca	cttcatggtc	gagttcggcg	gtcagcggcg	13020
gaaagcggat	cgggtcgtgg	gcgccaatca	gcgccccgta	tgcttaaga	aacgccaccg	13080
gctgtgacgg	tgagccagg	ccgaactcga	ccagatgctt	ggcgtaatg	gcacctgcca	13140
ccacgacgcg	attggtgggc	tcgaccgggtg	gtaacagcgt	aaccgggat	aaaggcagtg	13200
gagggccgga	aaaacgcagc	gcgctgatac	cggcaccctg	cgcaaccttc	ggcggccact	13260
cgcgaaaatc	accgcgaatc	ggcgtcacca	tgctctgctg	cgcatcgacc	accgcccaga	13320
acacgccgct	ctcgaaatag	gaacagcggg	ccagtttcat	cagactgctt	ccttggcagg	13380
ggtgacctga	cccacacgag	ccggatccag	atgcagcaac	ttgcacgcat	tctgccaacg	13440
gattttctgc	aggtcggat	cgctgagttt	caggccttcg	gtgaggtcgt	gacgcaccgc	13500
atcgctgcca	ccgaagttac	tgccatagac	catctggtcg	gcaccgatca	cttcaatcag	13560

ES 2 525 398 A1

Lista de Secuencias				
cgcttggcgc	atcggcagtt	catgcagttc	gacgtcaaaa tagaagttct tcatgtaatc	13620
gagcacaggg	cgtttgttgt	gcaccacgtc	caggttcttg ttggtctgcg ccaggcggcc	13680
caactggtac	gggacatagc	cgccaccgtg	agtgatgtac accttaaggt ccgggaagcg	13740
atcgagcacg	ccgccacaga	tcaggttcca	gaagcagcgg gtttcgtcgt actgcatgcc	13800
gacgatcgcg	gtggtttcat	aacggtcttc	gttggcgcga tcaccccagg tcaccgactg	13860
gttataaccg	tggatgaaca	tcggcaggtc	gagatcacag agggctcttc agaccacgtc	13920
aagttctggc	gagtcgaatt	caagcccgcc	gaagttggcg ccgccggcag aaagcccctt	13980
ggcgcccagc	tcggtgcagg	cacggcgcaa	ttccacggcg gcggcctcag gcgcgttcag	14040
cggtgcatgc	gcccagaaca	tcagacggtc	cggagcggcc gagcaatatt cggcgaaggt	14100
gtcattcact	gtgcgggctg	acggaacggc	gtattcggct tcggtccagt acatgtagca	14160
gtgggacgga	accgagacca	cttgacggtt	ctgaccgcga gcatccatgc ccgccaggcg	14220
aacttttggg	tcggcccact	tggccatgta	ttcctcgagc ttgagcccct tgccagcacg	14280
cacggcggcc	ttgcgctctg	gcgagcccag	ggtcaattgc catttaccga cgcgcaggcg	14340
gatatcgccg	tcatcgcaact	gttcgaaaaa	cggaccccaa tegtgggtgct ggttgtaata	14400
gccagggagc	ggcgcgtggg	cgtgaagatc	aataagcata atccgggacc tctacgtgga	14460
aaccttctgg	tttttgtgat	tgttctgggt	gttgcaactc ccaaagcacg gcgcctggag	14520
ccctcgacgg	gcggcccggc	aagtcagctc	aatcggcttc ggtctgctcg aagcataaaa	14580
ttaatttggg	cataaatcaa	aatagtgttc	agattaatth caaaatttgg cgttgaggac	14640
cggaccagag	cgctccttgc	ccttcgctcc	ctgctgggtt tgcgcaaca tcacagaaa	14700
aactgcacat	atcgcaatth	gaagacgaaa	aaaaaccgac ctctgtgacg ccagggggccg	14760
gtttgctttt	ttatgaaagt	gtctaaataa	gcacttcagc gccgagtacg tgaagtcgac	14820
cccattggtca	tggcggcggc	cagcttcttg	accctaccg gcaacaagcg gcgactggca	14880
ctttccggta	ccaggatttc	actcaagaca	tagcggatga tcatttcaca caacagctct	14940
cgggtccagac	gcacgccgag	tttctcatcc	caatcgtcaa agacgatgth cagcacgtcc	15000
tgaaaacgca	cgatcgaatc	atgaaaaata	cgctgaaga agcccagcgc ataatccggc	15060
gcgaccacga	gcaaaccggc	tgcccggctc	tgctccaggt agttgtccag gtacacgaac	15120
aacgcgthga	gccgcgcctc	ggggtcttct	atctgcccga gcgcgcgggt cagcgagacg	15180
tggaagctgt	cgcgcttgtg	ccgggaaaac	gtatcgagca ggtcttcctg agaagagaaa	15240
taacgataga	acgtgccacg	cgaaacgcct	gcgaccttgc acacgtcgag aatcgagatg	15300
cggctcggcac	ccgactgcag	caccacctct	tcggtggcaa ccagaatatt ggcaatggtt	15360
tcttccgacc	ggcgattggg	tttgaccttg	accggccctg cagcacctth actgccagcg	15420
cttttcgagg	ccggggctth	ggtggctgta	cgagcggctt ttgcaggagc agggggggtc	15480
tttttcgagg	cgctgacggc	ctttggcccg	acgggtttgg cctgthgtht tggaggtctt	15540
ggcatggata	agcagactcg	tggacatttc	gatgggccac ggtagcatac gaattaagca	15600

ES 2 525 398 A1

Lista de Secuencias			
tttcgcgag	aatttggtca	acttcgggct	agagactttt ccaaaatctt tccatagaat 15660
ccagttctct	catcaaaaaca	agattcgggc	gccctcttca ttgcgcgcct cacaaaagga 15720
gaatattcat	gagtggcacc	gggaaccccg	aagcctggac ggtaggtgaa cgagacacgg 15780
tcatttctgc	gctggagcga	gcggtagcga	gggctccaga taaggttcta ctggatttca 15840
gcgcaacctt	gtacacatac	cggaagttg	atcagctttc caacaggatg gcgcatgccc 15900
tggccgatct	gggggtctgc	gccggtgcca	cggtgctgac catgcttgac aacaacatcg 15960
acgcggtcat	cacctggctg	gccatcaaca	agctctgctc cgtgagcgtg ccgatcaata 16020
cggcgctaaa	gggtgagttc	ctgcgccacc	agattgctga caccggtaca cacctggtga 16080
tctgcgaagc	cgactatctg	ccacgcgtgg	ttgccatcgc cgaccaactc actgatgtga 16140
agcgcgtact	gttccgcacc	gcacctggtc	agcagagcag tgagtggcct gtctgcccct 16200
tccccatcga	acctctggat	tcccatcgtg	gcatggatga ctccgcatc gagcgaagc 16260
cccagccatc	ggacctcgtc	tgctgatct	acacctcggg caccaccggc ccgtccaagg 16320
gctgcatgat	cagctataac	ttcatgtgca	acctcgcctc actgcaattg cgcgccggcc 16380
ctgcgagcga	gaacgacgtc	acgatcacc	ccctgcccgt gttcacatg aacgcccttt 16440
gcgtgagcat	catcgcacg	attctggtcg	gtgccgcgc ggcgattctg ccgcgctttt 16500
ccgtgtccaa	cttctggccg	gaagtcgagc	gctccggcgc gaccatcgc tcgatcctcg 16560
gcgcatggg	tgccctgctc	gcgcaagccc	ccgacaacga cgccatgctg cgtgcccgcg 16620
ggcagatcca	taccgcacgc	ggcaaccctt	acaccgaaga gaccaagaaa atctggcggg 16680
aacgcttcg	cagcaagctg	gtgggcggca	acggctacgg gctgaccgag gcctgctggt 16740
tgacttcgct	ggcggcgggc	gaatacgcag	cgccgggttc gtcgggcaag cgattgccc 16800
atctcagcgt	gcggatcgtc	gacgaacagg	acaacgaagt acccgccggc acaccgggcg 16860
agatcgtggt	caggccgcag	cgcccgaca	tcatgttcca gggtaactgg cgccgccccg 16920
aggacaccca	caagttgatg	cgcaacatgt	ggttccacac cggcgcgctc ggcaagttcg 16980
atgatgacgg	cttcttctac	ttcgtcgacc	gcaagaagga ttacctgca cgccgcggcg 17040
aaaacatctc	cagtttcgag	atggaagcag	cgtttgccac ccaccggcg ctgtcagaag 17100
tggcgggtgca	cgagtgctt	tcggacaagg	gcgaggatga cgtaagggtg accgcagtgt 17160
tgcatgagca	taccagctg	gcgccggaag	cactgttcca ctgggccgcg gacaccgtgc 17220
cgtactacgc	gctgcctcgc	tacatcgaat	ttcgcaccag cctgccgaaa aacccccagg 17280
gtcgggtgct	caagtacctg	ctgcgcgatg	aaggcaagac cgccaccacc tgggaccttg 17340
acgacaccga	catcaaggta	gccaacgct	gaaaggccat gcggcgtgcc tggcacgccg 17400
catcccttc	cgccgactca	gtattcgcgc	gcggggatgt gtgcgggtcg cgagttgtag 17460
cctggcaagt	gcaaaccacc	gtccacgtgc	agggtttccc cggtgacgaa gcgagacatc 17520
tcggaggcca	gaaacacaac	caccggccg	atgtctgctt ccgatcgc acaacgcccc 17580
agaggcgca	aaccggcgga	catttcagca	aacccggat tctcttctgc cagtttgtga 17640

Lista de Secuencias			
aaggtcgccc	ccatcgcggt	cggcgctatc	gcattgaccc ggatattgaa gcgtcccat 17700
tccgaagcag	cgctgcgct	cagccccacc	actgctgact tggcgggtgtt gtagtcgccc 17760
tgcagccatg	cgccgacttc	ggtatcgatg	gagtaaaagt tgatgatctt gccgccaccg 17820
cgcgctgca	tgggcgcaaa	cgagctttc	atcgaccacc aggcgcccga taccgtggag 17880
ttcagcgtgc	gctcaagcat	gtcgtcggtc	ttttcttca gaagcacgtt gggggtgggc 17940
gcaaaggcgt	tggtgaccag	gatgtccagg	ccaccgaagt gctcgaccgc agcgtccacg 18000
gcgccctgaa	tgctcgctt	gcaactgacg	tcggctttga tgaacaaagc ttgtgcacct 18060
aacgccttga	gttctctgac	caccgctgcg	ccgctgacct cgctcgagttc tgccactacc 18120
acggcagcac	cctgcctggc	gaagctcaat	gccacacctc gcccgatacc cccgccggcg 18180
ccggtgatca	gcgccacttg	ttctctcagc	aggccatag ccgctccttt ttgttgttgt 18240
tggaaaggca	tttcatcact	gtatatgtga	acattatccg atatagtgtc caataaaac 18300
cgataaaaat	gcacactcag	ccagataaga	aggataagcc ggatgagtac gtttcgccgt 18360
cgctcgaga	tcgtttccag	tgccagaca	gacggcgggc aagtctcgcc cgccctggaa 18420
gacgatttcc	atcacttccg	cgctcagctg	ctccatcgcc acggtgtgct gacgcacatc 18480
accggtcaag	ccgtgaggta	cccctacacc	gcctgtcccg aagccatcga acccttgac 18540
gcgctggtgg	gcatggcgct	gtcgcccatc	gcccattcgg tgacacgtca gactgacgcc 18600
cggcatcaat	gcacgcactt	gctggatctc	gccggcctgg cactggcggc gacgctgcga 18660
cccgcgcaat	ccagacgcta	cgatatccag	gtaccgctgc gcgtggaggg ccgaacacgg 18720
cccctccttg	agctgaacgg	cgagcccctg	ctggaatggc aggtccaggg cgcaatcatc 18780
gagggccccg	caccgttcac	cgcggtgaac	attcgcgaag gcatggcgcg ctgggcactc 18840
actaccctcg	accggagct	tgcaagaagca	gcgctgctat tgcggcgctg caccatgatc 18900
tcaatcggca	agacctatca	tctggatgag	cagattcacg cctccagcac tgatcgctgc 18960
tacagccagc	agtcggtccg	cgcgcccgag	gcgtggcgta tgaagggatc gacctgggat 19020
atcgccagca	atgaagcgct	gtgtgccact	gaccaggctt ggctgaaaga gcgcagccac 19080
gcatccccgt	aactctctta	accaatacct	tgctggaaaa cgcgcaaaaa aacgcccgt 19140
gaccaaggtc	agcgggcca	agggtcgaca	caatgaacgt tttcagcaac ctggacgttt 19200
agaggaacac	cgccaggttc	gggggtgccc	ataccgctg atcgaggatg acctcgctc 19260
gggcaagttt	gaaactgtca	ccctctcgcc	gcagcagatc acggcgttcg cactgatga 19320
tgctgacgtg	gtgatccttg	aagcggctgc	gggtcagcag caggtaactg gtgacaatga 19380
actcatcgcc	cttggcggtt	ttctcgacga	acacattggt caccagccgc cgagtccgtg 19440
acggcggatc	ttcagcccag	gcgctcttgc	ccgagagccg caagatacgg cccatgatcg 19500
agcggtagtc	atcgtggtaa	tgctgaacgc	tgcgcacgat ggtggtggac agctctgcgg 19560
cgggtcgagt	gtggcgacg	ggcacggtat	agatgaggtc ggtcgccagg cgagaagccc 19620
attctctcag	gcggatctga	tccagcagcg	tggcctcttc ataaaggaag gtgacgacct 19680

Lista de Secuencias

gattgtagac cggcgagccg accggcacac gctctatacc cagcggtgaa ccgggctgca	19740
cgtgctcggg gccgcgctgc tggacgtcga cggacggtcg ctgcgccaat tgagtgtcag	19800
acatggatgt atccccgaat cttattgttg ttgagtaccg gtgcgcttac tgcggttcat	19860
ccactggcgc ggtcatcaat tcatgccagt acagccacca atgccactgg gtgtcgtcct	19920
tggngaagcc ctctgtgaca atgcccggcc caggccagcc ttgaggcgca ccggtttcga	19980
acacggcctg gtacttgagt gtactcttgc gacccatcgc acccttggcg gcgagtgtca	20040
tgtgcggcca ggtgtcggag tcgtcctgct cgaccatgcc ggaagtaccg aacaactgaa	20100
tggctcgcct gagcattttt tcccgaatt cgggcggcgc gtctttttcg gcaaagatcc	20160
agttcacgaa ctccagcttg tccggtcctt gcggcacata agcgtgcagg gtcatggagc	20220
cgaccaggtt accgtctggc tgcgggatat aaacaaagcc aaagaggatg ttgggaaaca	20280
tcccccgac ttgcggaggc atgctggtca ggaccttgag ctggtcctca ctgagattgc	20340
gcgccagctg ttcgaccatt tcggcggcca tccccgccgg cggcagcgcc tgaagcttct	20400
gctcgaccgt gagcgattcc ggatccagcc cggtcaggcg tttgatcttg cgtgccaggt	20460
cgatgcaacg cagtgcgtgg ccatgaggcg aactgatctc gacaccgtac atttcaggac	20520
tcaggtcggc gctctggccg ttctcgtcct tcttggcata gttaccacc tcgcccagcc	20580
agcgggtcag cgtcagggtg tggaaagccat cggcggcaga ttgctcgccg gcggtcttcc	20640
agttggcgtt gacgatgaaa cgctgcggcg ggccaagcac ctccatgcct ttgtcggagc	20700
gcaggaacag catgtcgtaa taccacttgg catcgcagag gaattcgtcg aaagacggtc	20760
cgtcgacggt ccaggtggca aacaccagcc cgccgtacag cgtgaccctg gcttttttca	20820
ggcccaactg ctcttgggc agcatcttgc cgtgcatgca ctgcgatcg actggcgagc	20880
cgatgaagtc accgttggga cggaaacccc agccgtgata gatgcacttg tgaatctgcg	20940
tgttcccgca atcggcagtg ctgatgcgca tgccgcgggt agggcagacg ttgagggtta	21000
catgaacctc gccttccttg tcgcgggcga taatgaccga gtcggagccc aggtcacgga	21060
ccatgaaatc gccggaattc ggaatctcgg attcatgccc cagcaggacc cagatcttgc	21120
cgaagatctt ttccatctcg atttcgtaga tttcacggtc cgacagcacg cgcatctgca	21180
cttcgcgtgt ggagggataa atcaggtcgg cgaccttggg tccatcagac agtacggggc	21240
ttgttcttgt tagcatattg gcctccagtt cagggtgtca cggctactat gagccggtg	21300
aatataagac agaatacaaaa agaattgtata ggaagtcgtt tgtcttgccg gcaaatggtt	21360
cagcgtccgg cagcatgctt actgcccggc tcccacctga gtgcgcaata caccgatgcc	21420
ctcgacttcc agctctacca gatcgcgggg tttcaggtaa cgcaactgct ccaggccgca	21480
gccgttaccg acggtccttg agccgagaaa ctgcccggga tacagggttt cagagcgaga	21540
cacgtgggca atgacatctt cgaagcggca acgcatgtcc tgggtgttgc cccggcccca	21600
ctcttcgccc ttgaccctgg cgaccatggt caggatcatag ggatcgccca gctcgtctgc	21660
agttaccagg cacggcccca tgatgttggc cgtgtcgaag tccttgcttt tggccggggc	21720

Lista de Secuencias

gagcatgccg ggcattctcg cagcctgggc gtcgaggcg ctcattgctg tgaagatggt	21780
gaaccaacg atgtgctcgc gggcagcgtc tttggagatg tccttgccctt tcctgcccgat	21840
gtagcagccc aactccagct cgaatccag cgccttgctg aaggaaggcc agagaaattc	21900
gtcgtcggcg ccgatcactg cgaatcgggt gcacttgtag tagatgggct ggcggttgaa	21960
ggtctcagtg acccggctcg cggcgcgagt gttcattgcc ttcaaggctg cttccggatc	22020
gtcggtgctc agtgcgcccg cacgctgctg tgcagcgaac gcctgacgca ggtgcaactc	22080
gaaacacgaa cagtcgcgca tctgtggcgg cggttgaatc ggcgcacgga gcctgacctc	22140
gttgctcggg atgacactgt cggcggcga tctgccaagc agcgtgctcg ccagccccag	22200
ggcttgctcg ccaccttcca ccagtttcaa cacgctgctc agcgcggcgc tttcaccacc	22260
ctggacatgg cggtgagctg cctgcaggtc gaggaccagt tgatcgttat cgaacaaggc	22320
gccggcgcgc tcgacgccat cggcgtgggt aaaggttaacc aatctcatac gcgaccactc	22380
accggcagac aggcgccggg taccgcgcag gcctcatcgg acagcagaaa ggcgatgacc	22440
gaagcaagct gcgtggggct taccagcgg ctgaaatcgg cgtcaggcat gtcgctgcgg	22500
ttggtcgggt tgcgatgat gctcggcaag accgcgttga ccgtgatgtt gcggtccttg	22560
acctcctcgg ccagcgtctt ggtcaagcgt gcaacgccag cettggaagc ggcgtatgcg	22620
cccataacct gccctgcctt gaggtctgcc tgggactga cattgacgat gcgtccgcgc	22680
tgcgcggcgg acagatgctc aaggactgcc tgcgaagcca ccacggcggg gcgcaggttc	22740
atctgataga gacggctcca ggtcgcgaag ctgccggctt cgagggtttc ccaagcaaag	22800
ccaccagcga cattgaccag accatcgata cgcgagaaat gctcggcaac ctgtgcgaag	22860
gccgcctggt ccgactcgac cgaggtcagg tcgacgccac ccagtgacag cacatccccg	22920
ctgtcgtcga cggttgcctg agtcgactcg gcccggtcca gcagcgaac cttggcggcg	22980
cgggaacgca ggtgctgacc aagtgcccg ccaaggacac cgaagccgcc ggtaacgacg	23040
atcacttttg cgtgtaacgg cgcgtcttca cgcactgcgg cctgaccaga actggacatc	23100
gctgattcct cttattgttg ttggcgtgc cctctgcggg gaagcgaggc gtggcgataa	23160
tataagacac tttttaaaa tatgtacaga tgatactgtg ccctcgttga ctggaatcaa	23220
taaaaacat ccgatctcg acgctaagc ccagaaaact gcctgccctg accgccgaca	23280
accgtgcctt ctggcagggt ggtgagcacg gtcagttgct cattcatcat tgcgacgctt	23340
gcgcgcgttt ctttcaccgg ccctcgccca tctgcccgtg ctgcccaggt ttcgacgtca	23400
ggcctaaagc cgtatccggc aaaggcttgg tgaccagctt cacggtgaat tatcagcaat	23460
ggacaccgga cctcgacatc ctttcgtcgc tggcgatcat cgagctaccg gaacagaccg	23520
gcctgcgctt tctcagcaat gtcattggct gcgaccggtt gtcggtcagc atcggcatgc	23580
gtgtgcaagt ggcattcgaa aacatcgagg atgtctggct tcccctgttc gagaaggatc	23640
aatgatgttt gatcatcgtc atgagagaaa cgtcgccatt accgggatag gtcaatccga	23700
ggtgggccgc ccttcagca aatcggccat gcgctgacg ctggacgat gccttgaagc	23760

Lista de Secuencias						
tatcgccgac	gcggggttga	cccgcgaaga	catcgacggc	gtggcgtgct	ggccggggga	23820
caacaacaat	ggcgacccgt	tttctccggt	tggcccgagc	gctttgaaaa	gcgtcctcgg	23880
gctgaacgtc	aactggttcg	gcgccggcta	cgaaggcccc	ggaccactgg	ccgggggtgat	23940
caacggtgcg	atggccattg	cggcggcctt	gtgcaggcat	gtgctggtgt	tccgcaccat	24000
caccgaggcc	tcggccaggg	tgcacaacaa	acaggccggg	gccttgagtg	ccaagacgca	24060
gggccgagc	acaagccatg	cctggcagtg	gttcacgccc	ttcaatgtgc	actcgggtat	24120
caacctgatg	gcgttgtagc	ctaagcgcca	tttccatgag	tacggcacc	gccccgaaca	24180
gctggcgcag	atgccatga	cctgtcgcgc	caatgcgcag	cgcaatcca	aggccatcta	24240
tcgctcgcgc	atgaccctgg	acgactacat	ggcctcaagg	atgatttcct	caccgctgcg	24300
catgttcgat	tgtgatgtgc	actgtgacgc	atccaccgcc	attgtgctgt	ctcgcgcgca	24360
tgtcgccaaa	gacacgcggc	agcaaccgat	tcgcatcgaa	gcgatggggg	cgccctgga	24420
ccagccctgg	tcgtgggacc	agatttcact	gacgcagatg	gccgcgttcg	atgtcgcccg	24480
aatgatgtgg	gcgcgcaccg	actacacgcc	gtccgatgtc	ggctcggcac	agctgtatga	24540
cggcttttcg	attctgacca	tgatctggat	ggaggcgctc	ggcctgtgcc	cggaggcgcg	24600
aagcggcgca	ttcgttgaag	gcggccagcg	cattgcgctg	accgggcagc	taccgctcaa	24660
taccaatggc	gggcaattgt	ccggcggtcg	cacgcacggt	ttaggctacg	tgcatgaagc	24720
ctgcctgcag	ttatggggcc	gcgctgaagg	tcgtcagacc	cgaccgcacg	cggctctctgc	24780
tgtcgcggcc	ggaggcggtc	cgctggcgcg	cagcctgttg	ctcgtcaaag	actgacgccc	24840
gtttcgtctc	gggcccggca	gcgtacttaa	aacaacacct	tgetcagctc	ggcgcagaac	24900
gctaccagcg	cagcgcggac	ttcctcgatc	ccttcctcat	cgcgctggcc	tctgaacaac	24960
acggcggaca	cggtgaaatc	gatgttgccg	gacagcgagt	aaaccggcgc	agcgattgcc	25020
agaatgcccc	ccgagaaata	accgtcatcc	accgcccac	cgcgttcgac	agccagcgcc	25080
acttcatccc	gatagacctc	gaacggcaac	ggccgagccc	agcgaatggt	ctcgaatccc	25140
tccttgacct	gagcgtcctg	catgtccagt	tgagtggcga	acagccgccc	gctggcacc	25200
atcaatatgg	gcagacgctg	cccttcagcc	atgtcgatgc	gcacgtcgg	gggactggcc	25260
gcagaactga	cgatcacgat	gcggctctga	cccattgcgc	gccacaagg	cacggtgacc	25320
cgcaagcgcg	cggccagatc	ctgcaacagc	ggcttgccaa	aggccacgcg	ctggccctgg	25380
gtcaccatt	gctcgaccag	cctggccagg	ccaagacctg	ccgaatagcg	cttggacagc	25440
gggttgaaat	cgacgacatc	ctccatgacc	agcgtgcgca	ggatattgaa	acaggtgctg	25500
gggttgatcc	ccagaatgcg	cgccaggtcc	acggaacgct	cgggggttcc	ggcctgactg	25560
aggtggcgaa	ggatgcggat	ggcgtttgaa	accggtttga	cactgaccgc	gcccttctgg	25620
ttatcaggcg	tatcaggaga	ctgtgaacct	gtgtgtctcg	tcttggtgcg	aggcatcgga	25680
aataccggtt	gggcgagcga	tgcggcattc	taacctgaga	acggcaacct	gtttaagtt	25740
taataccgaa	accgaaggtt	tgttttatgt	cgattcagcg	cggctgcagt	atgtagcgtc	25800

ES 2 525 398 A1

Lista de Secuencias		
gctggggccg cgctccgcaa cgaaagtggg tcaggctggc ttccagcgca tgggccgctt		25860
gcgtgatgcg cgactcctga cgcaaataat ccagccagga ctcgacgatg aaacgctcga		25920
cgaagtgatc gttttcgtcc agatcgtgat agagccgcca gttcttcgcc ccgtttcgac		25980
gccgggactg gccgaccgcg taggccatct cgatgaaatg tgcccgatca gccggggcga		26040
cccgatacgc cagttcaatg gaaacggggc cggtccggg ggtcgactct tccggcagca		26100
acagccggtc agtcggctgg atcgccatgg cgtagtcggc ctcttgcccc agcggcagct		26160
tgccgttgcg ggtcaacagc agcccagca ccaacgtcat tgccgccagc aacaagctgt		26220
gctgcaagcc aaggtactgc gccagagcgc cccagatggc gccgccaatg gccattgcac		26280
ccataagcat cagcaggtag atcgaagcga cccgcgcccc taccagttc gccgcacagg		26340
tctgcaccac tgtcgaatg gttgcattga ctgccatcca ggacattccc gcgatcatca		26400
acatggcgca caccgccacc cggctttggg aaagtgccgc ggtcagggtc gccagggcga		26460
aaccagcgt gcctgcatg atcagcacc gaaggggtaa gcgccgatag agtttagtaa		26520
ggttgaatgc gccgatcacc gcgcctgcgc ccagaaacc catcagcagg ccgtaccgc		26580
cagcgtccat gccagttca tgttgcca ccaagggcat gagtgccac agcgcgctgg		26640
caccaggtt aaagacgaag acttcttca aggcctgac cagcaccgcg gaatggcgga		26700
tatagcgac gccgctgcgc aggccggcag cgaagttctc cgagggcagc ccatgcgcta		26760
tgtgcgttg cgtaacatc gcaaccagca cgatgaccag cggcaggctg atggtgatga		26820
tcatgaacac cgaggcggca ttccagtagg cgatcagccc accggcaatg gcaggcccca		26880
gggcccgcgc ggcgttggtg gaaataccgt tgagggaaac ggctgccggc acctgatcgc		26940
gggacagcac cgacacgatg gttaccatcc aggccgatc gctcagtgca ctgccggtgc		27000
ccaataaaaa ggtgaataac agcagcgacc aatcggctag caggttgcca taagacaac		27060
cgctcagga cacggcggcg atcagcataa tgccctgagt cagcatcagc cacttgccgc		27120
ggtcaaccag gtcagcaatg accccaccgg gcaaaccgaa caggaaggcg ggtaacgaga		27180
tcgccgtttg caccagcgag accatcaacg gcgaggtcga cagcagcgtc atgatccagg		27240
ccgcaccac cgtctgcatc cagatggcca gattgaccat cgcaccggca caccacagcc		27300
agcgaagct gcggttgccc agcggcgacc aggcagaggt cggctgagca ttgacagccg		27360
ctgcctgac gtggggcttg tcggaaacct cgctcatggg agcacgggcc agcccagcct		27420
gccgccagat cgggcagtcg gcagaatgcg cggctggctg acgcggttgc tcagtcgacc		27480
gatgccttca atacacgcct ggacctgatc gcccggttgc agaaagcgcc cgtcttcag		27540
gcctacgcca tgggtggacc cggatgaacag caggtcacc ggctgaagga taattctggc		27600
gtcgatgaag tcgagcaact cgtcaaccgg aaagagcatc tgccgggtgt tgtcgaactg		27660
gcgccgctcg tcgttgacct tcagctcgat gtccagctgc ggttgctccgc tagcgaattc		27720
atcgccgggtg acaatccacg ggcccaccgg cgtggtgcgg tccatggcct tctgggtcag		27780
cagatccaga cgggcaatac gcttgccggc atcccgtgcg ctgatgtcat tgccacaggt		27840

ES 2 525 398 A1

Lista de Secuencias			
gtagccgagc	aggcaggcac	tggcgtgggg	ctcatcgccc aacgctctgg cgacgacggc 27900
gaccagctcg	acttcatagt	ccagctgcg	ggtcagcgcg ggatactgga tgtcatcgtt 27960
ggcaccacc	agcggcgagg	caggcttgat	gtaaccacgc ggggtgctccg gcgcaacgct 28020
gcccaggcgc	tgcatgatgac	tgaggtagtt	gagccctacg ccgaagaccc gcgcgccggg 28080
ttcaaggggc	ggcaggatgc	ggcattgctc	caggataatg ccaactttgt ccaggctcag 28140
tgctcaacg	ccctgggctg	ccaaagctgg	cgcccacagc gcgaacggcg cacgaatgcg 28200
ctgcaggcag	gtcgtctcca	ggtcgagcaa	accccagaag ctttcgttgc ggtactcgac 28260
ccggatcagc	cgattttcag	cgcttgctcg	ccaggtattc cgggtccagc acctcttcag 28320
gctcttgac	gtcggcccc	agaatcggcc	cgaccatctc atgccccac aggctcaggc 28380
actcgggatt	gagttcgaac	ggatcgccct	gccacggctc gatctcggca atggtttcga 28440
tggcgaagcc	ggacggcgctg	aagtgataga	acgacaggctg cgggtcctgt gtgtgctggc 28500
ccagggtcat	catcatcgcc	agttgacggt	ttttcacgat gtcgtaggtt tcgccaacgt 28560
cgcaatgct	cttcacgaac	aggccaacgt	gctgcacgcc catgcgcccg gcaccgtgac 28620
cgtaggcaat	gtcatggctg	gtgtgggtgat	tgagcttggg gcggaaaaag ccggtacgcc 28680
ccttcccggc	gccggcacca	taccagtggg	agcccatgat ccgggtcagg aagtcttcca 28740
gttcatcggg	gtattcaggg	gtgatgacca	ccacgtggcc ggctccgctg tcgtcggcat 28800
gaaaccacc	gtgagggcgc	ccgggcagga	atgaacgcgg ggtccatttc tggccgtaaa 28860
acaactcgtg	ctgatagccc	accgggtcgc	ggaaacgaat cagttcgcgc acgcccggtt 28920
gctcgcagag	cgccgcatca	ccgcggttaa	cctccacggt gttggcttca aaggctctga 28980
tcgcgcgctc	gaatgcctgc	cggcccaggg	cctcccagcc gatatagacc aagcggtaa 29040
cctggccggg	gtgaaaggcg	aagcgtggc	ggcggctcgc tatcttggaa tacagcgact 29100
ggctgtcgt	ggccggtgac	ggcgcaatgc	caaagcccat gacctgcggg ccgtattcgc 29160
gccaggcgtc	gaggctaggg	gtttcgaaac	ccaggtaacg gataccgatg atgtccatgt 29220
gagtgacct	attgttcttg	ttggatgggc	gttgctcaga ctgctagcag gccgcccgtc 29280
ataacgatgt	cggaaccggt	gatgaaggag	gcctcggcgg aggcgacgaa taacgccatg 29340
gccacgacct	cctccggctc	tcccggctcg	tccatcagca cgccgtcgag cagcgtcgcg 29400
cgacaccttg	gattttccat	gaacgctgca	gtgcctggcg ttgcgatgaa accggggctg 29460
atgctgactg	cgcaatgcc	caccggcgcg	ccttccacgg ccagttgccg ggtaaaggca 29520
atgactgcgc	ccttggcggc	ggcgtgggcg	ctgatgcctg cgactttgga gcctcccag 29580
ccagccgtag	aggagatatt	gatgatcacc	ccgcgctggt cggccaggtg atcccaggcg 29640
tacttggtgg	tatagaacag	cagatcgatt	tcattgcgca tgggtaactg ccagtcctcg 29700
atggacagcg	tattcaccgg	cccgaatttt	gccgccgagg cgttggtgta cagcacgtcg 29760
atcggccat	gctgggccc	ggcggcgtct	atccaggcct tggcctgggc gggatcggcc 29820
agatcgacgg	gagcggatcc	cgacaactgc	aagccttcac tggctagcaa agcggctggt 29880

ES 2 525 398 A1

Lista de Secuencias		
tcttcgtggg	cgctggcggt	29940
agtgctgcag	cccacgacga	30000
tgatcagcac	tggtgccttc	30060
acgggcaaat	cgagtgccc	30120
ctgtcatcct	ctgcccgcc	30180
cgaaatgtgc	ccggtgccgg	30240
gcacacgttt	tgatcagcac	30300
atgaaattgc	tgcaaacgac	30360
tttcgggggt	ctgtcatcct	30420
atccaggggc	gtgattctcc	30480
ctcttcaagc	cgaaatgtgc	30540
ctcgtcgcctc	cggtcagctca	30600
ctcttcaagc	ggcaagggtt	30660
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	30720
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	30780
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	30840
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	30900
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	30960
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31020
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31080
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31140
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31200
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31260
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31320
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31380
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31440
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31500
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31560
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31620
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31680
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31740
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31800
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31860
ctcgtcgcctc	ggcaagggtt	31920

Lista de Secuencias

tcggccctct gtcctgctc atgctgggtc gcgcaccgcg cttccacggc gcggccatgg	31980
cggcccccac ctgacggcct gccgcgtcct acccgcgtcg atgccttgcc cacaacaaaa	32040
acaagaggaa actcctatgc cagttctgac cctgatcgag ttcaacggca ccgaacaccg	32100
cgtcaaagca gatgtcggcc aatcgggtgat gcaggctgcc aatttcgcca gcgttcccgg	32160
ccttcaggct gattgcgcg gcgcctgacg ttgcccacc tgccatgcat tcgtcgacga	32220
tgcttgctg gcacgcgtgc cagccgccga ggacgccgaa tcggacatgc tcgaatacgc	32280
ctgtggccgc agcgacaaca gccgcctgac ctgccagttg atcgtcagcg acgcgctgga	32340
cggctcggtc ctgcgttgc cggaatcca gtactgagcc tgggtgctcat ggactcagtc	32400
gaaggagtgt tcatgtcact gtcttcaatc gtgatcgtcg gcgcaggca ggcgggttat	32460
caggctcgcc cgctcgtcgc ccaggaaggc cataccgggc gtatcgtgct gatcggcgac	32520
gagcccggtc tgccctacca gcgcccggc ttgtccaagg cctacctgct cggcaagatc	32580
gccgaaaccg ctttgcgtgt ccgcccggct gattttttcg ctactcagaa catcgagtgt	32640
ttgatgacc aggcgaccgc catcgacagg ctcaaccgac ggggtgctgtt ggcctccggc	32700
gacgtcgtga actacgacca tctggtgctg gccaccggcg cgcataaccg tccgctggcg	32760
gtgcccggcg cgcaactgga aggcgtgttc ggcaccaaga ccaagctgca cgccgatacc	32820
ctcgcgcctc tgggtgcatca ggcgcgcaac gtcgtggtgg tcggtgccgg gttcattggc	32880
ctggagttagc ccgggtagc gcgcccctc ggggccaatg tgcatgtgct tgaactgggc	32940
gatcgtccga tggcgcgtgc ggtgtcccgg gaaatgtccg aggtatttcg caaggccat	33000
gaaggctggg gcgtgcattt cgatttccgc caggggctgg ccgccatcga aggcgataac	33060
ggcagggctc gcgcccgtgac caccagcgat ggtcggcggc tgcccggcga tttggtcgtg	33120
ttcggcatcg gcgtgatcgc caacgtgcaa atcgtctacc aggcggggct ggacatcga	33180
aacggtatca aggtggacgc ccacctgctg accagtgacc cgagatttc cgccttgggc	33240
gacgtggcct gcttcccgtg cctgcataac gaccagcagc cgattaggct ggagtcggtg	33300
cagaatgcca tcgatcaggc gcgctgcatc gccgcgcggc tcattgggcaa accggctgcg	33360
tatgaggccc tgccgtggtt ctggaccgat cagggcccgc tcaagttaca aatcggcggg	33420
ctgtcgaccg gctatgacag cagcgttatc gttggtcgc cagatacctc gcagctgctg	33480
gtactgtgtt tccgcgagga tcaactgatc gccgtggagt cctgcaatcg gccgggcgac	33540
cacatggcgg cgcgcaagat cctggctcgt gcacccaac tgacggcagc gcaagcggca	33600
gaaccgggtt tcgagctcaa ggcattggga gcggccaacc gacctgaat aaagtctgga	33660
tgataaccgg ggcttcaagg ggattaggcg gcacatcgc tcaggcggcg ttgtcggcgg	33720
gtgatcgggt tgggtcacc gcgcaacc tgctgacct ggacgcgctg ttaccgacg	33780
acgcagaccg ggtgctcaa caagcgtgg acgttaccga tcaggcccag gccagtcggg	33840
tgggtggacgc ggcctgacc cgtttcgggg cgattgacgt gctggtcaac aacgctggct	33900
acggccaact cgccccttc gaaaccaaca gcaggccga tgtcgaacga cagtttcaga	33960

Lista de Secuencias		
ccaacgtctt tggcgtgttc aacctgtgcc gggcgggtgct cccgctcatg cgcacccagc	34020	
gccggggcca tgtgttcaac ctgtcctcgg tgggtggact gatcggcatg ggcggcgctt	34080	
cgttatacag cgcctcgaag ttcgcggttg aaggtttcag tgaagcgtg gctcaggaag	34140	
tcgccagtta tggatccac gtcacgctgg tggagcccgg ggttttccgc actgattttc	34200	
tcgaccgag ctcgctggcg ttcggcaatg tgcaggttgc cgactatgca gcgctggtag	34260	
acaaactgca ggcctcctgc gctgcgggga atcaccagca agcgggagac ccggcgaaac	34320	
tgggccacgc cctggtgtcg ctggccaact gcgatacacc cccgttgccg tttctggggc	34380	
gcagcgacgc ctacactcag gtcagcgcca agctggcacg catgagcagc gaaatcgaac	34440	
gctgggaggc gctgtcctgc tcaaccgacg gtgcttgggc cgccggcagc gagaactgag	34500	
tccggtcaaa gcgatcaacg ctggcgcatc atcgcggctg ccagcgcccc ccccccgcca	34560	
atgccagaag ggccaggtaa agccaatagg tggcggcgcc gaaggtgaac atggccacac	34620	
tggcgacgcc aaagtgtgag cgtcgcaaca gtcgcagggt ggtaaggca cgcgagccct	34680	
acaccactg gccgtgcctg taatccaccc ccagagcttc cttgaactgt gcatccctcg	34740	
agcaaccacc acgtagtgcc cagcagtcta acgacgcca agtggcagca ctggtccaaa	34800	
agccaccctg aaaacggacg tttagccgta aaccctgaa agcatcgccg aaccttcaac	34860	
ccgctttcga cactgccccg gaccggctgc aacggcctca tcggtcgtgc cccacaggcc	34920	
gctcggcaca cagtgcctca accggcaatg aaataccgca ctgataaca gccgtcctcg	34980	
aaacggtaga cctcgtatgt ttcgataccg ccctcggcac cgatgaatgc attgcggtga	35040	
tgacacgagg cttctgcgcc gttgattacg gtcagcttca cttcgtatgc gacccgcgat	35100	
tgctgttgccg cccacatccc ctccagcaca tgccaggcgt cccgttcggg ctgaccgacg	35160	
tattcgtatg tcaagccctt gctggcgacc cggcggtaat ggccaaagaa gccttccttg	35220	
tcgccggcgt tccagcacgc cacctgcca tgcaggaaat gctcgtatgct tggttgatcg	35280	
ggaacactca tgattaacct cgataaatac tcagaccgaa accttgcgat acagcgggtgc	35340	
ggaccggagg gtcagcatca ccagcgggtgc aacgacggca cagcccaggc aataaaacag	35400	
caccgggttg tagttgcca acagggtaaa caggtgcccg aacagcggcg gtgccagacc	35460	
ggaaatgact gtgaccagcc ccagggtcag gccgaaaatc cgcgcgtagt cccgtagccc	35520	
gaaatagcgg gcgatgagaa aggctgcgat gtcgaaactc gccccggcac tgaaccgat	35580	
gcacaccgct gccagcaca acaccccagt agcctgcgcc ccggtgaaca tgaacagcag	35640	
acagcccagt gccggaacac aaaggctggc cgccgcaatc agatgcgctg ggaacgatc	35700	
cagcaggtac cccaccagca agcggcccgc gatgatcgaa atgcccgaagc tgctgaagat	35760	
ctgactggcg gtcaggctcg gcacgcccct gtcctgcaga tacggcacga tgggtggttac	35820	
catgccgacg atcagcgata ccgacaggat cagcggcagg ttgcagcccc agaacaccg	35880	
tgtgcgcacc gcagtggcga accgcacacc ttcgaccacc ggctcagtcg tggaggactc	35940	
tgcggcggct aaccgttgtg ccggaactt cagccaggcc acggccatgg gcaaggtcag	36000	

Lista de Secuencias

caatagcggc atggccgcca gcagcaggaa agcccagcgc cagcctccat gctggatgga	36060
ccaggccagc agcggcggca tgaccatcgc ggccaggccc gagccgctga ggatgatcgc	36120
caaggccaca ccccggttac gctcaaacca caagctcacc agttgcgtcc aggtgatggc	36180
gatagtgccg acggccagca gcggcatgag gaagaacgcc aggtacagcc agtagatact	36240
gccgcgaagc agggtcagcg acgcataaca cagcacctgc aatacaaggc tgaccagggc	36300
cacccggcgc aagccgtaac gggcatacag cccgcccaac agttgcgagc ctatggcaac	36360
gccggcgaac agaaaggtga tcgaggtctg cagttcgcca cggttccagc cgaagcgtc	36420
ctgcaagggg atcaccagag tgccgaagcc atacagcaat gccgcgctgg tgctggtaa	36480
tacgcccgcc agggccagta cgacgatcgc ccagccccga tgaaactcgc ccctggccat	36540
ttggcccgcc aatgaatcct gtaaacggtt catgttcgtg ctccggcgtc agacttcaac	36600
cgcttgccga cgcctagaaa	36620

<210> 2
 <211> 800
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas

<220>
 <221> source
 <222> 1..800
 <223> /mol_type="unassigned DNA"
 /organism="Pseudomonas"

<400> 2	
attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc ggatgaaggg agcttgcttc	60
ctgattcagc ggcggacggg tgagtaatgc ctaggaaatct gcctggtagt gggggacaac	120
gtctcgaaaag ggacgctaata accgcatacgc tcctacggga gaaagtgggg gatcttcgga	180
cctcacccaa caaagaacc caaggccgaa taaccaagtg ggaagggaaa gcccacaaca	240
agccaacaac ccgaaacggg ccgaaaagaa gaacaagcaa aacggaaacg aaaaaacggc	300
caaaacccca acggaagcaa caagggggaa tattggacaa tgggcgaaaag cctgatccag	360
ccatgccgcg tggtgaaaga aggtcttcgg attgtaaagc actttaagtt gggaggaagg	420
gcagtaaatt aatactttgc tgttttgacg ttaccgacag aataagcacc ggctaactct	480
gtgccagcag ccgcggtaat acagaggggtg caagcgtaa tcggaattac tggcgtaaa	540
gcgcgcgtag gtggtttgtt aagttggatg tgaaatcccc gggctcaacc tgggaactgc	600
atccaaaact ggcaagctag agtagggcag agggtggtgg aatttcctgt gtagcgtgga	660
aatgcgtaga tataggaagg aacaccagtg gcgaaggcga ccacctgggc tcatactgac	720
actgaggtgc gaaagcgtgg ggagcaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta	780
aacgatgtca actagccgtt	800



- ②① N.º solicitud: 201300612
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.06.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)
C12R1/38 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MOLINA GUSTAVO et al. <i>Pseudomonas</i> : a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> , 29.01.2013 VOL: 97 No: 5 Págs: 1851-1864 ISSN 0175-7598(print) ISSN 1432-0614(electronic) Doi: doi:10.1007/s00253-013-4701-8.	1-19
A	AGUILAR J A et al. The <i>atu</i> and <i>liu</i> clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> MARZO 2006 VOL: 72 No: 3 Págs: 2070-2079 ISSN 0099-2240.	1-19
A	FOERSTER-FROMME KARIN et al. Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> JULIO 2006 VOL: 72 No: 7 Págs: 4819-4828 ISSN 0099-2240.	1-19
A	US 5128253 A (LABUDA IVICA M et al.) 07.07.1992	1-19
A	US 4495284 A (RHODES PETER M et al.) 22.01.1985	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.09.2013

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.09.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MOLINA GUSTAVO et al. <i>Pseudomonas</i> : a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> . VOL: 97 No: 5 Págs: 1851-1864 ISSN 0175-7598(print) ISSN 1432-0614(electronic) Doi: doi:10.1007/s00253-013-4701-8.	29.01.2013
D02	AGUILAR J A et al. The <i>atu</i> and <i>liu</i> clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> VOL: 72 No: 3 Págs: 2070-2079 ISSN 0099-2240.	03.2006
D03	FOERSTER-FROMME KARIN et al. Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> VOL: 72 No: 7 Págs: 4819-4828 ISSN 0099-2240.	07.2006
D04	US 5128253 A (LABUDA IVICA M et al.)	07.07.1992
D05	US 4495284 A (RHODES PETER M et al.)	22.01.1985

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (arts. 6 y 8 de la Ley 11/1986)

En las reivindicaciones 1-3, de la solicitud de patente, se reivindica una cepa aislada de *Pseudomonas sp.* y mutantes de la misma que incluyen al menos su capacidad para degradar terpenos cíclicos y acíclicos y/o derivados terpénicos cíclicos y acíclicos. En las reivindicaciones 4-6 se reivindica una composición que comprende la cepa objeto de la invención. Las reivindicaciones 7-19 reivindican el uso de la cepa objeto de la invención.

Existen numerosos documentos que reflejan como *Pseudomonas sp.* es capaz de degradar una amplia gama de terpenos, como por ejemplo se muestra en los documentos D01, D02, D03, D04 y D05. Se pueden encontrar en el estado de la técnica diferentes *Pseudomonas sp.* que presentan diversas rutas catabólicas para la degradación de terpenos cíclicos o acíclicos. Pero no se ha encontrado ningún documento que refleje que una misma cepa de *Pseudomonas sp.* sea capaz de degradar terpenos cíclicos y acíclicos.

Por tanto, las reivindicaciones 1-19 presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.