

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 790**

51 Int. Cl.:

C12P 7/46 (2006.01)

C12P 7/44 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2012 PCT/EP2012/062860**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO2013004670**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2012 E 12734871 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2726624**

54 Título: **Proceso para producir ácidos dicarboxílicos empleando células fúngicas**

30 Prioridad:

01.07.2011 EP 11172444

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

14.06.2017

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon, 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**JANSEN, MICKEL LEONARDUS AUGUST;
HEIJNEN, JOHANNES JOSEPH y
VERWAAL, RENÉ**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 616 790 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

Proceso para producir ácidos dicarboxílicos empleando células fúngicas

5 La presente invención se refiere a un proceso para la producción de un ácido dicarboxílico.

Se conocen varios procesos para la producción de un ácido dicarboxílico. El documento WO2007/061590 describe un proceso para la producción de malato y succinato en presencia de un 21% de oxígeno y de hasta un 15% de dióxido de carbono. Se demostró que en presencia de un 10% de dióxido de carbono se producía una cantidad
10 mayor de malato y succinato en comparación con un 0% de dióxido de carbono añadido.

El documento WO2008/144626 muestra que la adición de dióxido de carbono de hasta el 10% v/v aumentaba los niveles de producción de ácido málico y ácido succínico por una célula de levadura recombinante, pero concentraciones mayores de dióxido de carbono no aumentaban estos niveles adicionalmente.
15

El documento WO2011/023700 describe un aumento en la producción de ácido málico y ácido succínico por una levadura recombinante fermentando la levadura recombinante en presencia de una concentración de dióxido de carbono que varía entre el 25% y el 75% v/v.

20 Una desventaja de los procesos descritos en los documentos WO2007/061590, WO2008/144626 y WO2011/023700 es que tiene que añadirse una corriente diferente de gas dióxido de carbono a la fermentación además de aire.

El documento WO2010/118932 describe un proceso anaeróbico para la producción de ácido dicarboxílico y etanol. La producción de etanol permitió la producción de energía para el mantenimiento de la célula, y la producción simultánea de dióxido de carbono influiría positivamente en la producción de ácido dicarboxílico. Una desventaja de un proceso descrito en el documento WO2010/118932 es que las condiciones anaeróbicas limitan los medios para el mantenimiento celular y reduce el rendimiento de ácido dicarboxílico.
25

El documento US2327191A describe un proceso para la producción de ácido fumárico y sales de ácido fumárico por hongos o mohos. En el proceso, el tipo aeróbico deseado de fermentación puede lograrse por agitación mecánica adecuada o pasando una corriente de aire a través del medio o ambos a una presión de aire mayor que la presión atmosférica. En lugar de aire, puede usarse una mezcla de gases adecuados que contienen oxígeno.
30

La presente descripción pretende proporcionar un método mejorado para la producción fermentativa de un ácido dicarboxílico que supera las desventajas resumidas anteriormente.
35

Sumario

La presente invención se refiere a un proceso para producir un ácido dicarboxílico, que comprende fermentar una cepa de levadura en un recipiente que comprende un medio adecuado de fermentación, que comprende añadir un gas que comprende de aproximadamente el 21 a aproximadamente el 35% v/v de oxígeno y menos de aproximadamente el 0,1% v/v de dióxido de carbono al medio de fermentación, y mantener una presión parcial promedio de dióxido de carbono de al menos aproximadamente 35 kPa (0,35 bar) en el medio de fermentación, y producir el ácido dicarboxílico, donde el gas es aire enriquecido con oxígeno.
40 45

El aire enriquecido con oxígeno es aire con una concentración aumentada de oxígeno en comparación con el aire.

Una combinación de enriquecimiento con oxígeno y sobrepresión puede usarse, por tanto, para conseguir la invención.
50

Se ha descubierto que puede obtenerse un rendimiento óptimo de ácido dicarboxílico a una presión parcial de dióxido de carbono de al menos aproximadamente 35 kPa (0,35 bar).

Una ventaja de un proceso de acuerdo con la presente invención es que no hay necesidad de una corriente diferente de gas dióxido de carbono para una presión parcial suficientemente alta de dióxido de carbono.
55

Definiciones

Las expresiones "ácido dicarboxílico" y "dicarboxilato", tales como "ácido succínico, o ácido málico" y "succinato y malato" tienen el mismo significado en este documento y se usan de forma intercambiable, siendo la primera la forma hidrogenada de la última.
60

El término fermentar o fermentación, como se usa en este documento, se refiere a la producción microbiana de compuestos, tales como alcoholes o ácidos a partir de carbohidratos.
65

Una levadura modificada genéticamente o recombinante, o célula de levadura modificada genéticamente o

recombinante de acuerdo con la presente descripción, se define en este documento como una célula que contiene una alteración de un gen o contiene, o se transforma o modifica genéticamente con una secuencia de nucleótidos que no existe de forma natural en la célula de levadura, o contiene una copia o copias adicionales de una secuencia endógena de ácido nucleico. Una célula de tipo silvestre se define en este documento como la célula precursora de la célula recombinante.

Se entiende que el término "homólogo", cuando se usa para indicar la relación entre un ácido nucleico (ADN o ARN) dado (recombinante), gen o molécula polipeptídica y un organismo hospedador o célula hospedadora dada, significa que, en la naturaleza, el ácido nucleico o molécula polipeptídica se produce por una célula hospedadora u organismos de la misma especie, preferiblemente de la misma variedad o cepa.

El término "heterólogo", cuando se usa con respecto a un ácido nucleico (ADN o ARN) o proteína, se refiere a un ácido nucleico, gen o proteína que no existe de forma natural como parte del organismo, célula, genoma o secuencia de ADN o ARN en que está presente, o que se encuentra en una célula o localización o localizaciones en el genoma o secuencia de ADN o ARN que difiere de la que se encuentra en la naturaleza. Los ácidos nucleicos o proteínas heterólogas no son endógenas a la célula en que se introducen, sino que se han obtenido de otra célula o se han producido de forma sintética o recombinante.

El término "gen", como se usa en este documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que contiene un molde para una ácido nucleico polimerasa, en eucariotas, ARN polimerasa II. Los genes se transcriben en ARNm que después se traducen en proteínas.

La expresión "ácido nucleico", como se usa en este documento, incluye referencias a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, es decir, un polinucleótido, en forma monocatenaria o bicatenaria, y salvo que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos que tienen la naturaleza esencial de los nucleótidos naturales porque hibridan con ácidos nucleicos monocatenarios de una manera similar a los nucleótidos de origen natural (por ejemplo, ácidos peptidonucleicos). Un polinucleótido puede ser de longitud completa o una subsecuencia de un gen estructural o regulador nativo o heterólogo. Salvo que se indique de otro modo, la expresión incluye referencias a la secuencia especificada, así como a la secuencia complementaria de la misma.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en este documento para hacer referencia a un polímero de restos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en que uno o más restos de aminoácido son un análogo químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. La naturaleza esencial de dichos análogos de aminoácidos de origen natural es que, cuando se incorporan en una proteína, esa proteína es específicamente reactiva a anticuerpos provocados contra la misma proteína pero que consiste completamente de aminoácidos de origen natural. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" también son inclusivos de modificaciones incluyendo, aunque sin limitación, glucosilación, adhesión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación.

El término "enzima", como se usa en este documento, se define como una proteína que cataliza una reacción (bio)química en una célula.

Existen métodos conocidos en la técnica para la sobreexpresión de genes que codifican enzimas. Un gen que codifica una enzima puede sobreexpresarse aumentando el número de copias del gen que codifica la enzima en la célula, por ejemplo, integrando copias adicionales del gen en el genoma de la célula, expresando el gen a partir de un vector centromérico, a partir de un vector de expresión episómico multicopia o introduciendo un vector de expresión (episómico) que comprende múltiples copias de uno o más genes. Preferiblemente, la sobreexpresión de un gen que codifica una enzima de acuerdo con la invención se consigue con un promotor constitutivo (fuerte).

Los promotores adecuados en células fúngicas son conocidos para los expertos en la materia. Los promotores adecuados pueden ser, aunque sin limitación, TDH1, TDH3, GAL7, GAL10, GAL1, CYC1, HIS3, ADH1, PHO5, ADC1, ACT1, TRP1, URA3, LEU2, ENO1, TPI1, AOX1, PGL, GPDA y GAPDH. Otros promotores adecuados incluyen PDC1, GPD1, PGK1, y TEF1.

Un gen que codifica una enzima puede ligarse a una construcción de ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido, tal como un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias. La célula fúngica de acuerdo con la presente invención puede comprender una única copia, pero preferiblemente comprende múltiples copias de un gen, por ejemplo, por múltiples copias de una construcción de nucleótidos.

Una construcción de ácido nucleico puede mantenerse de forma episómica y, por tanto, comprende una secuencia para la replicación autónoma, tal como una secuencia de replicación autónoma y un centrómero (Sikorski y Hieter 1989, Genetics 122, 19-27). Una construcción episómica adecuada de ácido nucleico puede basarse, por ejemplo, en la levadura 2μ o plásmidos pKD1 (Gleer *et al.*, 1991, Biotechnology 9: 968-975), o los plásmidos AMA (Fierro *et al.*, 1995, Curr. Genet. 29:482-489). Como alternativa, cada construcción de ácido nucleico puede integrarse en una o más copias en el genoma de la célula fúngica. La integración en el genoma de la célula puede suceder

aleatoriamente por recombinación no homóloga, pero preferiblemente, la construcción de ácido nucleico puede integrarse en el genoma de la célula por recombinación homóloga, que se conoce bien en la técnica.

Descripción detallada

Una presión parcial promedio de dióxido de carbono, como se usa en este documento es la presión parcial promedio de dióxido de carbono medida sobre la altura total del recipiente de fermentación. Habitualmente, la presión parcial de un gas, tal como dióxido de carbono, en una localización específica en un recipiente de fermentación es un resultado de, a.o., la presión en el espacio vacío de un recipiente de fermentación y la presión del líquido (medio de fermentación) por encima de esa localización.

La presente invención se refiere a un proceso para producir un ácido dicarboxílico, que comprende fermentar una cepa de levadura en un recipiente que comprende un medio adecuado de fermentación, que comprende añadir un gas que comprende de aproximadamente el 21 a aproximadamente el 35% v/v de oxígeno y menos de aproximadamente el 0,1% v/v de dióxido de carbono al medio de fermentación, y mantener la presión parcial promedio de dióxido de carbono de al menos aproximadamente 35 kPa (0,35 bar) en el medio de fermentación, y producir el ácido dicarboxílico, donde el gas es aire enriquecido con oxígeno.

La invención, por tanto, se refiere a un proceso para producir un ácido dicarboxílico, que comprende fermentar una célula fúngica en un recipiente que comprende un medio adecuado de fermentación, que comprende añadir un gas que comprende del 21 al 35% v/v de oxígeno y menos del 0,1% v/v de dióxido de carbono al medio de fermentación, y mantener la presión parcial promedio de dióxido de carbono entre 35 a 60 kPa (0,35 a 0,6 bar) en el medio de fermentación, y producir el ácido dicarboxílico, donde el gas es aire enriquecido con oxígeno.

La presión parcial promedio de dióxido de carbono puede ser entre aproximadamente 35 y aproximadamente 100 kPa (0,35 y 1,0 bar), por ejemplo, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 80 kPa (0,35 y 0,8 bar), por ejemplo, entre aproximadamente 35 y 65 kPa (0,35 y 0,65 bar), tal como entre aproximadamente 35 y aproximadamente 60 kPa (0,35 y 0,6 bar).

Una presión parcial promedio de dióxido de carbono de al menos aproximadamente 35 kPa (0,35 bar) en un proceso como se describe en este documento puede obtenerse por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, un recipiente en un proceso como se describe en este documento puede comprender una presión en el espacio vacío entre aproximadamente 106,39 a aproximadamente 506,62 kPa (1,05 a 5 atmósferas), por ejemplo, entre aproximadamente 121,59 y aproximadamente 405,30 kPa (1,2 y 4 atmósferas), por ejemplo, entre aproximadamente 151,98 y aproximadamente 253,31 kPa (1,5 y 2,5 atmósferas).

Un recipiente en un proceso de acuerdo con un proceso como se describe en este documento puede tener cualquier altura y diámetro adecuados. El recipiente puede tener, por ejemplo, una altura de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 m, tal como de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 m, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 m.

Habitualmente, la presión del espacio vacío se ajusta a la altura del recipiente de fermentación de modo que se mantenga una presión parcial promedio de dióxido de carbono de al menos aproximadamente 35 kPa (0,35 bar) en el medio de fermentación.

Se descubrió que la presión parcial de dióxido de carbono de al menos aproximadamente 35 kPa (0,35 bar) en un proceso como se describe en este documento es, entre otras cosas, el resultado de la actividad respiratoria de una célula fúngica, el contenido de oxígeno en el gas, el caudal del gas y la presión en una localización específica en el recipiente de fermentación. Por ejemplo, dependiendo de la concentración de oxígeno en el gas añadido al medio de fermentación, la presión aplicada en el espacio vacío de un recipiente de fermentación puede ajustarse de modo que se obtenga una presión parcial de dióxido de carbono de al menos aproximadamente 35 kPa (0,35 bar).

Un proceso para producir un ácido dicarboxílico como se describe en este documento, por ejemplo, comprende añadir un gas que comprende de aproximadamente el 22 a aproximadamente el 32% v/v, por ejemplo, de aproximadamente el 22 a aproximadamente el 30% v/v de oxígeno, o de aproximadamente el 25 a aproximadamente el 29% v/v de oxígeno y menos de aproximadamente el 0,1% de dióxido de carbono.

El gas adecuado es aire enriquecido con oxígeno. El aire enriquecido con oxígeno es aire con una concentración aumentada de oxígeno en comparación con el aire. Una ventaja de una concentración aumentada de oxígeno en comparación con la concentración normal de oxígeno en el aire en un proceso de la invención era que se podía generar una presión parcial promedio de dióxido de carbono mayor para producir una cantidad suficientemente alta de ácido succínico.

El gas en un proceso para producir un ácido dicarboxílico de acuerdo con la presente invención puede añadirse al recipiente en cualquier localización adecuada, por ejemplo, en la mitad inferior del recipiente de fermentación. El gas puede añadirse en una o más localizaciones en el recipiente de fermentación.

En una realización, un proceso de la presente descripción comprende añadir un gas que comprende oxígeno a un caudal entre aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,05 metro cúbico/metro cúbico/min, por ejemplo, entre aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,045 metro cúbico/metro cúbico/min. En el caso de que un gas comprenda aire enriquecido con oxígeno, puede aplicarse un caudal inferior que en el caso de que el gas comprenda aire.

En otra realización, un proceso como se describe en este documento comprende agitar el medio de fermentación. Agitar un medio de fermentación puede realizarse de cualquier modo conocido para los expertos en la materia. La agitación puede realizarse de modo que el recipiente de fermentación tenga una potencia de entrada entre aproximadamente 0,070 a aproximadamente 0,26 kW/metro cúbico, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,2 kW/metro cúbico, por ejemplo, entre aproximadamente 0,13 y aproximadamente 0,2 kW/metro cúbico.

Un proceso para producir un ácido dicarboxílico como se describe en este documento puede realizarse en cualquier modo de fermentación adecuado, tal como proceso discontinuo, semicontinuo, continuo o cualquier combinación adecuada de estos modos de fermentación.

Una fermentación discontinua se define en este documento como una fermentación donde todos los nutrientes se añaden al inicio de una fermentación.

Una fermentación semicontinua es una fermentación discontinua donde los nutrientes se añaden durante la fermentación. Los productos en una fermentación discontinua y semicontinua pueden recogerse en un momento adecuado, por ejemplo, cuando uno o más nutrientes se han agotado.

Una fermentación continua es una fermentación donde los nutrientes se añaden de forma continua a la fermentación y donde los productos se retiran de forma continua de la fermentación.

El medio de fermentación en un proceso para producir un ácido dicarboxílico como se describe en este documento puede comprender cualquier nutriente adecuado, tal como una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, que permite que la levadura produzca un ácido dicarboxílico. Un experto en la materia conocido la composición adecuada del medio de fermentación para una cepa de levadura específica.

Una célula fúngica adecuada en un proceso como se describe en este documento puede pertenecer a cualquier género adecuado *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Candida*, *Hansenula*, *Humicola*, *Issatchenkia*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Brettanomyces*, *Rhizopus*, *Zygosaccharomyces*, *Pachysolen* o *Yamadazyma*. Una célula fúngica puede pertenecer, por ejemplo, a una especie de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia stipidis*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sonorensis*, *C. glabrata*, *Hansenula polymorpha*, *Issatchenkia orientalis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Rhizopus oryzae* o *Zygosaccharomyces bailii*. En una realización, una célula fúngica en el proceso de la presente invención es una levadura, por ejemplo, que pertenece a una *Saccharomyces sp.*, tal como una *S. cerevisiae*.

Una célula fúngica en un proceso como se describe en este documento puede ser cualquier célula fúngica de tipo silvestre o recombinante o modificada genéticamente adecuada. Una célula fúngica modificada genéticamente puede comprender una modificación genética de un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen que codifica una piruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, una malato deshidrogenasa, una fumarasa, una fumarato reductasa, una isocitrato liasa, una malato sintasa y un transportador de ácido dicarboxílico.

Una célula fúngica recombinante puede comprender una modificación genética con una piruvato carboxilasa (PYC), que cataliza la reacción de piruvato en oxaloacetato (EC 6.4.1.1). La piruvato carboxilasa puede ser activa, por ejemplo, en el citosol tras la expresión del gen. Por ejemplo, la célula fúngica sobreexpresa una piruvato carboxilasa, por ejemplo, se sobreexpresa una piruvato carboxilasa endógena u homóloga.

Una célula fúngica recombinante puede comprender adicionalmente un gen que codifica una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa (4.1.1.49). Una célula fúngica puede modificarse genéticamente con una PEP carboxiquinasa heteróloga, tal como una PEP carboxiquinasa derivada de *Escherichia coli*, *Mannheimia sp.*, *Actinobacillus sp.*, o *Anaerobiospirillum sp.*, por ejemplo, *Mannheimia succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes* o *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Un gen que codifica una PEP carboxiquinasa puede sobreexpresarse y puede expresarse y se activa en el citosol de una célula fúngica.

En una realización, una célula fúngica se modifica genéticamente de forma adicional con un gen que codifica una malato deshidrogenasa (MDH) activa en el citosol tras la expresión del gen. La expresión citosólica puede obtenerse por delección de una señal de dirección al peroxisoma. La malato deshidrogenasa puede sobreexpresarse. Una MDH citosólica puede ser cualquier malato deshidrogenasa homóloga o heteróloga adecuada, que cataliza la reacción de oxaloacetato en malato (EC 1.1.1.37), por ejemplo, derivada de *S. cerevisiae*.

En otra realización, una célula fúngica de la presente descripción se modifica genéticamente de forma adicional con un gen que codifica una fumarasa, que cataliza la reacción de ácido málico en ácido fumárico (EC 4.2.1.2). Un gen que codifica fumarasa puede obtenerse de cualquier origen adecuado, preferiblemente de origen microbiano, por ejemplo, una levadura tal como *Saccharomyces* o un hongo filamentoso, tal como *Rhizopus oryzae*, o una bacteria tal como *Escherichia coli*. Una célula fúngica de la presente descripción puede sobreexpresar una secuencia de nucleótidos que codifica una fumarasa. La fumarasa puede ser activa en el citosol tras la expresión de la secuencia de nucleótidos, por ejemplo, delecionando una señal de dirección al peroxisoma. Se descubrió que la actividad citosólica de una fumarasa producía alta productividad de un ácido dicarboxílico por la célula fúngica.

En otra realización, la célula fúngica se modifica genéticamente con cualquier gen heterólogo u homólogo adecuado que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H), que cataliza la reacción de fumarato en succinato (EC 1.3.1.6). La fumarato reductasa dependiente de NADH puede ser una enzima heteróloga, que puede obtenerse de cualquier origen adecuado, por ejemplo, bacterias, hongos, protozoos o plantas. Una célula fúngica de la presente descripción comprende una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) heteróloga, preferiblemente derivada de una *Trypanosoma* sp., por ejemplo, una *Trypanosoma brucei*. En una realización, la fumarato reductasa dependiente de NAD(H) se expresa y es activa en el citosol, por ejemplo, delecionando una señal de dirección al peroxisoma. La célula fúngica puede sobreexpresar un gen que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H).

En otra realización, la célula fúngica puede comprender una modificación genética con un gen que codifica una proteína transportadora de ácido dicarboxílico, por ejemplo, una proteína transportadora de ácido málico. Una proteína transportadora de ácido dicarboxílico puede ser una proteína homóloga o heteróloga, por ejemplo, derivada de *Schizosaccharomyces pombe* o *Aspergillus niger*. Una célula fúngica como se describe en este documento puede sobreexpresar una proteína transportadora de ácido dicarboxílico.

Una célula fúngica modificada genéticamente puede comprender adicionalmente una modificación genética con un gen que codifica una isocitrato liasa (EC 4.1.3.1), que puede ser cualquier enzima heteróloga u homóloga adecuada. La isocitrato liasa puede obtenerse, por ejemplo, de *Kluyveromyces lactis* o *Escherichia coli*.

Una célula fúngica modificada genéticamente puede comprender adicionalmente una modificación genética con una malato sintasa (EC 2.3.3.9). La malato sintasa puede sobreexpresarse y/o ser activa en el citosol, por ejemplo, por delección de una señal de dirección al peroxisoma. En el caso de que la malato sintasa sea una malato sintasa de *S. cerevisiae*, por ejemplo, la malato sintasa nativa se altera por delección de la secuencia carboxi-terminal de SKL.

La expresión citosólica de las enzimas descritas anteriormente puede obtenerse por delección de una señal de dirección al peroxisoma o la mitocondria. La presencia de una señal de dirección al peroxisoma o la mitocondria puede determinarse, por ejemplo, por el método descrito por Schlüter et al., Nucleic Acid Research 2007, 35, D815-D822.

En otra realización, una célula fúngica recombinante en el proceso para producir un ácido dicarboxílico descrito en este documento comprende una alteración de un gen que codifica una enzima de la ruta de fermentación del etanol. Un gen que codifica una enzima de una ruta de fermentación del etanol, puede ser la piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1), que cataliza la reacción de piruvato en acetaldehído, o la alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), que cataliza la reacción de acetaldehído en etanol. Preferiblemente, una célula fúngica en el proceso como se describe en este documento comprende una alteración de uno, dos o más genes que codifican una alcohol deshidrogenasa. En el caso de que la célula fúngica sea una levadura, por ejemplo, *S. cerevisiae*, la levadura preferiblemente comprende una alteración de un gen de la alcohol deshidrogenasa *adh1* y/o *adh2*.

Un ácido dicarboxílico que se produce en un proceso como se describe en este documento puede ser ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico o ácido adipico, por ejemplo, ácido succínico.

En una realización, un ácido dicarboxílico que se produce en un proceso como se describe en este documento se recupera del medio de fermentación. La recuperación de un ácido dicarboxílico puede realizarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, por cristalización, precipitación con amonio, tecnología de intercambio iónico, centrifugación o filtración o cualquier combinación adecuada de estos métodos.

Un proceso para producir un ácido dicarboxílico puede realizarse a cualquier pH y temperatura adecuados. Un pH adecuado puede ser entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8, por ejemplo, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 6, por ejemplo, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5. Una temperatura adecuada puede ser, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 grados Celsius, por ejemplo, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 grados Celsius.

Figuras

Figura 1 Mapa físico del plásmido pPWT006.
Figura 2 Mapa físico del plásmido pPSUC044.

Figura 3 Mapa físico del plásmido pPWT007.

Figura 4 Mapa físico del plásmido pSUC047.

Figura 5 Mapa físico de pBOL034.

Figura 6 Mapa físico de pSUC091.

5 **Figura 7** Mapa físico de pBOL267.

Figura 8 Mapa físico de pSUC111.

Figura 9 Mapa físico de pBOL268.

Figura 10 Mapa físico de pSUC174.

Figura 11 Mapa físico de pSUC176.

10 **Figura 12** Principio básico del método de integración usado para la integración de los genes sintéticos *KIICL1* y *MLS1*. Se introducen por transformación dos fragmentos en la levadura. Un fragmento "LF" (para el lado izquierdo) y un fragmento "RF" (para el lado derecho). En el fragmento LF, el LF se coloca 5' desde los genes sintéticos *KIICL1* y *MLS1*. En 3' del gen hay un sitio loxP, y un gen amdS truncado 3'. En el fragmento RF, el RF está colocado 3' desde un sitio de clonación múltiple, en que pueden introducirse más genes. En 5' del sitio de clonación múltiple hay un sitio loxP, y un gen amdS truncado 5'. Los fragmentos LF y RF puede unirse *in vivo* a través de recombinación homóloga sobre el gen amdS. Los lados LF y RF son homólogos a secuencias colindantes en el genoma de levadura, lo que permite una integración de doble entrecruzamiento de los fragmentos LF y RF unidos. Los fragmentos amdS truncados individualmente no codifican proteínas activas, pero la recombinación de los dos fragmentos conduce a la capacidad de utilizar acetamida como fuente de N. Las células transformadas que poseen amdS activo, por tanto, tendrán los genes sintéticos *KIICL1* y *MLS1* integrados en el genoma.

15 **Figura 13** Representación del fragmento de 7,7 kB de pSUC174 que contiene los genes sintéticos MDH3, DCT_02 y FUMR y el marcador de selección KanMX, flanqueados por sitios lox66 y lox71. Después del remplazo del gen sintético SpMAE1 por el gen sintético DCT_02, el marcador KanMX se retiró por Cre-recombinasa (Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH., Nucleic Acids Res. 1996 Jul 1; 24(13):2519-2524).

25

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de las cepas SUC-662 y 632 (fuera del alcance de la invención)

30 **1.1 Construcción de vectores de integración**

El plásmido pSUC044 se construyó del siguiente modo: el plásmido pPWT006 (figura 1), que consiste en un locus *YGR059w* (*SPR3*) o *SIT2* (Gottlin-Ninfa y Kaback (1986) Molecular and Cell Biology vol. 6, n.º 6, 2185-2197) y los marcadores que permiten la selección de transformantes en el antibiótico G418 y la capacidad de crecer en acetamida, se digirió con las enzimas de restricción *MluI* y *Apal*. El marcador kanMX, que confiere resistencia a G418, se aisló de p427TEF (Dualsystems Biotech) y un fragmento que contiene el marcador amdS se ha descrito en la bibliografía (Swinkels, B.W., Noordermeer, A.C.M. y Renniers, A.C.H.M (1995). Yeast Volumen 11, Tema 1995A, página S579; y documento US 6051431).

40 Los genes que codifican la fumarato reductasa (FRDg) de *Trypanosoma brucei*, como se describe en la solicitud de patente WO2009/065778, y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCKa) de *Actinobacillus succinogenes*, como se describe en la solicitud de patente WO2009/065780, se sintetizaron por Sloning (Puchheim, Alemania). Se sintetizaron las secuencias específicas de promotor; gen; terminador, incluyendo sitios de restricción apropiados. Las secuencias se optimizaron en los pares de codones para su expresión en *S. cerevisiae* como se describe en la solicitud de patente WO2008/000632. Los genes sintéticos están bajo el control de (o unidos de forma funcional a) promotores fuertes de *S. cerevisiae*, es decir, el promotor *TDH3* que controla la expresión del gen *FRDg*, y el promotor *TPI1* que controla el gen *PCKa*. La terminación apropiada está controlada por secuencias terminadoras de *S. cerevisiae*, es decir, el terminador *TDH3* que controla el gen *FRDg* y el terminador *PMA1*, presente en el plásmido pPWT006, que controla el gen *PCKa*. La secuencia de promotor *TDH3*; gen *FRDg*; terminador *TDH3* estaba rodeada por los sitios de enzimas de restricción únicos *MluI* y *Apal*. La secuencia de promotor *TPI1*, gen *PCKa* estaba rodeada por los sitios de enzimas de restricción únicos *Apal* y *BsWI*. La clonación de la construcción sintética *FRDg* en pPWT006 digerida con *MluI* y *Apal* produjo el plásmido intermedio pPWT006-FRDg. La clonación de la construcción sintética *PCKa* en pPWT006-FRDg digerida con *Apal* y *BsWI* produjo el plásmido pSUC044 (SEQ ID NO: 1, figura 2).

55 El plásmido pSUC047 se construyó del siguiente modo: el plásmido pPWT007 (figura 3), que consiste en un locus *YEL023c* o *SIT4* (Gottlin-Ninfa y Kaback (1986) Molecular and Cell Biology vol. 6, n.º 6, 2185-2197) y los marcadores que permiten la selección de transformantes en el antibiótico G418 y la capacidad de crecer en acetamida, se digirió con las enzimas de restricción *MluI* y *Apal*.

60 Los genes que codifican la malato deshidrogenasa (MDH3) de *S. cerevisiae*, como se describe en la solicitud de patente WO2009/065778, la fumarasa (FUMR) de *Rhizopus oryzae*, como se describe en la solicitud de patente WO2009/065779, y el transportador de ácido málico (SpMAE1) de *Schizosaccharomyces pombe*, como se describe en la solicitud de patente WO2009/065778, se sintetizaron por Sloning (Puchheim, Alemania). Se sintetizaron las secuencias específicas de promotor; gen; terminador, incluyendo sitios de restricción apropiados. Las secuencias se optimizaron en los pares de codones para su expresión en *Saccharomyces cerevisiae* como se describe en la

65

solicitud de patente WO2008/000632. Los genes sintéticos estaban bajo el control de (o unidos de forma funcional a) promotores fuertes de *S. cerevisiae*, es decir el promotor *TDH3* que controla la expresión del gen *MDH3*, el promotor *TPI1* que controla el gen *FUMR* y el promotor *ENO1* que controla el gen *SpMAE1*. La terminación apropiada estaba controlada por secuencias terminadoras de *S. cerevisiae*, es decir, el terminador *TDH3* que controla el gen *MDH3*, el terminador *PMA1*, presente en el plásmido pPWT006, que controla el gen *PCKa*, y el terminador *ENO1* que controla el gen *SpMAE1*. La secuencia de promotor *TDH3*; gen *MDH3*; terminador *TDH3* estaba rodeada por los sitios de enzimas de restricción únicos *MluI* y *Apal*. La secuencia de promotor *TPI1*, gen *FUMR* estaba rodeada por los sitios de enzimas de restricción únicos *Apal*, *AscI* y *NotI* en el extremo 5' y *BsWI* en el extremo 3'. La secuencia de promotor *ENO1*; gen *SpMAE1*; terminador *ENO1* estaba rodeada por los sitios de enzimas de restricción únicos *MluI* y *Apal*. La clonación de la construcción sintética *MDH3* en pPWT007 digerida con *MluI* y *Apal* produjo el plásmido intermedio pPWT007-MDH3. La clonación de la construcción sintética *FUMR* en pPWT007-MDH3 digerida con *Apal* y *BsWI* produjo el plásmido pSUC046. La clonación de la construcción sintética *SpMAE1* en pSUC046 digerida con *AscI* y *NotI* produjo el plásmido pSUC047 (SEQ ID NO: 2, figura 4).

El plásmido pBOL034 (figura 5), que consiste en una secuencia promotora *YOL086C* (*ADH1*) de 1000 pb (1000 pb directamente cadena arriba del codón de inicio de *YOL086C*), una secuencia terminadora *YOL086C* (*ADH1*) de 500 pb (500 pb directamente cadena abajo del codón de parada) y las secuencias génicas insertadas, se usó como vector hospedador para construir pSUC091 (figura 6). Se obtuvo un fragmento de PCR de promotor *URA3*; gen *URA3*; terminador *URA3* usando el plásmido pRS416 como molde (Sikorski RS, Hieter P. 1989 mayo; 122(1):19-27). Los cebadores contenían sitios apropiados de enzimas de restricción, *MluI* para el cebador directo y *BsrGI* para el cebador inverso, para la subclonación adicional del fragmento de PCR. La secuencia génica que codifica la piruvato carboxilasa (*PYC2*) de *S. cerevisiae*, como se describe en la solicitud de patente WO2009/065780, se sintetizó por GeneArt (Regensburg, Alemania). Se sintetizó una secuencia específica de promotor; gen; terminador, incluyendo sitios de restricción apropiados. La secuencia génica se optimizó en los pares de codones para su expresión en *S. cerevisiae* como se describe en la solicitud de patente WO2008/000632. El gen sintético estaba bajo el control de (o unido de forma funcional a) un promotor fuerte de *S. cerevisiae*, es decir, el promotor *PGK1* que controla la expresión del gen *PYC2*. La terminación apropiada estaba controlada por una secuencia terminadora de *S. cerevisiae*, es decir, el terminador *PGK1* que controla el gen *PYC2*. La secuencia de promotor *PGK1*; gen *PYC2*; terminador *PGK1* estaba rodeada por los sitios de enzimas de restricción únicos *StuI* y *MluI*. Después de la restricción de pBOL034 con *BsrGI*, *PstI* y *SnaBI*, la restricción del fragmento de PCR *URA3* con *MluI* y *BsrGI* y la secuencia de promotor *PGK1*, gen *PYC2*, terminador *PGK1* con *StuI* y *MluI*, los tres fragmentos de ADN se ligaron por un ligamiento de 3 puntos para producir el plásmido pSUC091 (SEQ ID NO: 3, figura 6).

El plásmido pSUC111 usado para la integración de los genes sintéticos de la isocitrato liasa y malato sintasa, se construyó del siguiente modo. El plásmido p417-CYC (vector lanzadera de levadura-*E. coli* que contiene un marcador KanMX funcional en levadura, Dualsystems Biotech AG, Schlieren, Suiza) se restringió con *XbaI/EcoRV*, en que se ligó una construcción sintética de INT5'-repetición-LoxP-Amds (parcial) restringida con *XbaI/SwaI*, produciendo el plásmido pBOL267 (figura 7). La construcción sintética se sintetizó por GeneArt (Regensburg, Alemania).

Los genes que codifican la isocitrato liasa (*KIICL1*) de *Kluyveromyces lactis* y la malato sintasa (*MLS1*) de *S. cerevisiae* como se describe en la solicitud de patente WO2009/101180, se sintetizaron por Sloning (Puchheim, Alemania). Se sintetizaron las secuencias específicas de promotor; gen; terminador, incluyendo sitios de restricción apropiados. Las secuencias se optimizaron en los pares de codones para su expresión en *Saccharomyces cerevisiae* como se describe en la solicitud de patente WO2008/000632. Los genes sintéticos estaban bajo el control de (o unidos de forma funcional a) promotores fuertes de *S. cerevisiae*, es decir, el promotor *TDH1* que controla la expresión del gen *KIICL1*, y el promotor *TDH3* que controla la expresión del gen *MLS1*. La terminación apropiada estaba controlada por una secuencia terminadora de *S. cerevisiae*, es decir, el terminador *TDH1* que controla el gen *KIICL1* y el terminador *TDH3* que controla la expresión del gen *MLS1*.

Las construcciones de los genes sintéticos *KIICL1* y *MLS1* se ligaron en el plásmido pBOL267 produciendo el plásmido pSUC111 (SEQ ID NO: 4, figura 8).

El plásmido pBOL268 (SEQ ID NO: 5, figura 9) también es necesario para integrar las construcciones de los genes sintéticos *KIICL1* y *MLS1* en el locus INT. Los plásmidos pSUC111 y pBOL268 contienen una secuencia amdS parcial que quedará funcional después de la transformación con la parte restante de una secuencia amdS parcial, como se explica en la sección 1.2 y en la figura 11. Para obtener un gen amdS funcional, y para permitir la selección del crecimiento en acetamida como única fuente de nitrógeno, el plásmido restringido pSUC111 tiene que transformarse con el plásmido restringido pBOL268. El plásmido pBOL268 se construyó del siguiente modo. El plásmido p417-CYC (vector lanzadera de levadura-*E. coli* que contiene un marcador KanMX funcional en levaduras, Dualsystems Biotech AG, Schlieren, Suiza) se restringió con *Sall/SmaI*, en que se ligó una construcción sintética de Amds (parcial)-LoxP-repetición-INT3' restringida con *Sall/SwaI*, produciendo el plásmido pBOL268 (figura 9). La construcción sintética se sintetizó por GeneArt (Regensburg, Alemania).

Para reemplazar el gen sintético *SpMAE1* integrado en el ADN genómico por la secuencia DCT_02, se creó el plásmido pSUC174. La secuencia DCT_02 codifica un transportador putativo de ácido dicarboxílico (SEQ ID NO: 6)

con una identidad del 30,2% en comparación con la secuencia SpMAE1 determinada usando el programa Needle (algoritmo de Needleman y Wunsch, Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). La secuencia génica se optimizó en los pares de cocones para su expresión en *S. cerevisiae* como se describe en la solicitud de patente WO2008/000632. En la secuencia génica DCT_02 sintética, el codón de parada se modificó a TAAG. El gen DCT_02 sintético estaba bajo el control de (o unido de forma funcional a) un promotor fuerte de *S. cerevisiae*, es decir, el promotor ENO1 (600 pb cadena arriba del codón de inicio del gen *ENO1*). En el promotor ENO1, la T en la posición 596 (-5) se cambió a A para obtener una mejor secuencia Kozak. La terminación apropiada estaba controlada por una secuencia terminadora de *S. cerevisiae*, es decir, el terminador ENO1 (300 pb cadena abajo del codón de parada del gen *ENO1*). Las secuencias de promotor ENO1; DCT-02; terminador ENO1 estaban rodeadas por sitios de enzimas de restricción únicos. La secuencia resultante SEQ ID NO: 7 se sintetizó por GeneArt (Regensburg, Alemania).

El plásmido pSUC174 se creó del siguiente modo: el promotor ENO1; SpMAE1; terminador ENO1 se retiró del plásmido pSUC047. Se introdujo un casete KanMX flanqueado por sitios lox66 y lox71 (Lambert JM, Bongers RS, Kleerebezem M., Appl. Environ Microbiol. 2007 febrero; 73(4):1126-35) en el plásmido intermedio. Posteriormente, el gen sintético DCT_02 (SEQ ID NO: 7) se ligó en este plásmido intermedio, produciendo el plásmido pSUC174 (SEQ ID NO: 8, figura 10). El plásmido pSUC176 se creó del siguiente modo: el promotor ENO1; SpMAE1; terminador ENO1 se retiró del plásmido pSUC047. Posteriormente, un casete de Tag (repetición)-loxP-*amdS*-loxP-Tag (repetición) se ligó en la estructura del vector, produciendo el vector intermedio pSUC175. La secuencia Tag consiste en los nucleótidos CGTATATGTCATGCTCGTGACAAAGAGCGTAAGATGGCGAAC, que codificarían una proteína con la secuencia RICHARDKERKMAN. La secuencia del gen sintético DCT_02 se ligó en el vector pSUC175, produciendo el plásmido de remplazo pSUC176 (figura 11).

1.2 Transformación de levaduras

La cepa de *Saccharomyces* CEN.PK113-5D (*MATa ura3.52 HIS3 LEU2 TRP1 MAL2-8 SUC2*) se transformó con el plásmido pSUC047 (figura 4), que se había linealizado previamente con *SfiI* (New England Biolabs), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diseñó un sitio *SfiI* sintético en la secuencia del gen *SIT4* presente en el plásmido pPWT007 (denominado SIT4A, véase la figura 3). Las mezclas de transformación se sembraron en placa en YPD-agar (por litro: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 20 g de dextrosa, 20 g de agar) que contenía 100 µg de G418 (Sigma Aldrich) por ml. Después de dos a cuatro días, aparecieron colonias en las placas, mientras que el control negativo (es decir, sin adición de ADN en el experimento de transformación) produjo placas YPD/G418 de blanco. Como alternativa, se seleccionaron los transformantes positivos en placas de agar que contenían acetamida, que puede usarse como fuente única de nitrógeno debido a la presencia del marcador acetamidasa (*amdS*) después de la integración de la construcción de ADN. Para este propósito, las mezclas de transformación se sembraron en placas de agar acetamida (por litro: 20 g de agar, 20 g de dihidrogenofosfato potásico, 0,5 g de sulfato de magnesio-heptahidrato, 70 ml de galactosa al 32%, 1 ml de dextrosa al 50%, 12,5 ml de acetamida 400 mM (Sigma), 1 ml de vitaminas y 1 ml elementos traza (las composiciones de vitaminas y elementos traza se describen en la bibliografía (Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Yeast, 1992 julio; 8(7):501-517). Después de dos a cuatro días, aparecieron colonias en las placas, mientras que el control negativo (es decir, sin adición de ADN en el experimento de transformación) produjo placas de acetamida agar de blanco. La integración del plásmido pSUC047 estaba dirigida al locus *SIT4*. Los transformantes correctos con integración de la única copia de los genes *MDH3*, *FUMR* y *SpMAE1* en el locus *SIT4* se caracterizaron usando técnicas de PCR. Se usó una cepa en que se integró una única copia de los genes sintéticos a insertarse en el locus *SIT4*, denominada CEN.PK113-5D-pSUC047 para el rescate de marcador (véase a continuación). La cepa sin marcador resultante se denominó SUC-270 (*MATa ura3.52 HIS3 LEU2 TRP1 sit4::TDH3p-MDH3-TDH3t;ENO1p-SpMAE1-ENO1t;TPI1p-FUMR-PMA1t MAL2-8 SUC2*).

La cepa SUC-270 se transformó con el plásmido pSUC044 (figura 2), que se había linealizado previamente con *SfiI* (New England Biolabs), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diseñó un sitio *SfiI* sintético en la secuencia del gen *SIT2* en el plásmido pPWT006 (denominado SIT2A, véase la figura 1). Las mezclas de transformación se sembraron en placa como se ha descrito anteriormente. Después de dos a cuatro días, aparecieron colonias en las placas, mientras que el control negativo (es decir, sin adición de ADN en el experimento de transformación) produjo placas YPD/G418 de blanco. La integración del plásmido pSUC044 estaba dirigida al locus *SIT2*. Los transformantes correctos con integración de una única copia de los genes *PCKa* y *FRDg* en el locus *SIT2* se caracterizaron usando técnicas de PCR. La cepa resultante de integración de una única copia se denominó SUC-304, que se usó posteriormente para el rescate de marcador (véase a continuación), produciendo la cepa libre de marcador SUC-347 (*MATa ura3.52 HIS3 LEU2 TRP1 sit2::TPI1p-PCKa-PMA1t;TDH3p-FRDg-TDH3t sit4::TDH3p-MDH3-TDH3t;ENO1p-SpMAE1-ENO1t;TPI1p-FUMR-PMA1t MAL2-8 SUC2*). La cepa SUC-347 se analizó adicionalmente por análisis de transferencia de Southern, que confirmó la correcta integración de los genes sintéticos introducidos y la recombinación externa de los genes marcadores.

Para ser capaces de transformar las cepas de levadura CEN.PK113-5D-pSUC047 y SUC-304 con otras construcciones, usando los mismos marcadores de selección, fue necesario retirar los marcadores de selección. El diseño del plásmido pSUC044 y pSUC047 era tal, que tras la integración de pSUC044 y pSUC047 en el cromosoma, las secuencias homólogas estaban en cercana proximidad entre sí. Este diseño permitió que los marcadores de selección se perdieran por recombinación intramolecular espontánea de estas regiones homólogas.

Tras el crecimiento vegetativo, tendrá lugar la recombinación intramolecular, aunque a baja frecuencia. La frecuencia de esta recombinación depende de la longitud de la homología y el locus en el genoma (resultados no publicados). Tras la transferencia secuencial de una subfracción del cultivo a medio fresco, se acumularán los recombinantes intramoleculares con el tiempo.

Para este fin, las cepas CEN.PK113-5D-pSUC047 y SUC-304 se cultivaron en medio YPD (por litro: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 20 g de dextrosa), partiendo de un aislado de una única colonia. Se usaron 25 µl de un cultivo durante una noche para inocular medio YPD fresco. Después de al menos cinco de dichas transferencias en serie, se determinó la densidad óptica del cultivo y las células se diluyeron hasta una concentración de aproximadamente 5000 por ml. Se sembraron en placa 100 µl de la suspensión celular en medio Yeast Carbon Base (Difco) que contenía KPI 30 mM (pH 6,8), (NH₄)₂SO₄ al 0,1%, fluoro-acetamida 40 mM (Amersham) y agar al 1,8% (Difco). Las células idénticas a células de las cepas CEN.PK113-5D-pSUC047 y SUC-304, es decir, sin recombinación intracelular, aún contenían el gen *amdS*. Para esas células, la fluoro-acetamida es tóxica. Estas células no serán capaces de crecer y no formarán colonias en un medio que contiene fluoro-acetamida. Sin embargo, si ha sucedido recombinación intramolecular, las variantes CEN.PK113-5D-pSUC047 y SUC-304 que han perdido los marcadores de selección serán capaces de crecer en el medio de fluoro-acetamida, ya que son incapaces de convertir la fluoro-acetamida en compuestos inhibidores del crecimiento. Esas células formarán colonias en este medio de agar. Las colonias resistentes a fluoro-acetamida obtenidas de CEN.PK113-5D-pSUC047 y SUC-304 se sometieron a análisis por PCR para confirmar que la recombinación externa de los marcadores de selección había tenido lugar como se pretendía. Como resultado, el casete con los genes *MDH3*, *FUMR*, *SpMAE1*, *PCKa* y *FRDg* bajo el control de los promotores fuertes de levadura se había integrado en el locus *SIT4* del genoma de la cepa hospedadora.

La cepa SUC-347 se transformó con un fragmento de 6,4 kB del plásmido pSUC091, que se había linealizado previamente con las enzimas de restricción *SwaI*, *Sall* y *ClaI* (figura 6). Las mezclas de transformación se sembraron en placa en Yeast Nitrogen Base (YNB) sin AA (Difco) + glucosa al 2%. Los transformantes correctos se seleccionaron inicialmente por prototrofismo a uracilo, porque la cepa precursora tenía auxotrofismo por uracilo (*ura3.52*), que se complementó por una copia funcional del gen *URA3*. Los transformantes se analizaron adicionalmente por PCR para confirmar la dirección correcta del producto de PCR *URA3* y la construcción sintética *PYC2* en el locus *adh1*. La cepa resultante se denominó SUC-401 (*MATa ura3.52 HIS3 LIEU2 TRP1 sit2::TPI1p-PCKa-PMA1t;TDH3p-FRDg-TDH3t sit4::TDH3p-MDH3-TDH3t;ENO1p-SpMAE1-ENO1t;TPI1p-FUMR-PMA1t adh1::PGK1p-PYC2-PGK1t;URA3p-URA3-URA3t MAL2-8 SUC2*).

Se introdujeron por transformación *KIICL1* y *MLS1* en la cepa SUC-401 del siguiente modo: el plásmido pSUC111 (figura 8) se restringió usando las enzimas *AsSI* y *SbfI*. Se escindió un fragmento de 9,06 kB que contenía los genes sintéticos *KIICL1* y *MLS1*, el lado 5' INT (véase a continuación), un sitio *loxP* y una secuencia *amdS* parcial de un gel de agarosa.

El plásmido pBOL268 (figura 9) se restringió usando las enzimas *SgrAI* y *AvrII*. Se escindió un fragmento de 2,4 kB que contenía el lado 3' INT1 (véase a continuación), un sitio *loxP* y una secuencia *amdS* parcial de un gel de agarosa. Ambos fragmentos se introdujeron por transformación en la cepa SUC-401. Los transformantes se seleccionaron en placas selectivas que contenían acetamida como única fuente de nitrógeno (Yeast Carbon Base (Difco) que contiene galactosa como fuente de C).

La integración de los genes sintéticos *KIICL1* y *MLS1* se consiguió transformando dos construcciones que se combinan *in vivo* por recombinación. El plásmido pSUC111 contiene una secuencia *amdS* parcial que quedará funcional después de la transformación con la parte restante de una secuencia *amdS* parcial, como se explica a continuación y en la figura 11. Para obtener un gen *amdS* funcional, y para permitir la selección por crecimiento en acetamida como única fuente de nitrógeno, el plásmido pSUC111 restringido tiene que transformarse con el plásmido pBOL268 restringido. La recombinación *in vivo* de las partes 5' y 3' de *amdS* fusionará los dos fragmentos y producirá un gen *amdS* funcional. El gen *amdS* funcional consistirá en el promotor *PMA1* de *S. cerevisiae*, el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* y el terminador de la transcripción del gen *LAC4* de *K. lactis*. Este casete confiere a la célula de levadura transformada la capacidad de utilizar acetamida como única fuente de nitrógeno. La recombinación de las regiones flanqueantes LF (lado izquierdo) y RF (lado derecho) con las secuencias homólogas genómicas conduce a la integración de la construcción en el genoma. Los transformantes positivos se volvieron a sembrar en estrías y se comprobaron por PCR para la presencia de los genes sintéticos *KIICL1* y *MLS1*. La cepa resultante se denominó SUC-443 (*MATa ura3.52 HIS3 LEU2 TRP1 sit2::TPI1p-PCKa-PMA1t;TDH3p-FRDg-TDH3t sit4::TDH3p-MDH3-TDH3t;ENO1p-SpMAE1-ENO1t;TPI1p-FUMR-PMA1t adh1::PGK1p-PYC2-PGK1t;URA3p-URA3-URA3t MAL2-8 SUC2 int::TDH1p-ICL1-TDH1t; TDH3p-MLS1-TDH3t; loxP-Amds-loxP*). Los genes sintéticos de la isocitrato liasa y malato sintasa se integraron en el ADN genómico de levadura entre las fases de lectura abierta *NTR1* (YOR071c) y *GYP1* (YOR070c) localizadas 659 pb cadena abajo del codón de parada de *NTR1* y 997 pb cadena arriba del codón de inicio de *GYP1* en el cromosoma XV. Esta integración se llamó INT.

El marcador *amdS* flanqueado por sitios *loxP* se retiró de la cepa SUC-443 por transformación de Cre-recombinasa (Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH., Nucleic Acids Res. 1996 julio 1; 24(13):2519-2524)

usando el plásmido pSH65 que contenía un marcador de resistencia a fleomicina. La retirada del marcador amdS se confirmó por ensayo en placa. La fluoro-acetamida es tóxica para las células que contienen el gen amdS, que convierte la fluoro-acetamida en un compuesto tóxico. Los transformantes que han perdido el marcador amdS serán capaces de crecer en las placas de agar con fluoro-acetamida, ya que son incapaces de convertir la fluoro-acetamida en compuestos inhibidores del crecimiento. Esas células formarán colonias en estas placas de agar. Posteriormente, el plásmido pSH65 se eliminó de las células por crecimiento en medio no selectivo (YEP galactosa al 2%), produciendo la cepa SUC-489. Un sitio loxP ha permanecido en el ADN genómico de la cepa SUC-489.

Para remplazar el gen del transportador de ácido dicarboxílico SpMAE1 por el gen del transportador de ácido dicarboxílico DCT_02, se construyó el plásmido pSUC174 (figura 10) como se describe en el ejemplo 1.1. pSUC174 contiene en el extremo 5' el gen sintético FUMR, el transportador DCT_02 y un marcador de selección KanMX flanqueado por sitios lox66/lox71 (Lambert JM, Bongers RS, Kleerebezem M., Appl Environ Microbiol. 2007 febrero; 73(4):1126-35), y en el extremo 3' el gen sintético MDH3. El plásmido pSUC174 se restringió con *Bsu36I* y *FseI* y el fragmento resultante de 7,7 kB se purificó y se introdujo por transformación en la cepa SUC-489. Por recombinación homóloga sobre el gen sintético FUMR y el gen sintético MDH3 presente en el ADN genómico de la cepa SUC-489, la construcción pSUC174 linealizada reemplazó el transportador SpMAE1 por DCT_02 (figura 13). Los transformantes correctos se seleccionaron inicialmente por su resistencia frente a G418, debido a la integración del marcador de resistencia KanMX. A continuación, se realizó una PCR de diagnóstico sobre la cepa intermedia SUC-661 para confirmar el reemplazo del gen sintético SpMAE1 por el gen sintético DCT_02. El marcador KanMX flanqueado por sitios lox66 y lox71 se retiró de la cepa SUC-661 por transformación de la Cre-recombinasa (Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH., Nucleic Acids Res. 1996 julio 1; 24(13):2519-2524) usando el plásmido pSH65 que contiene un gen de resistencia a fleomicina. Posteriormente, el plásmido pSH65 se eliminó de las células por crecimiento en medio no selectivo (YEP galactosa al 2%), permaneciendo un lox72 en el ADN genómico. La cepa resultante se denominó SUC-662 (*MATa ura3.52 HIS3 LEU2 TRP1 sit2::TPI1p-PCKa-PMA1t;TDH3p-FRDg-TDH3t sit4::TDH3p-MDH3-TDH3t;ENO1p-DCT_02-ENO1t;TPI1p-FUMR-PMA1t;lox72 adh1::PGK1p-PYC2-PGK1t;URA3p-URA3-URA3t MAL2-8 SUC2 int::TDH1p-ICL1-TDH1t; TDH3p-MLS1-TDH3t*).

A continuación, la segunda copia del gen SpMAE1 presente en el ADN genómico de SUC-489 se reemplazó por transformación de un fragmento de 9,5 kB de pSUC176 (figura 11 - construido como se describe en el ejemplo 1.1). Este plásmido contiene en el extremo 5' el gen sintético FUMR, el transportador DCT_02 y un marcador de selección amdS flanqueado por sitios loxP, y en el extremo 3' el gen sintético MDH3. El plásmido pSUC176 se restringió con *Bsu36I* y *FseI* y el fragmento resultante de 9,5 kB se purificó y se introdujo por transformación en la cepa SUC-662. El fragmento de pSUC176 puede reemplazar el gen SpMAE1 restante o el gen DCT_02 introducido. Los transformantes positivos se seleccionaron por la capacidad de crecer en acetamida como única fuente de nitrógeno (reemplazo de la segunda copia de SpMAE1) y la capacidad de crecer en placas que contienen G418 como marcador de selección (reemplazo de la primera copia de SpMAE1). Solamente aquellas colonias que son capaces de crecer en estas dos placas tienen un reemplazo de las dos copias de SpMAE1. En el caso de que la segunda construcción de reemplazo (marcador amdS) reemplace la primera construcción de reemplazo (marcador KanMX), los transformantes son capaces de crecer en placas que contienen acetamida como única fuente de nitrógeno, pero no son capaces de crecer en placas que contienen G418. Los transformantes que contenían solamente genes DCT_02 y no genes SpMAE1 se confirmaron por PCR. Esto produjo la cepa SUC-571 que aún contiene un marcador de selección KanMX y amdS. Para retirar el marcador KanMX flanqueado por sitios lox66 y lox71 y el marcador amdS, flanqueado por sitios loxP, la cepa SUC-571 se transformó con pSH65 por la expresión de Cre-recombinasa (pSH65 contiene un marcador de resistencia a fleomicina, Güldener, 1996). La retirada de los marcadores KanMX y amdS se confirmó por ensayo en placa, produciendo la cepa SUC-592. Después de la retirada de los marcadores, un sitio lox72 y un sitio loxP permanecen presentes en el cromosoma (probablemente en el cromosoma V, en el que está localizado el sitio de integración *S174*). Posteriormente, el plásmido pSH65 se eliminó del ADN genómico de la cepa SUC-592 cultivando en medio no selectivo, produciendo la cepa SUC-632.

Ejemplo 2: Producción de ácido succínico por levaduras en presencia de flujo de gas de diferentes composiciones y diferentes presiones

La cepa de levadura SUC-401 construida como se ha descrito anteriormente, se cultivó en matraz de agitación (150 ml) durante 3 días a 30°C y 110 rpm. El medio estaba basado en medio Verduyn (Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Yeast, 1992 julio; 8(7):501-517), pero se hicieron modificaciones en la fuente de carbono y nitrógeno como se describe en este documento a continuación.

Tabla 1. Composición del medio precultivo

Materia prima		Concentración (g/l)
Galactosa	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	20,0
Urea	$(NH_2)_2CO$	2,3
Dihidrogenofosfato potásico	KH_2PO_4	3,0
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
Solución de elementos traza ^a		1
Solución de vitaminas ^b		1

^aSolución de elementos traza

Componente	Fórmula	Concentración (g/kg)
EDTA	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	15,00
Sulfato de zinc $\cdot 7H_2O$	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4,50
Cloruro de manganeso $\cdot 2H_2O$	$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	0,84
Cloruro de cobalto (II) $\cdot 6H_2O$	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,30
sulfato de cobre (II) $\cdot 5H_2O$	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,30
Sodio molibdeno $\cdot 2H_2O$	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,40
Cloruro cálcico $\cdot 2H_2O$	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,50
Sulfato de hierro $\cdot 7H_2O$	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	3,00
Ácido bórico	H_3BO_3	1,00
Yoduro potásico	KI	0,10

^bSolución de vitaminas

Componente	Fórmula	Concentración (g/kg)
Biotina (D-)	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	0,05
Pantotenato de Ca D(+)	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	1,00
Ácido nicotínico	$C_6H_5NO_2$	1,00
Mio-inositol	$C_6H_{12}O_6$	25,00
Clorhidrato de cloruro de tiamina	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS \cdot xH_2O$	1,00
Clorhidrato de piridoxol	$C_8H_{12}ClNO_3$	1,00
Ácido p-aminobenzoico	$C_7H_7NO_2$	0,20

- 5 Posteriormente, se transfirió el contenido del matraz de agitación a un fermentador de siembra (volumen de partida 10 l), que contenía el siguiente medio:

Tabla 2. Composición del medio del fermentador de siembra

Materia prima		Concentración (g/l)
Sulfato de amonio	$(NH_4)_2SO_4$	1,0
Dihidrogenofosfato potásico	KH_2PO_4	10
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,0
Solución de elementos traza		8,0
Solución de vitaminas		8,0

- 10 El pH se controló a 5,0 por la adición de amoníaco al 28%. La temperatura se controló a 30°C. La pO_2 se controló al 20% ajustando la velocidad del agitador. La concentración de glucosa se mantuvo limitada por el suministro controlado al fermentador (se aplicó un exponente de 0,1).

- 15 Después de 70 horas de fermentación, se transfirieron 1,5 l del fermentador de siembra al fermentador de producción (volumen de partida 15 l), que contenía el siguiente medio:

Tabla 3. Composición del medio del fermentador de producción

Materia prima		Concentración (g/l)
Urea	$(NH_2)_2CO$	1,0
Dihidrogenofosfato potásico	KH_2PO_4	3,0
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
Solución de elementos traza		1
Carbonato cálcico	$CaCO_3$	4
Biotina		0,001

- 20 No se aplicó control del pH durante toda la fermentación. El $CaCO_3$ añadido causó tamponación inicial del pH a aproximadamente 5-5,5. Posteriormente, el pH bajó por acidificación natural hacia un pH de 3 al final de la fermentación. La temperatura se controló a 30°C. La concentración de glucosa se mantuvo limitada por el suministro controlado al fermentador (0-24 h: 3,2 g/l/h; >24 h: 2,1 g/l/h o se adapta si es necesario).

- 25 Se realizaron dos fermentaciones de producción diferentes como se ha descrito anteriormente en presencia de diferentes flujos de gas y composiciones:

Durante la fermentación 1) se rociaron 0,33 vvm de aire al 100% al fermentador (volumen de partida 15 l);
Durante la fermentación 2) se rociaron 0,33 vvm de gas total (CO_2 al 50%, aire al 50%) al fermentador (volumen de partida 15 l).

- 30 Además, se realizaron otras dos fermentaciones diferentes 3) y 4) con la cepa SUC-662 a una escala de 200 metros cúbicos (volumen de partida) en un medio similar como se ha descrito en la tabla 3, usando una fermentación de

siembra de 20 metros cúbicos, que se prepara en un medio con la composición de la tabla 2. Para obtener la semilla para la fermentación de 20 metros cúbicos, se realiza una fermentación de 2 metros cúbicos desde una fermentación en matraz de agitación.

- 5 Durante la fermentación 3) se rocían 0,039 vvm de aire al fermentador (volumen de partida 200 m³).
 Durante la fermentación 4) se rocían 0,027 vvm de aire enriquecido con oxígeno (O₂ al 10%, aire al 90%) al fermentador (volumen de partida 200 m³).
 Durante la fermentación 3) se asume una presión del espacio vacío de 150 kPa (1,5 bar) absoluta; durante la fermentación 4) se asume una presión del espacio vacío de 250 kPa (2,5 bar) absoluta.
 10 Durante las cuatro fermentaciones, la pO₂ se controla al 5% ajustando la velocidad del agitador.

Resultados

- 15 Se calculó que el rendimiento de ácido succínico (Y_{ps}) en atmósfera de aire (el gas de entrada es aire) con presión aumentada (presión promedio absoluta de 300 kPa (3,0 bar) en el fermentador) y en atmósfera de oxígeno aumentado (aire enriquecido con oxígeno) combinada con presión aumentada (presión promedio absoluta de 200 kPa (2,0 bar) en el fermentador) es casi el doble de elevado en comparación con el rendimiento en aire al 100%, y similar al rendimiento en condiciones de CO₂ al 50% v/v (fermentación 2, tabla 4).

- 20 La fermentación 1) y 2) se basan en resultados experimentales, la fermentación 3) y 4) se basan en cálculos teóricos.

- 25 Los resultados muestran que una presión parcial de dióxido de carbono (pCO₂) suficiente es necesaria para un rendimiento apropiado de ácido succínico (Y_{ps}). La pCO₂ se calcula basándose en la fracción de oxígeno convertida (recogida por las células y convertida a CO₂ en cantidades equimolares) en el gas entrante multiplicada por la presión local presente. Se asumen que la captación de oxígeno por las células está en el mismo intervalo que la transferencia de oxígeno al caldo de fermentación. La transferencia de oxígeno se calcula basándose en la geometría del fermentador (relación de altura sobre diámetro) y el agitador, la composición del gas y el flujo del gas entrante, y la potencia de entrada del agitador.

- 30 **Tabla 4.** Efecto de la composición del flujo entrante de gas sobre el rendimiento de producción de ácido succínico (Y_{ps}), medido después de 42 h de fermentación.

Fermentación	Condición	%de O ₂ en el gas entrante	Presión promedio en el fermentador (kPa (bar) absoluta)	pCO ₂ (kPa (bar))	Y _{ps} (g/g)
Experimental					
1	Aire al 100%	21	100 (1)	4 (0,04)	0,24
2	Aire al 50%, CO ₂ al 50%	10,5	100 (1)	50 (0,50)	0,41
Calculado teóricamente					
3	Aire al 100%	21	300 (3,0)	47 (0,47)	0,4
4	Aire al 90%, O ₂ al 10%	28	200 (2,0)	46 (0,46)	0,4

- 35 **Ejemplo 3: Producción de ácido succínico por levaduras en presencia de flujo de gas de diferentes composiciones y diferentes presiones**

- La cepa de levadura SUC-632 construida como se ha descrito anteriormente, se cultivó en un recipiente de acero inoxidable (6 kg) durante 4 días a 30°C (colocado en baño de agua). Para la aireación y la mezcla apropiada, se suministraron 18 NI/min de aire al recipiente. El medio estaba basado en medio Verduyn (Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Yeast, 1992 julio; 8(7):501-517), pero se hicieron modificaciones en la fuente de carbono y nitrógeno como se describe en este documento a continuación.

Tabla 5. Composición del medio precultivo

Materia prima		Concentración (g/l)
Galactosa	C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	20,0
Urea	(NH ₂) ₂ CO	2,3
Dihidrogenofosfato potásico	KH ₂ PO ₄	3,0
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
Solución de elementos traza ^a		1
Solución de vitaminas ^b		1

- 45 ^aSolución de elementos traza

Componente	Fórmula	Concentración (g/kg)
EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O	15,00
Sulfato de zinc · 7H ₂ O	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4,50

Cloruro de manganeso · 2H ₂ O	MnCl ₂ · 2H ₂ O	0,84
Cloruro de cobalto (II) · 6H ₂ O	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,30
sulfato de cobre (II) · 5H ₂ O	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,30
Sodio molibdeno · 2H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,40
Cloruro cálcico · 2H ₂ O	CaCl ₂ · 2H ₂ O	4,50
Sulfato de hierro · 7H ₂ O	FeSO ₄ · 7H ₂ O	3,00
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	1,00
Yoduro potásico	KI	0,10

^bSolución de vitaminas

Componente	Fórmula	Concentración (g/kg)
Biotina (D-)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0,05
Pantotenato de Ca D(+)	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	1,00
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	1,00
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	25,00
Clorhidrato de cloruro de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS · xH ₂ O	1,00
Clorhidrato de piridoxol	C ₈ H ₁₂ ClNO ₃	1,00
Ácido p-aminobenzoico	C ₇ H ₇ NO ₂	0,20

- 5 Posteriormente, se transfirió el contenido del recipiente de acero inoxidable a un fermentador de siembra (volumen de partida 4,0 m³), que contenía el siguiente medio:

Tabla 6. Composición del medio del fermentador de siembra

Materia prima		Concentración (g/l)
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Dihidrogenofosfato potásico	KH ₂ PO ₄	10
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,0
Solución de elementos traza		8,0
Solución de vitaminas		8,0

- 10 El pH se controló a 5,0 por la adición de amoniaco al 20%. La temperatura se controló a 30°C. La pO₂ se controló al 20% ajustando la velocidad del agitador. La concentración de glucosa se mantuvo limitada por el suministro controlado al fermentador (se aplicó un exponente de 0,1).

- 15 Después de 70 horas de fermentación se transfirieron 4,7 m³ del fermentador de siembra a un fermentador de producción (volumen de partida 55 m³), que contenía el siguiente medio:

Tabla 7. Composición del medio del fermentador de producción

Materia prima		Concentración (g/l)
Urea	(NH ₂) ₂ CO	1,0
Dihidrogenofosfato potásico	KH ₂ PO ₄	3:0
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
Solución de elementos traza		1
Carbonato cálcico	CaCO ₃	4
Biotina		0,001
Sulfato de hierro	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,006

- 20 No se aplicó control del pH durante toda la fermentación. El CaCO₃ añadido causó tamponación inicial del pH a aproximadamente 5-5,5. Posteriormente, el pH bajó por acidificación natural hacia un pH de 3 al final de la fermentación. La temperatura se controló a 30°C. La concentración de glucosa se mantuvo limitada por el suministro controlado al fermentador (0-24 h: 3,0 g/l/h; >24 h: 2,1 g/l/h o se adapta si es necesario).

- 25 Se realizaron tres fermentaciones de producción diferentes como se ha descrito anteriormente en presencia de diferentes flujos de gas y composiciones:

- 30 Durante la fermentación 1) se rociaron 0,035 vvm de gas total (concentración del 30% de O₂) al fermentador, se aplicó sobrepresión extra de 40 kPa (0,4 bar) (140 kPa (1,4 bar) absoluta) sobre el espacio vacío.
 Durante la fermentación 2) se rociaron 0,018 vvm de gas total (concentración del 41% de O₂) al fermentador, se aplicó sobrepresión extra de 40 kPa (0,4 bar) (140 kPa (1,4 bar) absoluta) sobre el espacio vacío.
 Durante la fermentación 3) se rociaron 0,031 vvm de gas total (concentración del 29% de O₂) al fermentador, se aplicó sobrepresión extra de 90 kPa (0,9 bar) (190 kPa (1,9 bar) absoluta) sobre el espacio vacío.

Durante las cuatro fermentaciones, la pO₂ se controla al 5% ajustando la velocidad del agitador.

Resultados

5 Los resultados muestran que es necesaria una presión parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$) suficiente para un rendimiento apropiado de ácido succínico (Y_{ps}). La $p\text{CO}_2$ se calcula basándose en la fracción de oxígeno convertida (recogida por las células y convertida a CO_2 en cantidades equimolares) en el gas entrante multiplicada por la presión local presente.

10 Una presión parcial de dióxido de carbono suficiente puede lograrse aumentando la concentración de oxígeno en el gas del flujo entrante y/o aumentando la presión.

Tabla 8. Efecto de la composición del flujo entrante de gas sobre el rendimiento de producción de ácido succínico (Y_{ps}), medido después de 70 h de fermentación.

Fermentación	Flujo de gas total (vvm)	% O_2 en el gas entrante	Presión promedio en el fermentador (kPa (bar) absoluta)	$p\text{CO}_2$ (kPa (bar))	Y_{ps} (g/g)
1	0,035	30	170 (1,7)	40 (0,4)	0,43
2	0,018	41	170 (1,7)	63 (0,63)	0,52
3	0,031	29	220 (2,2)	52 (0,52)	0,52

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> DSM IP Assets B.V.	
5	<120> PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO DICARBOXÍLICO	
	<130> 28175-WO-PCT	
	<140>	
10	<141> 02-07-2012	
	<150> EP11172444.9	
	<151> 01-07-2011	
15	<160> 8	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
20	<211> 18320	
	<212> ADN	
	<213> Nucleótido artificial	
	<220>	
25	<223> Plásmido pSUC044	
	<400> 1	
	atttcgcgca agctaattcc ctattgtgag tcgtattaaa ttcgtaatca tgtcatagct	60
	gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat	120
	aaagtgtaaa gcctggggtg cctaagtgtg gagctaactc acattaattg cgttgcgctc	180
	actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg	240
	cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggag ctcttcgctt tcctcgctca ctgactcgct	300
	gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt	360
	atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc	420
	caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga	480
	gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata	540
	ccaggcggtt ccccttgga gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgcgcttac	600
	cggataacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg	660
	taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc	720
	cgttcagccc gaccgctgag ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag	780
	acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt	840
	aggcggtgct acagagttct tgaagtgtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt	900
	atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagggt gtagctcttg	960
	atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc agcagattac	1020
	gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca	1080

ES 2 616 790 T3

gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac	1140
ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac	1200
ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt	1260
tcggtcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtt	1320
accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt	1380
atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc	1440
cgctccatc cagtctatta attgttgcg ggaagctaga ctaagtagtt cgccagttaa	1500
tagtttgcc aacgttggtt ccattgctac aggcctcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg	1560
tatggcttca ttacgtccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt	1620
gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc	1680
agtgttatca ctcatgttta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt	1740
aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg	1800
gcgaccgagt tggctttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac	1860
tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttccgggcga aaactctcaa ggatcttacc	1920
gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tctgcaccc aactgatctt cagcatcttt	1980
tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaagg	2040
aataaggggc acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag	2100
catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa	2160
acaaataggg gttccgcgca cttttccccg aaaagtgcc cctgacgcgc cctgtagcgg	2220
cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc	2280
cctagcgcgc gctcctttcg cttttctccc ttctttctc gccacgttcg ccggctttcc	2340
ccgtcaagct ctaaactggg ggctcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct	2400
cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac	2460
ggtttttcgc ctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac	2520
tggaaacaaca ctcaacccta tctcgtctca ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat	2580
ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa ttaacgcga attttaacaa	2640
aatattaacg tttacaattt cccattcgcc attcaggtg cgcaactgtt gggaaggcg	2700
atcgtgctgg gcctcttcgc tattacgcc gctggcgaaa ggggatgtg ctgcaaggcg	2760
attaagttgg gtaaggccag ggttttccca gtcacgaagt tgtaaaacga cggccagtgc	2820
caagctagct ttgcagtgcg aatgggggag gagagtagat tctttcttca agaaagcaaa	2880
atattgaaat cttaagagaa ctagatgaaa gatttgattt attaacgaac cggaaggtta	2940
tatactattc ccattttttg aaggatatg ctaatatgtt tgagcgtttg ttatttcccc	3000

ES 2 616 790 T3

actcgtcttt ttgcctaaat agtgcctcga aacctaaagt ggatttgcga ttagctgtga	3060
cttacatttc cgaacttatc cgctcaacta gaagtcaatg gagaagcaat gcattaaatt	3120
gcctttcgcc ctctctctcg agttcctttg gatcacccctg atgcacgcct tgcatacga	3180
gaaatctctt cgaaggcatc ttacagaatt ttcgtttcct tttctctatt tttcattctg	3240
agaaatattt gcctgcatac attgtaatgg cgatctgggtg atccgcaatt ctagaacaca	3300
caatatgcat gtaatcgctg attttttttg ttttagaagc tctatcttca ggtaaaaatg	3360
agtagagaaa aaaaaacata ctggatcgat gcagaattag ggggttatta tcctgcaggt	3420
acatgatttt cagtgggaac attgcttttt agtagtccgg ttctcaacaa cttgtctaag	3480
tgttgaaaac aaaagaaatg gcgtagaaac aaagtagtgt aagtaaatct gccaatgttc	3540
tatgtataaa aagtaaaggc aagaagaggt tctatgcata tttctgaaaa tatctaatac	3600
actattataa tgcatacaga aactgtcgta tgatgaagtg cctatgagtt tttgtgtacg	3660
tgcttctcta gtatgtagcc ggttttctct tttcacctct ttttactact tatactacta	3720
cttttactac ctttcttcca cgtaatctag atctcaagcc acaattcttg ccctatgctc	3780
caacgtatac aacatcgaag aagagtcttt ctttagggag tcattggaaa agatagtatg	3840
atggtattcg atttacctat gtcgcaaaag aaagtcggg gcaacaccac agaatgcttt	3900
ctctgtacta ataacctgtt gtgcgcttaa cggctaatc gttaatcagc ggtgggttaa	3960
tttttgtaaa tctaattgtc catgattttc tttcttcaaa aggaacatgt agcgaaaatc	4020
ttttttttac tttgatacac tgcaattgtt tctgagcatg ctgaaatttt ctcgatgttt	4080
ttttttttta ttggcatcca agtaattaat ccttatgcta cgaaaaagtt gtaggaatga	4140
atcatgcata atctaaccga tatcatcata tactctgtgc taatattcta aacaagttcg	4200
aaaatatatt cttggcccat gtaataggtg gtaagtgtat tgctttgata ggaacgtcat	4260
tatcgcaaaa gacaatcggc actaataacc gtttaaatat tatcatgcat gtatacatca	4320
gtatctcata gaaatatacc tgtaagtaca tacttatcta agtataaatt ctcgacctat	4380
ggagtcacca catttccag caacttcccc acttcctctg caatcgccaa cgtcctctct	4440
tcactgagtc tccgtccgat aacctgcact gcaaccgggtg ccccatggta cgcctccgga	4500
tcatactctt cctgcacgag ggcataagc tcactaacgg ccttgaaact ctcatctctc	4560
ttatcgatgt tcttatccgc aaaggtaacc ggaacaacca cgctcgtgaa atccagcagg	4620
ttgatcacag aggcataccc atagtaccgg aactgggtcat gcgtagccgc agcggtaggc	4680
gtaatcggcg cgatgatggc gtccagttcc ttcccggcct tttcttcagc ctcccgccat	4740
ttctcaaggt actccatctg gtaattccac ttctggagat gcgtgtccca gagctcgttc	4800
atgttaacag ctttgatgtt cgggttcagt aggtctttga tatttggaat cgccggctcg	4860

ES 2 616 790 T3

ccggatgcac tgatatcgcg cattacgtcg gcgctgccgt cagccgcgta gatatgggag 4920
atgagatcgt ggccgaaatc gtgcttgat ggcgccaacg gggtcacggg gtgaccggct 4980
ttggcgagtg cggcgacggg ggtttccacg ccgcgcagga taggaggggtg tggaaggaca 5040
ttgccgtcga agttgtagta gccgatattg agcccgccgt tcttgatctt ggaggcaata 5100
atgtccgact cggactggcg ccaggggcatg gggatgacct tggagtcgta tttccatggc 5160
tcctgaccga ggacggattt ggtgaagagg cggaggtcct caacagagtg cgtaatcggc 5220
ccgacaaacg tgtgcaccgt ctctgaccc tccatgctgt tggccatctt tgcatacggc 5280
agccgcccac gactcggcct tagaccgtac aggaagttga acgcgccggg cactcgaatc 5340
gagccaccga tatccgttcc tacaccgatg acgccaccac gaatcccaac gatcgcaccc 5400
tcaccaccag aactgccgcc gcacgaccag ttcttggtgc gtgggttgac ggtgcgcccg 5460
atgatgttgt tgactgtctc gcagaccatc aggggtctgc ggacagaggt cttgacgtag 5520
aagacggcac cggctttgcg gagcatggtt gtcagaaccg agtccccttc gtctacttg 5580
tttagccatg agatgtagcc cattgatgtt tcgtagccct tgactcgaag ctggtctttg 5640
agagagatgg ggagggccatg gagtggacca acgggtctct tgtgctttgc gtagtattca 5700
tcgagttccc ttgcctgcgc gagagcggcg tcaggaaga actcgtgggc gcagtttgtt 5760
aactgctggg cgattgctgc ccgtttacag aatgctagcg taacttccac cgaggtcaac 5820
tctccggccc ccagcttggg cacaagatct gcagcggagg cctctgtgat cttcagttcg 5880
gcctctgaaa ggatccccga tttctttggg aaatcaataa cgctgtcttc cgcaggcagc 5940
gtctggactt tccattcatc agggatggtt tttgcgaggc gggcgcgctt atcagcggcc 6000
agttcttccc aggattgagg cattgtatat gagatagttg attgtatgct tggatatagct 6060
tgaaatattg tgcagaaaaa gaaacaagga agaaagggaa cgagaacaat gacgaggaag 6120
caaaagatta ataattgcag gtctatttat acttgatagc aaagcggcaa acttttttta 6180
tttcaaattc aagtaactgg aaggaaggcc gtataccgtt gctcattaga gagtagtgtg 6240
cgtgaatgaa ggaaggaaaa agtttcgtgt gttcgaagat acccctcatc agctctggaa 6300
caacgacatc tgttggtgct gtctttgtcg ttaatttttt cctttagtgt ctccatcat 6360
tttttttgc attgcggata tggtagagaca acaacggggg agagagaaaa gaaaaaaaaa 6420
gaaaagaagt tgcatgcgcc tattattact tcaatagatg gcaaattggaa aaagggtagt 6480
gaaacttcga tatgatgatg gctatcaagt ctagggtac agtattagtt cgttatgtac 6540
caccatcaat gaggcagtgt aattggtgta gtcttggtta gccattatg tcttgctctg 6600
tatctgttct attgtatatc tcccctccgc cacctacatg ttagggagac caacgaaggt 6660
attataggaa tcccgatgta tgggtttggt tgccagaaaa gaggaagtcc atattgtaca 6720
cccggaaca acaaaaggat ggtaccctgg atggcgccgt tagtatcgaa tcgacagcag 6780

ES 2 616 790 T3

tatagcgacc agcattcaca tacgattgac gcatgatatt actttctgog cacttaactt	6840
cgcatctggg cagatgatgt cgaggcgaaa aaaaatataa atcacgctaa cttttgatta	6900
aaatagaaca actacaatat aaaaaaacta tacaaatgac aagttcttga aaacaagaat	6960
ctttttattg tcagtactga ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta	7020
ttcatatcag gatttatcaat accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa	7080
aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggg atcgggtctgc gattccgact	7140
cgtccaacat caatacaacc tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt atcaagtga	7200
aaatcaccat gagtgcgac tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg catttctttc	7260
cagacttggt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaa	7320
ccgttattca ttctgtattg cgctgagcg agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga	7380
caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata	7440
ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata acctggaatg ctgttttgcc ggggatcgca	7500
gtggtgagta accatgcac atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc	7560
ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta	7620
cctttgccat gtttcagaaa caactctggc gcatcgggct tcccatataa tcgatagatt	7680
gtcgacacctg attgcccgc attatcgca gccatttat acccatataa atcagcatcc	7740
atgttggaat ttaatcgcg cctcgaaacg tgagtctttt ccttaccat ggttgtttat	7800
gttcggatgt gatgtgagaa ctgtatccta gcaagatttt aaaaggaagt atatgaaaga	7860
agaacctcag tggcaaatcc taacctttta ttttctcta caggggcgcg gcgtggggac	7920
aattcaacgc gactgtgagg ggagcgtttc cctgctcgca ggtctgcagc gaggagccgt	7980
ggtaccgggt actcaagcac aaactcccaa cactagagtc cactcagctc caattccctt	8040
acaaactcaa tataacaaaa acagagcaga aaacggtcac cactcctatg gttctcccca	8100
aagttattct ccaagacata cgaaaacacc tgtggatcct agatataatg ttatcgaca	8160
gaaaccagca ggcaggccta tacctccagc gccaaacctat tataacaact tgaacacttc	8220
cgtcaacgg atagcttcct ctctcctcc cctaattcac aatcaagcag tgcctgcaca	8280
actctgaag aaagttgcac ctgcttcgtt cgatagcaga gaagatgtac gagacatgca	8340
agtggccaca cagctatttc ataaccatga tgtaaagggc aaaaaccgac tgacagctga	8400
ggaactacag aacttactac aaaaacgac caactcccat tttgtatat catcagtaga	8460
tgcgtgata aatttatttg gtgcttcag gtttggcact gtcaaccagg cagaattcat	8520
cgcctatac aaaagagtga aaagttggag aaaagtttat gtggacaatg atatcaacgg	8580
atcgtccacc atttctgtaa gcgaatttca taactcactt caagaactag gatattaat	8640

ES 2 616 790 T3

accttttgaa gttagcgaga aaacatttga ccaatatgct gagtttataa acagaaatgg	8700
aacaggaaaa gaactaaagt ttgataaatt cggtgaggcg ttagtttggc taatgagatt	8760
aacaaaatta ttcaggaaat tcgatactaa tcaagaaggc attgcaacca tacagtacaa	8820
agattttatc tatgctacat tatatttagg tcgtttccta cctcattgat gaaaaccatt	8880
cgttccttct ggtagtaata caaatagaag aggtaaacca atcaatggcc cgtagtttg	8940
ccatttgctg catccttccc atgcaaagtg tcttcgtatt tagtgatggt ttgttagcga	9000
cacaaaagag acctcgatga cagacatttt tttttcttta cttaatgtat tataagtgtg	9060
tctgacctcg actatcatta taatattaat ttgaagttct attttacatt tatatgagtt	9120
attccattac ataataagga tatcaagagc agattagtgt ctttttagatt atacatcttt	9180
ttccccctt ttttgttgtt ggtagtgga agaaaaggat caattaacag aaataaataa	9240
ataaataata aaaacctaaa attccttttg cgtcattgaa tttttattat gaagtcaaaa	9300
gggagtcggt tgtcaacaga ctgtcctgtc gaatttccca agatagtctc tggattcgct	9360
gaggaaagtga aaatacgtag acaaagttcc caaggacagt acgccgtcga ttcacatcct	9420
ccgaaaagcc ctgaactgaa acacagaaga cgcgcgtggc cggccttagt caaaaaatta	9480
gccttttaat tctgctgtaa cccgtacatg cccaaaatag ggggcgggtt acacagaata	9540
tataacatcg taggtgtctg ggtgaacagt ttattcctgg catccactaa atataatgga	9600
gccgcctttt taagctggca tccagaaaaa aaaagaatcc cagcaccaaa atattgtttt	9660
cttcaccaac catcagttca taggtccatt ctcttagcgc aactacagag aacaggggca	9720
caaacaggca aaaaacgggc acaacctcaa tggagtgatg caacctgcct ggagtaaatg	9780
atgacacaag gcaattgacc cgcgcagtga tctatctcat tttcttacac cttctattac	9840
cttctgctct ctctgatttg gaaaaagctg aaaaaaagg ttgaaaccag ttccctgaaa	9900
ttattccctt acttgactaa taagtatata aagacggtag gtattgattg taattctgta	9960
aatctatttc ttaaaacttct taaattctac ttttatagtt agtctttttt ttagttttta	10020
aacaccaaga acttagtttc gaataaacac acataaaca acaaatgggt tgatggtaga	10080
tcttctgctt ccattgttgc cggtgaccca gaaagagctg ccagagaaag agatgctgct	10140
gccagagctt tgttgcaaga ctctccattg cacaccacca tgcaatacgc tacctctggt	10200
ttggaattga ctgttccata cgctttgaag gttgttgctt ctgctgacac ttctgacaga	10260
gccaaaggaag ttgctgatga agtcttgaga tgtgcctggc aattggctga caccgttttg	10320
aactctttca acccaaactc tgaagtctct ttagtcggta gattaccagt cggtaaaaag	10380
catcaaatgt ctgctccatt gaaacgtgtc atggcttggt gtcaaagagt ctacaactcc	10440
tctgctgggt gtttcgacct atccactgct ccagttgcc aaggcttgag agaaattgct	10500
ttgggtaagg aaagaacaa tgcttgtttg gaagctttga ctcaagcttg taccttgcca	10560

ES 2 616 790 T3

aactctttcg tcattgattt cgaagctggt actatctcca gaaagcacga acacgcttct	10620
ttggatttgg gtggtgtttc caaggggttac atcgtcgatt acgtcattga caacatcaat	10680
gctgctggtt tccaaaacgt tttctttgac tggggtggtg actgtcgtgc ctccggtatg	10740
aacgccagaa acactccatg ggtgtgctggt atcactagac ctecttcctt ggacatggtg	10800
ccaaaccctc caaaggaagc ttcttacatc tccgtcatct ctttggacaa tgaagctttg	10860
gctacctctg gtgattacga aaacttgatc tacactgctg acgataaacc attgacctgt	10920
acctacgatt ggaaaggtaa ggaattgatg aagccatctc aatccaatat cgctcaagtt	10980
tccgtcaagt gttactctgc catgtacgct gacgctttgg ctaccgcttg tttcatcaag	11040
cgtgaccag ccaaggtcag acaattgttg gatggttga gatacgttag agacaccgtc	11100
agagattacc gtgtctacgt cagagaaaac gaaagagttg ccaagatgtt cgaaattgcc	11160
actgaagatg ctgaaatgag aaagagaaga atttccaaca ctttaccagc tcgtgtcatt	11220
gttggtggtg gtggtttggc tggtttgtcc gctgccattg aagctgctgg ttgtggtgct	11280
caagttgttt tgatggaaaa ggaagccaag ttgggtggtg actctgccaa ggctacctct	11340
ggtatcaacg gttgggttac tagagctcaa gctaaggctt ccattgtcga tgggtgtaag	11400
tacttcgaaa gagataccta caagtctggt atcgggtggtg acaccgatcc agctttggtt	11460
aagactttgt ccatgaaatc tgctgacgct atcgggtggtg tgacttctct aggtgttcca	11520
ttgactgttt tgtcccaatt aggtggtcac tccagaaaga gaactcacag agctccagac	11580
aagaaggatg gtactccatt gccaatgggt ttcaccatca tgaaaacttt agaagatcat	11640
gttagaggta acttgtccgg tagaatcacc atcatggaaa actgttccgt tacctctttg	11700
ttgtctgaaa ccaaggaaa accagacggt accaagcaaa tcagagttac cgggtgtcga	11760
ttcactcaag ctggttctgg taagaccacc attttggtg atgctgttat cttggccacc	11820
ggtggtttct ccaacgacaa gactgctgat tctttgttga gagaacatgc cccacacttg	11880
gttaacttcc caaccaccaa cgggtccatgg gctactggtg atggtgtcaa gttggctcaa	11940
agattagggt ctcaattggt cgatatggac aaggttcaat tgcacccaac tggtttgatc	12000
aacccaaagg acccagccaa cccaaccaa tctttgggtc cagaagctct aagaggttct	12060
ggtggtgttt tgttgaacaa acaaggtaag agatttgtca acgaattgga tttgagatct	12120
gttggtttcca aggccatcat ggaacaagggt gctgaatacc caggttctgg tggttccatg	12180
tttgcttact gtgtcttgaa cgctgctgct caaaaattgt ttggtgtttc ctctcaogaa	12240
ttctactgga agaagatggg tttgttcgtc aaggctgaca ccatgagaga cttggctgct	12300
ttgattggtt gtccagttga atccgttcaa caaactttag aagaatacga aagattatcc	12360
atctctcaaa gatcttgtcc aattaccaga aaatctgttt acccatgtgt tttgggtacc	12420

ES 2 616 790 T3

aaagggtccat actatgtcgc ctttgtcact ccatctatcc actacaccat gggtggttgt	12480
ttgattttctc catctgctga aatccaaatg aagaacactt cttccagagc tccattgtcc	12540
cactccaacc caatcttggg tttattcggg gctggtgaag tcaccggtgg tgtccacggt	12600
ggtaacagat taggtggtaa ctctttgttg gaatgtgttg ttttcggtag aattgcccgt	12660
gacagagctt ctaccatttt gcaaagaaag tctctgtctt tgtctttcaa ggtctggacc	12720
actgttgttt tgagagaagt cagagaaggt ggtgtctacg gtgctggttc ccgtgtcttg	12780
agattcaact taccaggtgc tctacaaaga totggtctat ccttggttca attcattgcc	12840
atcagaggtg actgggacgg tcaacaattg attggttact actctccaat cactttgcc	12900
gacgatttgg gtatgattga cttttggcc agatctgaca agggactttt acgtgaatgg	12960
atctctgctt tggaaccagg tgacgctgtc gaaatgaagg ctgtgtgttg tttggtcatc	13020
gaaagaagat tatctgacaa gcacttcgtt ttcattgggtc acattatcaa caagctatgt	13080
ttgattgctg gtggtaccgg tgttgctcca atgttgcaaa tcatcaaggc cgctttcatg	13140
aagccattca tgcacacttt ggaatcgtc cacttgatct acgctgctga agatgtcact	13200
gaattgactt acagagaagt tttggaagaa cgtcgtcgtg aatccagagg taaattcaag	13260
aaaactttcg ttttgaacag acctcctcca ttatggactg acggtgtcgg tttcatcgac	13320
cgtggtatct tgaccaacca cgttcaacca ccatctgaca acttattggt tgccatctgt	13380
ggtccaccag ttatgcaaag aattgtcaag gccactttaa agactttagg ttacaacatg	13440
aacttggtca gaaccgttga cgaaactgaa ccatctggaa gttaaagtga atttacttta	13500
aatcttgcac ttaaataaat tttcttttta tagctttatg acttagtttc aatttatata	13560
ctattttaat gacattttcg attcattgat tgaaagcttt gtgttttttc ttgatgcgct	13620
attgcattgt tcttgtcttt ttcgccacat gtaatatctg tagtagatac ctgatacatt	13680
gtggtatgct agtgaaattt tagttaataa tggaggcgct cttaataatt ttggggatat	13740
tggctttttt ttttaaagtt tacaaatgaa ttttttccgc caggatgggc ccggcgcgcc	13800
gcggccgcga gacctaaacta catagtgttt aaagattacg gatatttaac ttacttagaa	13860
taatgccatt tttttgagtt ataataatcc tacgttagtg tgagcgggat ttaaactgtg	13920
aggaccttaa tacattcaga cacttctgcg gtatcacctt acttattccc ttcgagatta	13980
tatctaggaa cccatcaggt tgggtggaaga ttaccggttc taagactttt cagcttcctc	14040
tattgatgtt acacctggac accccttttc tggcatccag tttttaatct tcagtggcat	14100
gtgagattct cggaaattaa ttaaagcaat cacacaattc totcggatac cacctcgggt	14160
gaaactgaca ggtggtttgt tacgcatgct aatgcaaagg agcctatata cctttggctc	14220
ggctgctgta acaggggaata taaagggcag cataatttag gagtttagtg aacttgcaac	14280
atttactatt ttcccttctt acgtaaaat ttttcttttt aattctaaat caatcttttt	14340

ES 2 616 790 T3

caattttttg tttgtattct tttcttgctt aaatctataa ctacaaaaaa cacatacata	14400
aacaaaaaat gactgatttg aacaaattgg tcaaggaatt gaatgatttg ggtttgactg	14460
acgtcaagga aattgtctac aaccatctt acgaacaatt attcgaagaa gaaaccaagc	14520
caggtttgga aggtttcgac aagggtactt tgaccacttt aggtgctgtt gctgttgaca	14580
ccggtatttt caccggtcgt tctccaaagg acaaatacat tgtttgtgat gaaaccacca	14640
aggacaccgt ctggtggaac tctgaagctg ccaagaacga taacaagcca atgactcaag	14700
aaacctggaa atctttgaga gaattggttg ccaagcaatt gtctggttaag agattattcg	14760
ttgttgacgc tttctgtggt gcttctgaaa agcacagaat tgggtgcaga atggtcactg	14820
aagttgcttg gcaagctcat ttcgtcaaga acatgttcat cagaccaact gacgaagaat	14880
tgaagaactt caaggctgac ttcaccgttt tgaatggtgc caagtgtacc aacccaaact	14940
ggaaggaaca aggtttgaac tctgaaaact ttgttgcttt caacatcact gaaggatatcc	15000
aattgatttg tggtacctgg tacggtggtg aaatgaagaa gggatatgtt tccatgatga	15060
actatttctt gccattgaaa ggtgttgctt ccattgcactg ttctgccaat gtcggttaag	15120
atggtgacgt tgccatcttc ttcggtctat ccggtactgg taagaccact ctatccactg	15180
acccaagag acaattgatt ggtgatgacg aacacggttg ggacgaatct ggtgtcttta	15240
actttgaagg tggttgttac gccaaagacca tcaacttatc tcaagaaaac gaaccagata	15300
tctacggtgc catccgtcgt gatgctttgt tggaaaacgt tggtgtcaga gctgacggtt	15360
ctgttgactt cgacgacggt tccaagactg aaaacaccag agtttcttac ccaatctacc	15420
acattgacaa cattgtcaga cctgtttcca aggcgtggtc cgctaccaag gttatcttct	15480
tgactgctga tgctttcggg gtcttgccac ctgtttccaa attgactcca gaacaaaccg	15540
aatactactt ctgttccggg ttactgcca aattggtggt tactgaaaga ggtgtcactg	15600
aaccaactcc aactttctct gcttggttcg gtgctgcttt ctatctttg caccatcc	15660
aatacgtga tgtcttggtt gaaagaatga aggcctctgg tgctgaagct tacttggtca	15720
acaccggttg gaacggtacc ggtgaagaga tctccatcaa ggataccaga ggtatcattg	15780
atgctatctt ggacggttcc attgaaaagg ctgaaatggg tgaattgcca atcttcaact	15840
tggccattcc aaaggctttg ccagggtgtg acccagccat cttagatcca agagacacct	15900
acgttgacaa ggctcaatgg caagtcaagg ctgaagattt ggctaacaga ttctgcaaga	15960
actttgtcaa atacactgct aaccagaag ctgccaaatt ggttggtgct ggtccaaagg	16020
cttaagcgta cgcaattccg gggattgtc attctaatat tttatccaca cacacacctt	16080
aaaattttta gattaaatgg catcaactct tagcttcaca cacacacaca caccgaagct	16140
ggttggttta tttgatttga tataattggt ttctctggat ggtacttttt cttctctggt	16200

tatttcoctat tttaaaatat gaaacgcaca caagtcataa ttattctaata agagcacaat	16260
tcacaacacg cacatttcaa ctttaatat tttttagaaa cactttatatt agtctaattc	16320
ttaatTTTTA atatatataa tgcacacaca ctaatttatt cattaatttt ttattgagta	16380
ggatttgaaa atatttggtta tctttgcaag atgtttgtat agagggacaa agaatcgtct	16440
ttattatggt caaggcttta cgtcataata gttcctgccc agtcttcta taatacttta	16500
aagatctctt ctogtttgc ccatctggaa gtctcgttta cgtttatgcg cccatacaga	16560
cactcaagat acacacttac atgaacgtat acaaatctac taacactact tgaaaatatg	16620
aaccacagta catcatatta agacgtagta ttcatgatt gaaggccgc tccgcgaaat	16680
acctttactg attttgccgg ttaatcgc atgaatttct tcatcacaag aaagcaaaaca	16740
aatcgccagg ccattctaca agtttctttt tcttatgaag atgtaaaagc tactaaggcg	16800
tcattactct agatgactca gtttagtctg acctctata gtatactacc ctggcgctat	16860
gatgatgagc ggttctttta ttgcggaaac gaaaattccg ggaccggcga aatttgcccg	16920
gttttgctcg taaccggctt catgagtcg cttcaatagt agttgaatac ttatttaaac	16980
agcagaactt aactcactca tcacgctgtt tccgctgaat tttctcaaaa tatctaagca	17040
gtcaacaaat ataaagaata ttgaaattga cagttttgt cgctatcgat ttttattatt	17100
tgctgtttta aatcatggtt tacactccat ccaagggtcc aagaactctt tacgataagg	17160
tttttgatgc acatgtgtc catcaagatg aaaatggttc ctttttggtg tatatcgaca	17220
gacacttggc tcatgaagtc acctctccac aagcttgctg acggatcccg ggctgcagtc	17280
tagaaactat attgatgaag aaataagatc gtacattttc caagaagaac aacctgatag	17340
gacaaaaatg gttgataata gagtccattg ttgtttgtac tttctgagac cttcaataa	17400
gggaattgat actttagacg tcgtaacaat gaaaaaatta gcgaagagag tgaattta	17460
cccggttatt gctaaatcag atttgctaac gaaagaggaa ttgaaaaact tcaaaacaca	17520
agttagagaa ataataagag tacaagatat cctgtatgt tctttttctg gcgatgaagt	17580
tttgaatgca acacaagata tttttcaaaa atatccattc agtataattg catctaata	17640
gtacattttt aatgaaaagg gcgaaaaagt taaaggaaaga caatacaaat ggggcgctgt	17700
tgacattgaa aatgaaaagt actgtgactt caaaatcttg caaaagacga tttttgattg	17760
gaatttaatt gatctttag aaagtaccga ggattattat gaaaaatgca gatcgcccat	17820
cttgccgat ctgaaatgct aagaactagg ctattaaagg ccagagattg cttacaacg	17880
aaaagtgttg acataacgga agaacaaagg aaatttttg aggaagaaat gaacttcgat	17940
gaaatcgagg aaaacaaact caaaaattac aagtgtatg aaataattaa taaaacggtc	18000
atggataagg tggctacaga atgggtcct gaatttataa ctagacaatt agaagctaag	18060
aaaaaattca acgagctgtc caacagagaa atttcaaaat ttcgagactg gaaaaagagc	18120
ctattcatgg aacaagagaa ttttaacca gagattgaac aattgaatca caagttggaa	18180
aacttacaac tggaatgtca ggacttgga tacaagctgt taatcggaag aagttccaac	18240
agccattcca cagatagtgc tactttagta aacgttcaca tcaaaaggta gtattaatta	18300
aaaaaaaaaa aaagccaata	18320

5 <210> 2
<211> 18127
<212> ADN

<213> Nucleótido artificial

<220>

<223> Plásmido pSUC047

5

<400> 2

catcctggcg gaaaaaatc atttgtaaac tttaaaaaa aaagccaata tccccaaat	60
tattaagagc gcctccatta ttaactaaaa ttctactcag catccacaat gtatcaggta	120
tctactacag atattacatg tggcgaaaaa gacaagaaca atgcaatagc gcatcaagaa	180
aaaacacaaa gctttcaatc aatgaatcga aaatgtcatt aaaatagtat ataaattgaa	240
actaagtcac aaagctataa aaagaaaatt tattttaaag caagatttaa agtaaattca	300
ccttaactgt ccaagatgaa agacttacct ttttcaatgt tctttctcaa ttccttgaca	360
gcagtgttga ccaattgttc ttctcttgga gacaattttt ccaaacaga agtgtcaatg	420
gaaacaacgg aaccgtttct caaaacaatt ggcaagaga agtattcaat ggagttgtca	480
ccgactaatt gttgagcctt cttaccgttc ttcaaactg gcaagtagac gaaagcagac	540
aaagattcag tttctggcctt ttctgtgtgg aaagaacgta agacttcttc agcaaatttg	600
gcaccagcga aagccatgga caaggtagca gaaccggcac cttgcttgga cttgacaatt	660
tcgtcaccac cgaattggac tctgtggatg aaatgttcgt attgcttgac caattggaaa	720
accaaggatt tgcagtgat gattggaatg atggtttcac cagagtgaac accgatgacg	780
gtgacctttc tgtgcatggt ggtcttgtct tgttcttgac cgatctttgg gttcttcaac	840
atcaagtagt caaccaagaa agtttcagct ctgaccaaact ccaagttggt gacaccata	900
acgttacctg gcttgaactt acccatcttc ttcaaagttt caacggcaat tggaacaaa	960
gagttaacag ggttgagat gactaagata cgagcgtttg gggcaaattt accgacagca	1020
gtaaccaaag acttaacgat accagcgttc atcttgaaca aatcatctct ggtcaaact	1080
ggctttcttg gaacaccagc tggaatcaag acaacttgag cattggacaa agtgttttcg	1140
atggaatcct tgcgtaacc aacacaagag gagttggtgt tgatgtggga caaatcctta	1200
ccaatacctt cagcagctct gatatcgac aaagccaatt cagaaacgta tggagacaat	1260
ttcaataata gagataatgg ttgaccgaca ccaccagaag cacctaagat ggcaacctta	1320

accattttgt ttgtttatgt gtgtttattc gaaactaagt tcttggtggt ttaaaactaa	1380
aaaaaagact aactataaaa gtagaattta agaagtttaa gaaatagatt tacagaatta	1440
caatcaatac ctaccgtctt tatatactta ttagtcaagt aggggaataa tttcagggaa	1500
ctggtttcaa cctttttttt cagctttttc caaatcagag agagcagaag gtaatagaag	1560
gtgtaagaaa atgagataga tacatgcgtg ggtcaattgc cttgtgtcat cttttactcc	1620
aggcaggttg catcactcca ttgaggttgt gcccgttttt tgcctgtttg tgccccgtgt	1680
ctctgtagtt gogctaagag aatggacctt tgaactgatg gttggtgaa aaaacaatat	1740
tttggtgctg ggattctttt tttttctgga tgccagctta aaaagcgggc tccattatat	1800
ttagtggtat ccaggaataa actgttcacc cagacacctt cgatgttata tattctgtgt	1860
aaccgcggcc ctattttggg catgtacggg ttacagcaga attaaaaggc taattttttg	1920
actaaggccg gccacgcgtg aagatctcgt tatgtaccgg aatatgtcag tttacattgg	1980
tcagtcctatt ggagaattaa gtttgatcgt aggtatagac cggacaatat gccggaatat	2040
gtaaggcaat tgttccaaga tttggaaggt attgatttaa aaagtaataa agtttcaaat	2100
aaatatgata agcaagataa tagcaacggg agtgaaatca atgggggctt ttttgataat	2160
gaggaagggc aggaactcca catgggtcaa aaagcaagtt attttgcaac gacatacaat	2220
tcaagattat ttgacagtaa atactcccaa ttaaaaaaga aattcatgga ctgggatagt	2280
aattcctgga cagatattcc agatgattta aaaatatacc tacagcaaga tgaatcgtt	2340
tagcattaaa aaaacccctt cggtagctaa tataaaaaat tttataggta atatacatat	2400
ataaaaaatc ttcaatcatt tttaaatct tgtatacttt atacaacatg tgaaatcttc	2460
tgcttctgga catcaatatt caaatacagg ccaatcttag gtaaaacatt tggagaaaag	2520
aaggataagg caggacgagg gaagataaat agtttcgtta attataaata catgcagata	2580
aataaaggaa tatcaaatat tatgaataga aaaagaagat ggtgagacaa aaaagtagta	2640
ataaatagggt ccaaatcttc tttatttccc ctttcttttc ttatcctttt gttttctcca	2700
tattgtataa gaatatattc ttaggaaaat caacagggaa tacagtatag tgattttcgt	2760
tcctttttga gcgtaatccc ttcgagactg tgatgttgat tatttttggt gtgatttcaa	2820
aattcttagg ttagtgtgat agttcccggt cataacataa tggatagtaa atgaaaaatc	2880
aaaataaggg tgaaacaaat agacaataaa gatgtagttt tcgaggacga aaaacaaacc	2940
taaccaacaa tgaccttatt accatcgaat tcataagcag gaattttctaa gtttaagggg	3000
gcaggtccct ttctgattct accggaaata tcataatgtg aacctggca aggacagaac	3060
caaccaccaa aatcaccggc ttcaccaatt ggaacacaac ctaagttagt acaaataccc	3120
agcataatta accattgagg gtctttgact ctgtcagcat cggctctgtg gtcccttcaa	3180
ggggacatat ccacactgtt ggcttcctga atttcatgag gagttctgtg tctaataaac	3240

ES 2 616 790 T3

acaggcttac cttgccatth gacaaccacg tttttaccca atgggatagc cgctaaatta	3300
acttcaactt tagccatagc caaaacatcg gcagtagcgg tcatagatga aataaagggt	3360
tctacgggtg atttggcacc tgcagatgac aaaagaccca tagcaccgac cataaagtaa	3420
gcataagaac ggcctttatc agcatcgtha ttttccttta aaacgthac aaaatttggt	3480
gtcctgtacg tggatttgct agccagcaaa gattgagaaa tcaggtaacca cggctcctcg	3540
ctgcagacct gcgagcaggg aaacgctccc ctcacagtcg cgttgaattg tccccacgcc	3600
gcgcccctgt agagaaatat aaaaggthag gatttgccac tgaggthctt ctttcatata	3660
cttcctttta aaatcttgct aggatacagt tctcacatca catccgaaca taaacaacca	3720
tgggtaagga aaagactcac gtttcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg gatgctgatt	3780
tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca atctatcgat	3840
tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagthgt ttctgaaaca tggcaaagggt agcgttgcca	3900
atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg cctcttccga	3960
ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcattggt actcaccact gcgatccccg	4020
gcaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat attgttgatg	4080
cgtgagcagt gttcctgcgc cggthgcatt cgattcctgt ttgtaattgt ccttttaaca	4140
gcgatcgctt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt ttggttgatg	4200
cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg aaagaaatgc	4260
ataagctttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc tcaattgata	4320
accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttgacga gtcggaatcg	4380
cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagtht tctccttcat	4440
tacagaaacg gctttttcaa aaatatggtt ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt	4500
ttcatttgat gtcgatgag tttttctaata cagtactgac aataaaaaga ttcttgtht	4560
caagaacttg tcatthgtat agthttttta tattgtagth gthctatttt aatcaaath	4620
tagcgtgatt tatatttttt ttgcctcga catcatctgc ccagatgcga agthaaagtc	4680
gcagaaagta atatcatgcg tcaatcgtat gtgaatgctg gtcgctatac tgctgtcgat	4740
tcgatactaa cgcgcgcatc cagggtacca tcttttgtht gthtccgggt gtacaathat	4800
gacttcctct tttctggcaa ccaaaccat acatcgggat tctataata ccttcgtht	4860
tctccctaac atgtaggtg cggaggggag atatacaata gaacagatac cagacaagac	4920
ataatgggct aaacaagact acacaaatta cactgcctca ttgatggtg tacataacga	4980
actaatactg tagccctaga cttgatagcc atcatcatat cgaagthtca ctacccttt	5040
tccatttgcc atctattgaa gtaataatag gcgcatgcaa cttcttttct tttttttct	5100

ES 2 616 790 T3

tttctctctc ccccggttgt gtctcaccat atccgcaatg aaaaaaaaaa tgatggaaga	5160
cactaaagga aaaaattaac gacaaagaca gcaccaacag atgtcggtgt tccagagctg	5220
atgaggggta tcttcgaaca caggaactt tttccttcct tcattcacgc acactactct	5280
ctaagagca acggtatacg gccttccttc cagttacttg aatttgaaat aaaaaagtt	5340
tgccgctttg ctatcaagta taaatagacc tgcaattatt aatcttttgt ttccctcgta	5400
ttgttctcgt tccctttctt ccttgtttct tttctgcac aatatttcaa gctataccaa	5460
gcatacaatc aactatctca tatacaatgc ctcaatcctg ggaagaactg gccgctgata	5520
agcgcgcccg cctcgcaaaa accatccctg atgaatggaa agtccagacg ctgcctgcgg	5580
aagacagcgt tattgatttc ccaaaagaaat cggggatcct ttcagaggcc gaactgaaga	5640
tcacagaggg ctccgctgca gatcttgtgt ccaagctggc ggccggagag ttgacctcgg	5700
tggaagttac gctagcattc tgtaaacggg cagcaatcgc ccagcagtta acaaactgcg	5760
cccacgagtt cttccctgac gccgctctcg cgcaggcaag ggaactcgat gaatactacg	5820
caaagcacia gagaccggt ggtccactcc atggcctccc catctctctc aaagaccagc	5880
ttcgagtcaa gggctacgaa acatcaatgg gctacatctc atggctaaac aagtacgacg	5940
aaggggactc ggttctgaca accatgctcc gcaaagccgg tgccgtcttc tacgtcaaga	6000
cctctgtccc gcagaccctg atggtctgcg agacagtcaa caacatcctc gggcgccaccg	6060
tcaaccacg caacaagaac tggctgtgcg gcggcagttc tgggtggtgag ggtgcgacg	6120
ttgggattcg tgggtggcgtc atcgggtgag gaacggatat cgggtggctcg attcgagtgc	6180
cggccgcggt caacttcctg tacggtctaa ggccgagtc tgggcggctg ccgtatgcaa	6240
agatggcgaa cagcatggag ggtcaggaga cgggtcacag cgttgctcggg ccgattacgc	6300
actctgttga ggacctccgc ctcttcacca aatccgtcct cgggtcaggag ccattggaaat	6360
acgactccaa ggtcatcccc atgccctggc gccagtcoga gtcggacatt attgcctcca	6420
agatcaagaa cggcgggctc aatatcggct actacaactt cgaacggcaat gtccttcac	6480
accctcctat cctgcgcggc gtggaaacca ccgtcgccgc actcgccaaa gccggtcaca	6540
ccgtgacccc gtggacgcca tacaagcacg atttcggcca cgaatctcctc tcccatatct	6600
acgcggctga cggcagcgcc gacgtaatgc gcgatatcag tgcacccggc gagccggcga	6660
ttccaaatat caaagaccta ctgaaccga acatcaaagc tgttaacatg aacgagctct	6720
gggacacgca tctccagaag tggaattacc agatggagta ccttgagaaa tggcgggagg	6780
ctgaagaaaa ggccgggaag gaactggacg ccacatcgc gccgattacg cctaccgctg	6840
cggtagcgca tgaccagttc cggtagctat ggtatgcctc tgtgatcaac ctgctggatt	6900
tcacgagcgt ggttgttccg gttacctttg cggataagaa catcgataag aagaatgaga	6960
gtttcaaggc ggttagtgag cttgatgccc tcgtgcagga agagtatgat ccggaggcgt	7020

ES 2 616 790 T3

accatggggc accggttgca gtgcagggtta tcggacggag actcagtga gagaggacgt	7080
tggcgattgc agaggaagtg ggaagttgc tgggaaatgt ggtgactcca taggtcgaga	7140
atttatactt agataagtat gtacttacag gtatatcttct atgagatact gatgtataca	7200
tgcataataa tattttaaacg gttattagtgc ccgattgtct tgtgcgataa tgacgttcct	7260
atcaaagcaa tacacttaac acctattaca tgggccaaga aaatattttc gaacttggtt	7320
agaatattag cacagagtat atgatgatat ccgtagatt atgcatgatt cattcctaca	7380
actttttcgt agcataagga ttaattactt ggatgccaat aaaaaaaaaa aacatcgaga	7440
aaatttcagc atgctcagaa acaattgcag tgtatcaaag taataaaaaag attttcgcta	7500
catgttcctt ttgaagaaag aaaatcatgg aacattagat ttacaaaaat ttaaccaccg	7560
ctgattaacg attagaccgt taagcgcaca acaggttatt agtacagaga aagcattctg	7620
tgggtgtgac ccggactttc ttttgcgaca taggtaaatc gaataccatc atactatctt	7680
ttccaatgac tccctaaaga aagactcttc ttcgatgttg tatacgttgg agcatagggc	7740
aagaattgtg gcttgagatc tagattacgt ggaagaaagg tagtaaaagt agtagtataa	7800
gtagtaaaaa gaggtaaaaa gagaaaaccg gctacatact agagaagcac gtacacaaaa	7860
actcataggc acttcatcat acgacagttt cttgatgcat tataatagtg tattagatat	7920
tttcagaaat atgcatagaa cctcttcttg cttttacttt ttatacatag aacattggca	7980
gatttactta cactactttg tttctacgcc atttcttttg ttttcaacac ttagacaagt	8040
tgttgagaac cggactacta aaaagcaatg ttcccaactga aaatcatgta cctgcaggat	8100
aataaccccc taattctgca tcgatccagt atgttttttt ttctctactc attttttacct	8160
gaagatagag cttctaaaac aaaaaaaatc agcgattaca tgcataattgt gtgttctaga	8220
attgcggatc accagatcgc cattacaatg tatgcaggca aatattttctc agaataaaaa	8280
atagagaaaa ggaaacgaaa attctgtaag atgccttcga agagatttct cgatatgcaa	8340
ggcgtgcac aggggtgatc aaaggaactc gagagagagg gcgaaaggca atttaaatgca	8400
ttgcttctcc attgacttct agttgagcgg ataagttcgg aaatgtaagt cacagcta	8460
gacaaatcca ctttaggttt cgaggcacta ttttaggcaa aagacgagtg gggaaataac	8520
aaacgctcaa acatattagc atataccttc aaaaaatggg aatagtatat aaccttccg	8580
ttcgtaata aatcaaatct ttcactagt tctcttaaga tttcaatatt ttgctttctt	8640
gaagaaagaa tctactctcc tccccattc gcactgcaaa gctagcttgg cactggccgt	8700
cgttttacia cgtcgtgact gggaaaacc tggccttacc caacttaatc gccttgacg	8760
acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca	8820
acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggga aattgtaaac gttaatatatt tgttaaaatt	8880

ES 2 616 790 T3

cgcgtaaata ttttgtaa ttagctcatt ttttaaccaa taggcccgaat tcggcaaaat	8940
cccttataaa tcaaagaat agaccgagat aggggttgagt gttgttccag tttggaacaa	9000
gagtcacta ttaaagaacg tggactccaa cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg	9060
cgatggccca ctacgtgaac catcaccta atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa	9120
agcactaaat cggaacccta aagggaagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc	9180
gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag	9240
tgtagcggtc acgtgcgcgc taaccaccac accgcgcgcg cttaatgcgc cgctacaggg	9300
cgcgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta	9360
aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata	9420
ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca ttcccggtgc gcccttattc ccttttttgc	9480
ggcatttttc cttctgtttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga	9540
agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct	9600
tgagagtttt cgcgccgaag aacgttttcc aatgatgagc actttttaaag ttctgctatg	9660
tggcgcggtt ttatcccgta ttgacgccc gcaagaccaa ctcggtcgcc gcatacacta	9720
ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat	9780
gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaactg cggccaactt	9840
acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga	9900
tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga	9960
gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaatat taactggcga	10020
actacttagt ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgtc	10080
aggaccactt ctgcgctcgg cccttcgggc tggctggttt attgctgata aatctggagc	10140
cggtagagct gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg	10200
tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat	10260
cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag ttactcata	10320
tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct	10380
ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gacgctcaga	10440
ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg	10500
cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc	10560
acctcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct	10620
agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctgc	10680
tctgctaata ctgttaaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt	10740
ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg	10800

cacacagccc agcttgagc gaacgacctc caccgaactg agatacctac agcgtgagca	10860
ttgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag	10920
ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag	10980
tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcagggg	11040
gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg	11100
gccttttgct cacatgttct ttcctgcgtt atccccgat totgtggata accgtattac	11160
cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt	11220
gagcaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct cccccgcgc gttggccgat	11280
tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc	11340
aattaatgtg agttagctca ctcatagc accccaggct ttacacttta tgcttcggc	11400
tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacat	11460
gattacgaat ttaatacgac tcacaatagg gaattagctt gcgcgaaatt attggctttt	11520
ttttttttt aattaaaga aaacattctc tagggattac gaggtaaaga tacattttca	11580
aggcttattc gattctgtga actcagttgg aatattaagg gacaggttgt ttccttgac	11640
ccagagaagc aatatcgttg agcatgttcg acattgcgta tccttggatg aaagacgtg	11700
aaaattcaag cagttatgtt tcaactccgat gccgtacatt ccgaaactat tttcattgac	11760
atattgtaat catataactg accagtgttc gccggtgcc aacttctaag cattaatgcg	11820
tgatctaacc ccggaatac ctttgataaa atacacttta aaaagtggcg cacattctat	11880
tagtaactct tctccactca ttcctgataa ccctggaagg ttgttatoga gcaaaagcga	11940
ggaaactaca gagttgctgt tggacctgaa ctcatctta gaaggtaatt catacgcgag	12000
agatacagaa tgttcaacaa gaggaattga agccattttc caacttcaat ctatccaagg	12060
cagcgttaca tcaagtagaa tgactatgac acccgacttg attgaaaaat ggtttccagg	12120
tgatcggcca tcttgccga tcattctgac gttggtggag gttggcgcc tgactgtgag	12180
acagaagaga acttgtcaaa tttaacgctg cgatggattt tagcagaggc aatcaaattt	12240
ggtgttaaat tcaaacctgg tgcaatacat gatttcgcta ccaaacacac ttcgattgga	12300
tctttattcg cagacacaca tgattacctt agtttcaact caccaaagaa atgttccta	12360
ctaggagtga gtgataatga ggatggagcc cgagaggata aatctggcag aaatgagaga	12420
atggaagatt gtctaaaaa tataaaagag actagattga gcttgaaaga tgaaaaagaa	12480
aaagtgaagg atgcttttac tcttaaatgt ggacatgcaa ataaatttat gagattggtg	12540
tggtgggtat tggaactgct ccccatgga atacgaatgg aaaataaaga aggaaagtgg	12600
caaaattttc atacacctaa cctcggaaga tcgtcgacaa gcttgtggag aggtgacttc	12660

ES 2 616 790 T3

atgaaccaag tgtctgtcga tatacaacaa aaaggaacca ttttcatctt gatggacaac	12720
atgtgcatca aaaaccttat cgtaagagt tcttggaacc ttggatggag tgtaaaccat	12780
gatttaaac agcaaataat aaaaatcgat agcgacaaaa actgtcaatt tcaatattct	12840
ttatatattgt tgactgctta gatattttga gaaaattcag cggaaacagc gtgatgagtg	12900
agttaagttc tgctgtttta ataagtattc aactactatt gaagccgact catgaagccg	12960
gttacggaca aaaccgggca aatttcgccg gtcccggaat tttcgtttcc gcaataaaag	13020
aaccgctcat catcatagcg ccagggtagt atactataga aggtcagact aaactgagtc	13080
atctagagta atgacgcctt agtagctttt acatcttcat aagaaaagga aacttgtaga	13140
atggcctggc gatttgtttg ctttcttgtg atgaagaaat ttcgatgcga ttaaccggca	13200
aaatcagtaa aggtatttcg cggagggcgc cttcaatcat cgaatactac gtcttaatat	13260
gatgtactgt ggttcatatt ttcaagtagt gttagtaaatt ttgtatacgt tcatgtaagt	13320
gtgtatcttg agtgtctgta tgggcgcata aacgtaagcg agacttccaa atggagcaaa	13380
cgagaagaga tctttaaagt attatagaag agctgggcag gaactattat gacgtaaagc	13440
cttgaccata ataaagacga ttctttgtcc ctctatacaa acatcttgca aagataccaa	13500
atattttcaa atcctactca ataaaaaatt aatgaataaa ttagtgtgtg tgcattatat	13560
atattaaaaa ttaagaatta gactaaataa agtgtttcta aaaaaatatt aaagttgaaa	13620
tgtgcgtgtt gtgaattgtg ctctattaga ataattatga cttgtgtgcg tttcatattt	13680
taaaatagga aataaccaag aaagaaaaag taccatccag agaaaccaat tatatcaaat	13740
caaataaaac aaccagcttc ggtgtgtgtg tgtgtgtgaa gctaagagtt gatgccattt	13800
aatctaaaaa ttttaaggtg tgtgtgtgga taaaatatta gaatgacaat tccccggaat	13860
tgcgtacgct taatccttgg cagaaatcat gtccctcaggt ctaaccattt ggtcgaattc	13920
ttcagaggtc aagtaacca aagatagagc agcttctttc aaagtggtag cttccttgtg	13980
agccttcttg gcacacttgg cagccttgtc gtaaccaatg tgagggttca aagcagtgac	14040
caacatcaaa gattcgttca tgatggagga gatcttcttt tcgttagett caataccgac	14100
aacacagttc ttggtgaaag agatggaagc gtcagagatt aatctgatgg attggatcaa	14160
gttcttgatc atgactggtt taaagacatt caattcgaat tgaccgttgg aaccagcaac	14220
agagatggca gtgtgtttac ccatgacttg agcacaaacc atggtcatag cttcacattg	14280
agttgggttg accttacctg gcatgatgga agaacctggg tcgttttctg gtagagacaa	14340
ttcacctaaa ccacatcttg gaccagaacc caagtaacgg atatcgttgg caatcttcat	14400
caaagaacaa gcaacgggtg tcaaagcacc gtgagcttca accaaagcgt cgtgagcagc	14460
caaagcttcg aatttgtttg gagcgttctt gaatggtaaa ccagtgatgg aagcaatggc	14520
ttcagcaacc ttggcatcga aaccctttct ggtgttcaaa ccagtaccga cagcagtagc	14580

ES 2 616 790 T3

accttgagcc aagttgtata atctttccaa agtaccttga acacgagcaa taccgtaggt	14640
caattgttga gtgtaacogg agaattcttg acctaaagtc aatggggtag catcttgcaa	14700
gtgggttcta ccaatcttga tgatgtgttc gaattcagca gatttggctt gcaaagcatc	14760
tctcaaagtg gtcaaagctg gaatcaatct accgtgaatt tcaacaacgg cagcaacgtg	14820
catggcagtt gggaaagtgt cgttgaaga ttgagacatg ttgacatgat cgttgggtg	14880
gactggagcc ttggaacctt attcaccacc caacaattca atggctctgt tggagatgac	14940
ttcattgacg ttcattcttg tttgagtacc agaaccggtt tgccagacaa ccaatgggaa	15000
atggtcaatc aaagaaccat cgataacttc gtcagcagcc ttttggatgg cttcaccaac	15060
ctttgggtcc aaaccgtagg tcatgttgac ggtggcagca gccttcttca aaacaccgaa	15120
agctctgatt aatggttctg gcattctttc agttggacca ccaatgtcaa agttttgcaa	15180
agatctttga gtttgagcac ccagtaacg gtcagctgga acttgcaagt caccgaaggt	15240
atctctttca gctctgaatt tttgcaaagc agcagaagca gaggacattt tttgtttatg	15300
tatgtgtttt ttgtagtat agatttaagc aagaaaagaa taaaaacaaa aaattgaaaa	15360
agattgattt agaattaaaa agaaaaatat ttacgttaaga agggaaaata gtaaatgttg	15420
caagttcact aaactcctaa attatgctgc cctttatatt ccctgttaca gcagccgagc	15480
caaaggtata taggctcctt tgcattagca tgcgtaacaa accacctgtc agtttcaacc	15540
gaggtggtat ccgagagaat tgtgtgattg ctttaattaa tttcgagaa tctcacatgc	15600
cactgaagat taaaaactgg atgccagaaa aggggtgtcc aggtgtaaca tcaatagagg	15660
aagctgaaaa gtcttagaac gggtaatctt ccaccaacct gatgggttcc tagatataat	15720
ctcgaagga ataagtaggg tgataccgca gaagtgtctg aatgtattaa ggtcctcaca	15780
gtttaaatcc cgctcacact aacgtaggat tattataact caaaaaaatg gcattattct	15840
aagtaagtta aatatccgta atctttaaac actatgtagt taggtctcgc ggccgaggag	15900
gaaatgagaa atgagaggtg tgtaaataga aatagactag ctccactttt aagaattatt	15960
tatgcaatta aatacatggg tgacaaaaag agcgggaggga taccgcgtc accacaagca	16020
gaataaaagg taaacctgaa attgttttaa cataaaatga aaaatgcttg tttgcaacct	16080
tatatagaat cataaaacat tcgtgactat aaaatgaata aactaaacta ttctaagaaa	16140
atgaaataaa tgacaaaaaa acgtgttttt tggactagaa ggcttaatca aaagctctta	16200
aacgttttgc tgttcagaag atggaggatc agattcacca ccagtggaag taacgtgggt	16260
gtcaaccttt tccaaagaag ctggagcctt ttctggtggg aaagttgggt tcaaaacacc	16320
agtgtttggc tttggagggt ggtgagcatc ttcattcctta cctgggtaac acaaactcgtt	16380
gaccaagaaa gctctgacca tcaagtacat caacaagatc cattggatac ataggatgac	16440

ES 2 616 790 T3

```

accgatgatg tgaccgaaca tttggaaggc cttggagtca atcatcttac caatttcaat 16500
ggtacagtta acgaaaccga cgtttgggaa gatgaaagca aaccaaccac aagcaaattt 16560
caatggagct ctggtgaaga aaccagccaa gaaagaaacc atggccaaac agtaacacca 16620
agcagccaaa cccagatga aaatggccat gaaagtggaa acgaaaccca agtattcaga 16680
agaattggca ccgacgaaaa tgtatggtct ggaaccata gcaccacggg caatgttgat 16740
caaagccaaa ccggagaaaag ctggtggacc aacaaacatg aacatacctg gtctgtcttg 16800
aggcttggcc aaaccaacgg tgaagaatct caaaacgttg acagcaaaca acaacaagta 16860
aaccagaaa cccaaacctt ggaataagat accgaagata accatgttct tcaattggtg 16920
agctggttga gtggagtga cagcaccagc aatgacacca cagatcattg gtgggaaaat 16980
tggtaaagtc caagctggag aagcagtttc aatggtgtaa acgtggttgt tgaaaatggt 17040
gaagaaagcc atgacacagt agatgaaaga gacagcaacg tagatgtagt ataagattct 17100
gataaccag accatccatt caccagtgtc tgggtaagcg tagatggcca acatgtcaat 17160
gaaagtggag atggatagca aacaggtagc aatgaataat tttccaagt ggtggttcca 17220
ggagtcttg atggttagat ggtatttgat gaatctgaac aacatacaag aaccaaaca 17280
agagaataag aagatttgta agatgtagac aatcttacca atggtgttca aaccgtagaa 17340
tctgaatggg aaagaaccaa tgatcaaacc gacaccacca gtggccatgg tacaagcaaa 17400
ccaggaccag gtgaaatgct tcaatctttg agacaatgga acgtgtggag ccttgacgtt 17460
ccagtccaac aattcatggt aacgttgctt caagatttcc ttcaattcac ccattttggt 17520
ttagtgtttg tgtgtgata agcagttgct tggtttttta tgaaaaatag ctagaaggaa 17580
taagggatta caagagagat gttacaagaa agaagtaaaa taaatttgat taatattgcc 17640
attatcaaaa gctatttata tggtgaaatc gtggagatca tgtgtgccag aaaaggccac 17700
agtttccggg gagaggcata ccttgagggtg gctaggaatc acggagacct cttgacttgc 17760
agggtaggct agctagaatt aagtgagggtg acaagggttc catacagttt tgaccttgag 17820
acgttgctac ttacgatttg cagtatgcaa gtctcatgct gcaaacaaaa gaggaccgct 17880
caggtaatcg ctcaattagt ggacgttatc agggcgggga gaggcgaaag tggtttttg 17940
tggtgtaagt aaagggtcgtc caaatatgca ggtgtttggg tgctatccta gtggaagctc 18000
ggatcagtag ataaccgcgc tagaagcggg atttttcttt tttttcttc cttcttttc 18060
gtcattattt caaacgcttt tgcgtcaagt aatgaatatc tggcggttcc gcggggcgcg 18120
ccgggcc 18127

```

<210> 3
 <211> 12279
 <212> ADN
 <213> Nucleótido artificial

<220>
 <223> Plásmido pSUC091

<400> 3

ES 2 616 790 T3

aagcttgcat gcctgcaggt cgacggcgcg ccgggcccgt ttaaaccggcc ggccaagggtg	60
agacgcgcat aaccgctaga gtactttgaa gaggaaacag caatagggtt gctaccagta	120
taaatagaca ggtacatata acactggaaa tggttgtctg tttgagtacg ctttcaattc	180
at ttgggtgt gcactttatt atgttacaat atggaaggga actttacact tctcctatgc	240
acatatatta attaaagtcc aatgctagta gagaaggggg gtaacacccc tccgcgctct	300
tttccgattt ttttctaaac cgtggaatat ttcggatatc cttttgttgt ttccgggtgt	360
acagggtaat aactgatata attaaattga agctctaatt tgtgagtta gtatacatgc	420
atttacttat aatacagttt tttagttttg ctggccgcat cttctcaaat atgcttccca	480
gcctgctttt ctgtaacgtt caccctctac cttagcatcc cttccctttg caaatagtcc	540
tcttccaaca ataataatgt cagatcctgt agagaccaca tcatccacgg ttctatactg	600
ttgacccaat gcgtctccct tgtcatctaa acccacaccg ggtgtcataa tcaaccaatc	660
gtaaccttca tctcttccac ccatgtctct ttgagcaata aagccgataa caaaatcttt	720
gtcgtctctc gcaatgtcaa cagtaccctt agtatattct ccagtagata gggagccctt	780
gcatgacaat tctgctaaca tcaaaaggcc tctaggttcc tttgttactt cttctgcgc	840
ctgcttcaaa ccgctaacaa tacctgggcc caccacaccg tgtgcattcg taatgtctgc	900
ccattctgct attctgtata caccgcaga gtactgcaat ttgactgtat taccaatgtc	960
agcaaat ttt ctgtcttcga agagtaaaaa attgtacttg gcgataatg cctttagcgg	1020
cttaactgtg ccctccatgg aaaaatcagt caagatatcc acatgtgttt ttagtaaaca	1080
aattttggga cctaattgctt caactaactc cagtaattcc ttggtggtac gaacatccaa	1140
tgaagcacac aagtttgttt gcttttcgtg catgatatta aatagcttgg cagcaacagg	1200
actaggatga gtagcagcac gttccttata tgtagctttc gacatgattt atcttcgttt	1260
cctgcagggt tttgttctgt gcagttgggt taagaatact gggcaatttc atgtttcttc	1320
aacactacat atgcgtatat ataccaatct aagtctgtgc tccttccttc gttcttcctt	1380
ctgttcggag attaccgaat caaaaaaatt tcaaagaaac cgaaatcaaa aaaaagaata	1440
aaaaaaaaat gatgaattga attgaaaagc tgtggtatgg acgcgtgcgg ccgcggatcc	1500
acgctgacat ggtttcttta ggtttgatga ggcgctcttt tgttgatagc agctttttcc	1560
at tttttttt tttttgtttc gagtaacgta tggtttagta tctgtcttct ccttctctta	1620
caaaaaaacc ctttgtaaaa tagtgccgag ttggaggaca tcaatctgat gggcaagaaa	1680
acaccaaccc cccctatatg aaaagaaaat gataagcaga tagataaaaa tacttaatta	1740

actaatatcat aaaaataaga ggtatataaa aatattatat ggaagcaata attattactc	1800
cttactttctt ttgggatgga ggcaaaagttt cttcttccaa gacaaccaac aaatcagaag	1860
catcgacgga ttcaccatct ttgatgaaaa cgtccttgac ttgaccgtca gctggagaag	1920
agacaacccat ttccatcttc atagcggaca aaacagcaat agattcaccc ttcttgacca	1980
aggaaccctt gtggaccttg acttcgatga taacaccagc cattggagca ccgatttggt	2040
gggtgtcgtg aacatcagcc tttggcttgg caacggattg gatgttttga gatttgcag	2100
caactctgat ctttctcaat tcaccgttta attcgaagta gacttctctt tgaccggttt	2160
tcttgttcaa gtcaccaaca gcttgtaatt tgatgatcaa agtcttacct tggtcaatgg	2220
tgacttcaat ttcttcatct gggtcagctg gggccaaaaa gttcttggtt ggtaagacgg	2280
acaaatcacc gtaggtttct ctgatctttt ggaaatcttc gtaaactctt gggtagatgt	2340
tgtaagaagc aacatcacat tcgtcaatat caccgaatct gttttgcaaa tcttctctga	2400
tcttttccaa gtcaaatggt tccaattcca aacctggctc acaagtcaac tttcttctct	2460
tgtttcttaa gacgtcagaa cgtaatgggt ctgggaacc accgtatggt tgaccgatca	2520
aaccttcaaa gaagtccatg acggaatctg ggaagtctag agagttagcc aatcttctga	2580
tgatcatcaga ggtaatttg ttgctgacca tgaattgggc caagtcacca acaaccttgg	2640
aggttggagt aaccttgaca atgtcaccca acaagtagtt ggcttctctg taagctctct	2700
tggtttcagc ccattgttca cctaaaccca attgttgagc ttggaacaat aagtttgtca	2760
attgaccacc tggaaatttcg tgttggtaga ctctgggtc tggaccttc aagtcagctt	2820
cgaacaaga gtacaataat ctcatctcag ccagtaagc atctaattct ctaacgtgtt	2880
cgacgttgat accggtgtcg atgttacctt ccaaggaggc caacaaagcg ttaatggatg	2940
gttgagaggt caaaccagac atggagttaga tggcaacatc gacgacatca gcaccagcca	3000
aagcacaagc agtcatggaa gcaacggcag taccggcaga atcgtgagag tggacgtgaa	3060
ttggcaaatc tgggtatctg gttctcaaag aaccgatcaa caacttagca gcagctggct	3120
tcatggtacc agccatgtcc ttgataccta agatgtgggt acccatttgg acgatctttt	3180
caacaacttc caagtagtag tccaagtgtt acttcttacc aggttgcaac atgtcacogg	3240
agtaacaaac ggtagcttca acaacaccac cagccttctt gacagcgta acaccgacct	3300
ttaattgttc caagtcattc aaagcatcga aaactctgaa gatgtcaaca ccgttgtcct	3360
tagcttgctt gacgaagtgg tcaatggcat tgtctggtaa agaagagtaa gcaacaccgt	3420
tagcacctct tagcaacatt tggaatggaa tgtttggaac caaagatctc aactttctta	3480
gtctttccca tgggtcctcg tgcaagaatc tcatggcgac atogaagggt gcaccacccc	3540
aacattccaa ggcgaaagca cggccaagg catgagcggg ggttgagcgg atagtagcca	3600
aatcgtgggt totaactctg gtagccaata aagattgggt agcatctctc caggtggtgt	3660

ES 2 616 790 T3

ccatcaacaa agtaccgttg aattgtctga cttgcttggc aaattcagat ggaccctttt	3720
ccaacaaaaac ttgtctccaa ccagatggtg gagcagattt agtaacgttg atgacgttac	3780
cttgagcgtc gtgcaagtgt ggaacggaag ggttagattt caacttttgt aaaccaattt	3840
ggacccttgat agaagaaccg ttgacagcca aatcagccaa gtagtgcaac aatttttgag	3900
ctctgttttg agaggaaacc atttgaaca attgtggagt gtcgtcaatg aaagtgggcc	3960
agtaagtacc ttcaatgaaa acaggggttg tcaacaaagt caacaaaaat ggaatgttg	4020
tcttaacacc tctgattctg aattcgatca aagctctgat catctttctt ctgacaattt	4080
cgtaagtga accggaacag gaacatttga ccaacatgga gtcgtagtga ggagagatag	4140
tagcaccagc gtaagcgtta ccaccatcca atctgacacc gttaccacca gcagatctgt	4200
aaacttccaa acgaccgtg tctggttga agttcttga tgggtcctcg gtagtgatac	4260
gacattggat ggagaaacct ctagtgggta tcttgtcttg caacaaacct aattgagtca	4320
aagtggcacc agcagcaatt tggatttgag cagagacaat gtcaatacca gtgatttctt	4380
cagtgatagt gtgttcgact tgaattcttg ggttaatttc gatgaaataa tgtctgtttt	4440
ggttgtcaac caagaattca gcagtaccag cgtttctgta accacaaacc ttagctaatt	4500
tgacagcgtc agtcaagata gcacacgga cttctcttgg taaagtcttg gctggagcaa	4560
cttcaacaac cttttgtgta cgacgttgaa cagaacagtc tctttcgaac aaatggacaa	4620
cgttaccgtg gttgtcagcc aacaattgaa cttcaatgtg ctttggcttg tccaagaatc	4680
tttcgacgaa acaggtaccg ttaccgaaag cagttctggc ttcagaggta gctctttgga	4740
aagcatcagc aacgtcatca cttctcttaa caactctcat accacgacca ccaccaccga	4800
aagcggcctt gatgataact gggtaaccgt attcattgac gaaatccaag gcttcttgaa	4860
cagtttcaat tggacctgga gtacctgga cagttgggac attggcacga gcagccaaat	4920
gacgagcaga gactttgtca ccgacagagt caatgacttc agctgggtga ccgatccaag	4980
tgataaccagc cttgacaacc ttgtcagcaa attcagagtt ttcggacaag aaaccgtaac	5040
ctgggtggat gaaatcgacc ttgtgcttct tggcaatttc aataatttcg tccatggcca	5100
agtaggcacc aactggagtg tattgacctt cttaccaat aacgtaagcc tcatcagcct	5160
tcaatctgtg catggacaaa cgatcttcat gagagtagat agcaatggtt ctcatggata	5220
gttcatgagc agatctgaaa attctgattg ggatttcacc tctgttagca accaagattt	5280
tgttcttttc acccaacaaa gagaagttgt ctctcaaac ggccaatttc ttggaagagg	5340
acatgtttag ttaattatag ttcgttgacc gtatattcta aaaacaagta ctccttaaaa	5400
aaaaaccttg aagggaataa acaagtagaa tagatagaga gaaaaataga aaatgcaaga	5460
gaatttatat attagaaaga gagaaagaaa aatggaaaaa aaaaaatagg aaaagccaga	5520

ES 2 616 790 T3

aatagcacta gaaggagcga caccagaaaa gaaggtgatg gaaccaatth agctatatat	5580
agttaaactac cggctcgatc atctctgcct ccagcatagt cgaagaagaa tttttttttt	5640
cttgaggctt ctgtcagcaa ctcgtattht ttctttcttt tttggtgagc ctaaaaagtt	5700
cccacgttct cttgtacgac gccgtcacaa acaaccttat gggtaatthg tcgcggtctg	5760
ggtgtataaa tgtgtgggtg caacatgaat gtacggaggt agtttgctga ttggcggtct	5820
atagatacct tggttatggc gccctcacag ccggcagggg aagcgctac gcttgacatc	5880
tactatatgt aagtatacgg ccccatatat atatatatat atatacatta aacattatth	5940
gtaagggccc ggccggccaa gctttagagc tcatggcgcg cctaggtaaa aaaaataagt	6000
gtatacaaat tttaaagtga ctcttaggtt ttaaaacgaa aattcttatt cttgagtaac	6060
tccttctctg aggtcaggtt gcttctcag gtatagcatg aggtcgcctt tattgaccac	6120
acctctaccg gcatgccgag caaatgcctg caaatcgtc cccatttcac ccaattgtag	6180
atatgctaac tccagcaatg agttgatgaa tctcgggtg tattttatgt cctcagagga	6240
caacacctgt tgtaatcgtt ctccacacg gatccacagc ctagccttca gttgggctct	6300
atcttcatcg tcattcattg catctactag ccccttacct gagcttcaag acgttatatc	6360
gcttttatgt atcatgatct tatcttgaga tatgaataca taaatatatt tactcaagt	6420
tatacgtgca tgcttttttt acggtttaa catttaaatg ggccgctcta gaggatcccc	6480
gggtaccgag ctccggccca ggcctactag ttccggtaat ttgaaaacaa acccggtctc	6540
gaagcggaga tccggcgata attaccgag aaataaaccc atacacgaga cgtagaacca	6600
gccgcacatg gccggagaaa ctctgcgag aatttcgtaa actcgcgcgc attgcatctg	6660
tatttcttaa tgccgcactt ccaggcctcg agacctctga catgcttttg acaggaatag	6720
acattttcag aatgttatcc atatgccttt cgggtttttt tcttctcttt tccatcatga	6780
aaaatctctc gagaccgttt atccattgct tttttgttgt ctttttccct cgttcacaga	6840
aagtctgaag aagctatagt agaactatga gctttttttg tttctgtttt cttttttttt	6900
ttttttacct ctgtggaaat tgttactctc acactcttta gttcgtttgt ttgttttgtt	6960
tattccaatt atgaccggtg acgaaaagtg gtccgatggg ggtaccgctt atgctccct	7020
ccattagttt cgattatata aaaaggccaa atattgtatt attttcaaat gtccatcat	7080
tatcgtctaa catctaattt ctcttaaatt ttttctcttt ctttctata acaccaatag	7140
tgaaaatctt ttttctctct atatctacaa aaactttttt tttctatcaa cctcgttgat	7200
aaattttttc ttttaacaatc gtttaataatt aattaattgg aaaataacca tttttctct	7260
cttttataca cacattcaaa agaaagaaaa aaaatatacc ccagctagtt aaagaaaatc	7320
attgaaaaga ataagaagat aagaaagatt taattatcaa acaatatcaa tatgcctcaa	7380
tcctgggaag aactggcgc tgataagcgc gccgcctcg caaaaacat cctgatgaa	7440

ES 2 616 790 T3

tggaagtcc agacgctgcc tgcggaagac agcgttattg atttcccaa gaaatcgggg	7500
atcctttcag aggcggaact gaagatcaca gaggcctccg ctgcagatct tgtgtccaag	7560
ctggcggccg gagagttgac ctcggtggaa gttacgctag cattctgtaa acgggcagca	7620
atcgcccagc agttaacaaa ctgcgccac gagttcttcc ctgacgccgc tctcgcgcag	7680
gcaagggaac tcgatgaata ctacgcaaag cacaagagac ccgttggtcc actccatggc	7740
ctccccatct ctctcaaaga ccagcttcga gtcaagggtc acgaaacatc aatgggctac	7800
atctcatggc taaacaagta cgacgaagg gactcggttc tgacaaccat gctccgcaaa	7860
gccgtgccg tcttctacgt caagacctct gtccgcgaga cctgatggt ctgcgagaca	7920
gtcaacaaca tcatcgggcg caccgtcaac ccacgcaaca agaactggtc gtgcggcggc	7980
agttctggtg gtgaggggtc gatcgttggg attcgtggtg gcgtcatcgg tgtaggaacg	8040
gatatcgggtg gctcgattcg agtgccggcc gcgttcaact tctgtacgg tctaaggccg	8100
agtcattggc ggctgccgta tgcaaagatg gcgaacagca tggaggggtca ggagacgggtg	8160
cacagcgttg tcggggccgat tacgcactct gttgaggacc tccgcctctt caccaaatcc	8220
gtcctcggtc aggagccatg gaaatacgac tccaaggtca tcccatgcc ctggcgccag	8280
tccgagtcgg acattattgc ctccaagatc aagaacggcg ggctcaatat cggctactac	8340
aacttcgacg gcaatgtcct tccacaccct cctatcctgc gcggcgtgga aaccaccgtc	8400
gccgcactcg ccaaagccgg tcacaccgtg accccgtgga cgccatacaa gcacgatttc	8460
ggccacgatc tcatctccca tatctacgcg gctgacggca gcgccgacgt aatgcgcgat	8520
atcagtgcat ccggcgagcc ggcgattcca aatatcaaag acctactgaa cccgaacatc	8580
aaagctgtta acatgaacga gctctgggac acgcactctc agaagtggaa ttaccagatg	8640
gagtaccttg agaaatggcg ggaggtgaa gaaaaggccg ggaaggaaact ggacgccatc	8700
atcgcgccga ttacgcctac cgctcgggta cggcatgacc agttccggta ctatgggtat	8760
gcctctgtga tcaacctgct ggatttcacg agcgtggttg ttccggttac ctttgcggat	8820
aagaacatcg ataagaagaa tgagagtttc aaggcgggta gtgagcttga tgccctcgtg	8880
caggaagagt atgatccgga ggcgtaccat ggggcaccgg ttgcagtgca ggttatcgga	8940
cggagactca gtgaagagag gacgttggcg attgcagagg aagtggggaa gttgctggga	9000
aatgtggtga ctccataggt cgagaattta tacttagata agtatgtact tacaggtata	9060
tttctatgag atactgatgt atacatgcat gataatattt aaacggttat tagtgccgat	9120
tgtcttgtgc gataatgacg ttcttatcaa agcaatacac ttaccaccta ttacatgggc	9180
caagaaaata ttttcgaact tgtttagaat attagcacag agtatatgat gatatccgtt	9240
agattatgca tgattcattc ctacaacttt ttcgtagcat aaggattaat tacttggtatg	9300

ES 2 616 790 T3

ccaataaaaa aaaaaaacat cgagaaaatt tcagcatgct cagaaacaat tgcagtgtat	9360
caaagtaaaa aaaagatttt cgctacatgt tccttttgaa gaaagaaaat catggaacat	9420
tagatttaca aaaatttaac caccgctgat taacgattag accgttaagc gcacaacagg	9480
ttattagtac agagaaagca ttctgtggtg ttgccccgga ctttcttttg cgacataggt	9540
aatcgaata ccatcatact atcttttcca atgactccct aaagaaagac tcttcttcga	9600
tgttgtatac gttggagcat agggcaagaa ttgtggcttg agatgaattc actggccgtc	9660
gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttaccc aacttaatcg cttgcagca	9720
catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa	9780
cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg	9840
tgcggtatatt cacaccgcat atggtgcact ctacgtacaa tctgctctga tgccgcatag	9900
ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc	9960
ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt	10020
tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg tgatacgccct atttttatag	10080
gttaatgtca tgataataat ggtttcttag acgtcagggt gcacttttgc gggaaatgtg	10140
cgcggaaccc ctatttggtt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga	10200
caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat	10260
ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca	10320
gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc	10380
gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca	10440
atgatgagca cttttaaggt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg	10500
caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca	10560
gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata	10620
accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcgaggg accgaaggag	10680
ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg	10740
gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca	10800
acaacgttgc gcaaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta	10860
atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc cttccggct	10920
ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca	10980
gcactggggc cagatggtaa gccctccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag	11040
gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat	11100
tggtaaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt	11160
taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa	11220

ES 2 616 790 T3

cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 11280
 gatccctttt ttctgcgctg aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg 11340
 gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 11400
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 11460
 aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc 11520
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 11580
 cagcggtcgg gctgaacggg ggggtcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 11640
 accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 11700
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt 11760
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 11820
 cgtcgatttt tgtgatgtc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 11880
 gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg cttttgtctc acatgttctt tcctgcgtta 11940
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 12000
 agccgaacga ccgagcgag cgagtcagt agcgagggaag cgggaagagcg cccaatacgc 12060
 aaaccgcctc tcccgcgcgc ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc 12120
 gactggaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca 12180
 ccccaggett tacactttat gcttcggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa 12240
 caatttcaca caggaaacag ctatgaccat gattacgcc 12279

<210> 4
 <211> 14722
 <212> ADN
 <213> Nucleótido artificial

<220>
 <223> Plásmido pSUC111

<400> 4
 ggccccccct cgaggtcgac ggtatcgata agcttgatat cgaattcctg cagcccgggg 60
 gatcccttcc cttttacagt gcttcggaaa agcacagcgt tgtccaaggg aacaattttt 120
 cttcaagtta atgcataaga aatatctttt ttatgttta gctaagtaaa agcagcttgg 180
 agtaaaaaaa aaaatgagta aatttctoga tggattagtt tctcacagg aacataacaa 240
 aaaccaagaa aagcccgctt ctgaaaacta cagttgactt gtatgctaaa gggccagact 300
 aatgggagga gaaaaagaaa cgaatgtata tgctcattta cactctatat caccatatgg 360
 aggataagtt gggctgagct tctgatccaa ttattctat ccattagttg ctgatatgtc 420
 ccaccagcca acacttgata gtatctactc gccattcact tccagcagcg ccagtagggg 480

ES 2 616 790 T3

tggtgagctt agtaaaatg tgcgcaccac aagcctacat gactccacgt cacatgaaac	540
cacacogtgg ggccttggtg cgctaggaat aggatattgcg acgaagacgc ttctgcttag	600
taaccacacc acattttcag ggggtcgatc tgcttgcttc ctttactgtc acgagcggcc	660
cataatcgcg cttttttttt aaaaggcgcg agacagcaaa caggaagctc gggtttcaac	720
cttcggagtg gtgcgagatc tggagactgg atctttacaa tacagtaagg caagccacca	780
tctgcttctt aggtgcatgc gacggtatcc acgtgcagaa caacatagtc tgaagaagg	840
ggggaggagc atgttcattc tctgtagcag taagagcttg gtgataatga ccaaaactgg	900
agtctcgaaa tcatataaat agacaatata ttttcacaca atgagatttg tagtacagtt	960
ctattctctc tcttgcataa ataagaaatt catcaagaac ttggtttgat atttcaccaa	1020
cacacacaaa aaacagtact tcaactaaatt tacacacaaa acaaaatggt ttccgtcaag	1080
gcttctgctg ctgaaaagaa ggaattcttg caatctcaaa tcgatgaaat tgaaaaatgg	1140
tggtctgaac caagatggaa ggacaccaag agaattctact ctgcttacga aattgccaa	1200
cgctgtggtt ctgtcaagcc aaacactttc ccatctaccg tcatgtctca aaaattgttc	1260
aagatcttag gtgaacacgc taagaacggt actgtttcca agactttcgg tgctttggac	1320
cctgttcaag tcaactcaaat gtccaagtac ttggacacca tctacgtttc cggttggcaa	1380
tgttctctca ctgcttcac ttctaacgaa ccagggtccag atttggtga ctacccaatg	1440
gacacogttc caaacaaggt tgaacatttg ttcaaggctc aacaattcca cgacagaaag	1500
caatgggaaa gaattctgtg tggtagcatt gaagaattctg aaatcattga ctacttgact	1560
ccaattgttg ctgatggtga tgctggtcac ggtggtttga ctgctgtctt caagttgacc	1620
aagatgttca tcgaaaagg tgctgctggt attcacattg aagatcaaac ctctaccaac	1680
aagaaatgtg gtcacatggc tggtagatgt gtcattccag ttcaagaaca catcaacaga	1740
ttaatcacct gtagaatggc tgctgatgtc ttgggttctg acttgatctt agtcgccaga	1800
actgactctg aagctgctac tttgttgtcc tccactgctg actctcgtga ccattatttc	1860
atcttaggtg cttccaaccc agctgtcaag ggtaagcctt tgaatgactt gttgaacaag	1920
gccatcttgg atggtgctac catcgatgac ttgcaacca ttgaaaagga atggttagcc	1980
aaggctgatg tcaaatatt ccacgaagtt ttogctgatg ctgccaaagg tgctggttaag	2040
gaccaatctg tcaattgacca attcaactcc aaggtttaac cattgtctga aacctccatc	2100
tacgaaatgc aagctttggc caaggaattg ttgggtactg aattgttctt cgactgggac	2160
ttgccaagag gtagagaagg tctatacaga taccaagggt gtactcaatg ttctgttatg	2220
agagccagag cctttgctcc atacgctgat ctatgttggg tggaatccaa ctaccagac	2280
tacgaacaag ccaaggaatt tgctgaaggt gttaccgcca agttcccagg taaatggatg	2340
gcttacaact tgtctccatc tttcaactgg accaaggcca tgtctgttga cgaacaagaa	2400

ES 2 616 790 T3

actttcatcc aaagattagg tgacttgggt tacatctggc aattcatcac tttggctggt	2460
ttgcacacct ctggtttggc cattgaacaa ttctccaaga actttgcaa attgggtatg	2520
aaggcttacg ctcaagatat ccaaaagaag gaattggaca acggtattga catggttaag	2580
caccaaaaat ggtccggtgc tgaatacatc gatggtttgt tgagattggc tcaagggtgt	2640
ttggctgcta ccgctgccat gggcaagggt gtcactgaag atcaattcaa gtaatgccc	2700
ggcataaagc aatcttgatg aggataatga tttttttttg aatatacata aatactaccg	2760
tttttctgct agattttgtg aagacgtaaa taagtacata ttacttttta agccaagaca	2820
agattaagca ttaactttac ctttttctct tctaagtttc aatactagtt atcactgttt	2880
aaaagttatg gcgagaacgt cggcgggttaa aatatattac cctgaacgtg gtgaattgaa	2940
gttctaggat ggtttaaaga tttttccttt ttgggaaata agtaacaat atattgctgc	3000
ctttgcaaaa cgcacatacc cacaatatgt gactattggc aaagaacgca ttatcctttg	3060
aagaggtgga tactgatact aagagagtct ctattccggc tccactttta gtccagagat	3120
tacttgtctt cttacgtatc agaacaagaa agcattttcca aagtaattgc atttgccctt	3180
gagcagtata tatatactaa gaaggcgcgc cctattttcg aggacctgt caccttgagc	3240
ccaagagagc caagatttaa attttcctat gacttgatgc aaattcccaa agctaataac	3300
atgcaagaca cgtacggtca agaagacata tttgacctct taacaggttc agacgcgact	3360
gcctcatcag taagaccogt tgaaaagaac ttacctgaaa aaaacgaata tatactagcg	3420
ttgaatgta gcgtcaacaa caagaagttt aatgacgcgg aggccaaaggc aaaaagattc	3480
cttgattacg taagggagtt agaatacttt tgaataaaaa acacgctttt tcagttcgag	3540
tttatcatta tcaatactgc catttcaaag aatacgtaaa taattaatag tagtgatttt	3600
cctaacttta tttagtcaaa aaattagcct ttttaattctg ctgtaaccog tacatgcca	3660
aaataggggg cgggttacac agaatatata acatcgtagg tgtctgggtg aacagtttat	3720
tcctggcatc cactaaatat aatggagccc gctttttaag ctggcatcca gaaaaaaaa	3780
gaatcccagc accaaaatat tgttttcttc accaaccatc agttcatagg tccattctct	3840
tagcgcaact acagagaaca ggggcacaaa caggcaaaaa acgggcacaa cctcaatgga	3900
gtgatgcaac ctgcctggag taaatgatga cacaaggcaa ttgaccacg catgtatcta	3960
tctcattttc ttacaccttc tattaccttc tgctctctct gatttgaaa aagctgaaa	4020
aaaaggttga aaccagttcc ctgaaattat tcccctactt gactaataag tatataaaga	4080
cggtaggtat tgattgtaat tctgtaaate tttttcttaa acttcttaaa ttctactttt	4140
atagttagtc ttttttttag ttttaaaaca ccaagaactt agtttcgaat aaacacacat	4200
aaacaaacaa aatggtcaag gtttctttgg acaatgtcaa attgttagtc gatgttgaca	4260

aggaaccttt cttcaagcct tcttccacca ccgttggtga catcttgacc aaggatgctt	4320
tggaattcat tgtcttggtg cacagaactt tcaacaacaa gagaaagcaa ttgttgaaa	4380
acagacaagt tgttcaaaag aaattggact ctggttctta ccatttggac ttcttgccag	4440
aaactgctaa catcagaaac gacccaacct ggcaagggtcc aattttggct ccaggtttga	4500
tcaacagatc cactgaaatc actggtcctc cattgagaaa catgttgatc aatgctttga	4560
atgctccagt taacacctac atgactgact tcgaagattc tgcctctcca acctggaaca	4620
acatggttta cgggtcaagtc aacttatacg atgctatcag aaaccaaatt gacttcgaca	4680
ctccaagaaa atcttacaaa ttgaacggta acgttgccaa cttgccaacc attattgtca	4740
gaccaagagg ttggccatcg gttgaaaagc atttatacgt tgacgacgaa ccaatttctg	4800
cctccatttt cgatttcggt ctatatctct accataacgc taaggaattg atcaagttgg	4860
gtaagggtcc atacttctac ttgccaaaga tggaacacca cttggaagct aagttgtgga	4920
acgatgtttt ctgtgttgct caagactaca ttggtattcc aagaggtacc atcagagcta	4980
ctgttttgat tgaaacttta ccagctgctt tccaaatgga agaaatcatc taccaattga	5040
gacaacactc ctctggtttg aactgtggta gatgggacta catcttttcc accatcaaga	5100
gattgagaaa cgaccctaac cacattttgc caaacagaaa ccaagtcacc atgacttctc	5160
cattcatgga cgcttacgtc aagagattga tcaacacctg tcaccgtcgt ggtgtccacg	5220
ctatgggtgg tatggctgct caaattccaa tcaaggatga cccagctgcc aacgaaaagg	5280
ccatgaccaa ggtcagaaac gacaagatca gagaattaac caacggtcac gatggttcct	5340
gggttgctca cccagctttg gctccaatct gtaacgaagt ctttatcaac atgggtactc	5400
caaaccaaat ctacttcatt ccagaaaacg ttgtcactgc tgctaacttg ttggaaacca	5460
agattccaaa cgggtgaaatc accactgaag gtattgtcca aaacttggat atcggtttgc	5520
aatacatgga agcttggtta cgtggttctg gttgtgttcc aatcaacaac ttgatggaag	5580
atgccgtac tgctgaagtt tccggttgc aattgtacca atgggttaag cacgggtgca	5640
ctttgaaaga caccggtgaa aaggctactc cagaattgac tgaaaagatc ttaaaggaaac	5700
aagttgaaag attatccaaa gcctctccat taggtgacaa gaacaagttc gctctagccg	5760
ccaaatactt cttgccagaa atcagagggtg aaaagttctc tgaatttttg accactttgt	5820
tgtacgatga aattgtctcc accaaggcta ctccaacga tttgtaatgc ccgggcgtga	5880
atttacttta aatcttgcac ttaaataaat tttcttttta tagctttatg acttagtttc	5940
aatttatata ctattttaat gacattttcg attcattgat tgaaagcttt gtgttttttc	6000
ttgatgcgct attgcattgt tcttgtcttt ttccgccacat gtaatatctg tagtagatac	6060
ctgatacatt gtggatgctg agtgaaattt tagttaataa tggaggcgct ctttaataatt	6120
ttggggatat tggctttttt ttttaaagtt tacaatatgaa ttttttccgc caggataacg	6180

ES 2 616 790 T3

attctgaagt tactcttagc gttcctatcg gtacagccat caaatcatgc ctataaatca	6240
tgcctatatatt tgcgtgcagt cagtatcatc tacatgaaaa aaactcccgc aatttcttat	6300
agaatacgtt gaaaattaaa tgtacgcgcc aagataagat aacatatatc tagatgcagt	6360
aatatacaca gattccggcc gccgcggcc cagcgtact agttggccgg ccgtttaaac	6420
ggccaaggag gccgcggccg ccgtatatgt catgctcgtg acaaagagcg taagatggcg	6480
aacataactt cgtatagcat acattatacg aagttatcgg gtaatttgaa aacaaacccg	6540
gtctcgaagc ggagatccgg cgataattac cgcagaaata aaccatatac cgagacgtag	6600
aaccagccgc acatggccgg agaaactcct gcgagaattt cgtaaactcg cgcgcattgc	6660
atctgtattt cctaatacgg cacttccagg cctcgagacc tctgacatgc ttttgacagg	6720
aatagacatt ttcagaatgt tatccatatg cctttcgggt ttttttcctt ccttttccat	6780
catgaaaaat ctctcgagac cgtttatcca ttgctttttt gttgtctttt tccctcgttc	6840
acagaaagtc tgaagaagct atagtagaac tatgagcttt ttttgtttct gttttccttt	6900
tttttttttt tacctctgtg gaaattgtta ctctcacact ctttagttcg tttgtttgtt	6960
ttgtttattc caattatgac cggtagcgaa acgtggcgta tggtaggtac cgcttatgct	7020
cccctccatt agtttcgatt atataaaaag gccaaatatt gtattatttt caaatgtcct	7080
atcattatcg tctaacatct aatttctctt aaattttttc tctttctttc ctataacacc	7140
aatagtgaat atcttttttt ctctatatc tacaaaaact ttttttttct atcaacctcg	7200
ttgataaatt ttttcttta caatcgtaa taattaatta attggaaaat aaccattttt	7260
tctctctttt atacacacat tcaaaagaaa gaaaaaaat ataccccagc tagttaaaga	7320
aatcattga aaagaataag aagataagaa agatttaatt atcaaacaat atcaatatgc	7380
ctcaatcctg ggaagaactg gccgctgata agcgcgcccg cctcgcaaaa accatccctg	7440
atgaatggaa agtccagacg ctgcctgcgg aagacagcgt tattgatttc ccaaagaaat	7500
cggggatcct ttcagaggcc gaactgaaga tcacagaggc ctccgctgca gatcttgtgt	7560
ccaagctggc ggccggagag ttgacctcgg tggaagttaac gctagcatte tgtaaaccgg	7620
cagcaatcgc ccagcagtta acaaactgcg ccacagagtt ctccctgac gccgctctcg	7680
cgcaggcaag ggaactcgat gaatactacg caaagcaca gagaccggt ggtccactcc	7740
atggcctccc catctctctc aaagaccagc ttcgagtcaa gggctacgaa acatcaatgg	7800
gctacatctc atggctaaac aagtacgacg aaggggactc ggttctgaca accatgctcc	7860
gcaaagccgg tgccgtcttc tacgtcaaga cctctgtccc gcagaccctg atggtctgcg	7920
agacagtcaa caacatcatc gggcgcaccg tcaaccacg caacaagaac tggtcgtgcg	7980
ggggcagttc tggtaggtgag ggtgcgatcg ttgggattcg tggtaggcgc atcgggtgtag	8040

ES 2 616 790 T3

gaacggatat cggtaggtcg attcaggtgc cggccgcgtt caacttcctg tacggtctaa	8100
ggccgagtc tgggcggctg ccgtatgcaa agatggcgaa cagcatggag ggtcaggaga	8160
cggtagcacag cgttgctggg ccgattacgc actctgttga ggacctccgc ctcttcacca	8220
aatccgtcct cggtcaggag ccatggaaat acgactccaa ggtcatcccc atgccctggc	8280
gccagtccga gtcggacatt attgcctcca agatcaagaa cggcgggctc aatatcggct	8340
actacaactt cgacggcaat gtccttcacc accctcctat cctgcgcggc gtggaaacca	8400
ccgtcgcgcg actcgcctaaa gccggtcaca ccgtgacccc gtggacgcca tacaagcacg	8460
atttcggcca cgtatctcat tcccatatct acgcggctga cggcagcgcc gacgtaatgc	8520
gcgatatcag tgcacccggc gagccggcga tcgcatttat caagcttacc gataccgtcg	8580
acctcgagtc atgtaattag ttatgtcacg cttacattca cgcctccccc ccacatccgc	8640
tctaaccgaa aaggaggag ttagacaacc tgaagtctag gtccctatct atttttttat	8700
agttatgtta gtattaagaa cgttatctat atttcaaatt tttctttttt ttctgtacag	8760
acgcgtgtac gcatgtaaca ttatactgaa aacctgtctt gagaagggtt tgggacgctc	8820
gaaggcttta atttcgggcc ggtacccaat tcgccctata gtgagtcgta ttacgcgcgc	8880
tacttgccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgctac ccaacttaat	8940
cgccttgcat cacatccccc tttcgcacgc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat	9000
cgccttcccc aacagttgag cagcctgaat ggcgaaatggc gcgacgcgcc ctgtagcggc	9060
gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc	9120
ctagcgcggc ctcttttcgc tttcttccct tcctttctcg ccaagttcgc cggcttcccc	9180
cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc	9240
gaccccaaaa aacttgatta gggtagtggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg	9300
gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtcacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact	9360
ggaacaacac tcaacctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggtt tttgccgatt	9420
tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa	9480
atattaacgt ttacaatttc ctgatgggt attttctct tacgcatctg tcgggtatct	9540
cacaccgctt ggatggcggc gttagtatcg aatcgacagc agtatagcga ccagcattca	9600
catacgattg acgcatgata ttactttctg cgcacttaac ttgcgcatctg ggcagatgat	9660
gtcagggcga aaaaaaatat aaatcacgct aacatttgat taaaatagaa caactacaat	9720
ataaaaaaac tatacaaatg acaagttctt gaaaacaaga atctttttat tgtcagtact	9780
gattagaaaa actcatcgag catcaaatga aactgcaatt tattcatatc aggattatca	9840
ataccatatt tttgaaaaag ccgtttctgt aatgaaggag aaaactcacc gaggcagttc	9900
cataggatgg caagatcctg gtatcgggtc gcgattccga ctgcgtccaac atcaatacaa	9960

ES 2 616 790 T3

cctattaatt tcccctcgtc aaaaataagg ttatcaagtg agaaatcacc atgagtgcgc	10020
actgaatccg gtgagaatgg caaaagctta tgcattttctt tccagacttg ttcaacaggc	10080
cagccattac gctcgtcac ccaatcactc gcatcaacca aaccgttatt cattcgtgat	10140
tgcgcctgag cgagacgaaa tacgcgatcg ctgttaaaag gacaattaca aacaggaatc	10200
gaatgcaacc ggcgcaggaa cactgccagc gcatcaacaa tattttcacc tgaatcagga	10260
tattcttcta atacctggaa tgctgttttg cgggggatcg cagtgggtgag taacctgca	10320
tcatcaggag tacggataaa atgcttgatg gtcggaagag gcataaattc cgtcagccag	10380
tttagtctga ccatctcatc tgtaacatca ttggcaacgc tacctttgcc atgtttcaga	10440
aacaactctg gcgcacggg cttcccatc aatcgataga ttgtcgacc tgattgcccg	10500
acattatcgc gagcccatct ataccatat aaatcagcat ccatgttgga atttaatcgc	10560
ggcctcgaaa cgtgagtcct ttccctaccc atggttggtt atgttcggat gtgatgtgag	10620
aactgtatcc tagcaagatt ttaaaaggaa gtatatgaaa gaagaacctc agtggcaaat	10680
cctaaccctt tatatttctc tacaggggag cggcggtggg acaattcaac gcgtctgtga	10740
ggggagcgtt tccctgctcg caggtctgca gcgaggagcc gtaatttttg cttcgccgcg	10800
tgcggccatc aaaatgtatg gatgcaaatg attatacatg gggatgtatg ggctaaatgt	10860
acgggagaca gtcacatcat gccctgagc tgcgcacgct aagactgtca aggagggtat	10920
tctgggocct ggtatgtgac actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagtaagcca	10980
gccccgacac ccgccaacac ccgtgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc	11040
cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcacgctc	11100
atcacgaaa cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt	11160
catgataata atgggtttctt aggacggatc gcttgctgtt aacttacacg cgcctcgtat	11220
cttttaatga tggaataatt tggaattta ctctgtgtt atttattttt atgttttgta	11280
tttggtttt agaaagtaaa taaagaaggt agaagagtta cggaatgaag aaaaaaaaaat	11340
aaacaaaggt ttaaaaaatt tcaacaaaaa gcgtacttta catatatatt tattagacaa	11400
gaaaagcaga ttaaatagat atacattcga ttaacgataa gtaaaatgta aaatcacagg	11460
attttcgtgt gtggtcttct acacagacaa gatgaacaa ttgggcatta atacctgaga	11520
gcaggaagag caagataaaa ggtagtattt gttggcgatc cccctagagt cttttacatc	11580
ttcggaaaac aaaaactatt tttcttttaa tttctttttt tactttctat ttttaattta	11640
tatatttata ttaaaaaatt taaattataa ttatttttat agcacgtgat gaaaaggacc	11700
caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt ttctaaatac	11760
attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa	11820

ES 2 616 790 T3

aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat	11880
tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc	11940
agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga	12000
gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg	12060
cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc	12120
agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag	12180
taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtataaa cactgcggcc aacttacttc	12240
tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg	12300
taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg	12360
acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac	12420
ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac	12480
cacttctgcg ctcgccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg	12540
agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgatcg	12600
tagttatcta caccgagggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg	12660
agatagggtc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac	12720
tttagattga tttaaaactt cttttttaat ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg	12780
ataatctcat gaccaaatac ccttaacgtg agttttcggt ccaactgagcg tcagaccccg	12840
tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaate tgctgcttgc	12900
aaacaaaaaa accacgccta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc	12960
tttttcgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt	13020
agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcaac gcctacatac ctcgctctgc	13080
taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact	13140
caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac	13200
agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag	13260
aaagcggcac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg	13320
gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg	13380
tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttttgt atgctcgtca ggggggcgga	13440
gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt	13500
ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct	13560
ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg	13620
aggaagcgga agagcgccca atacgaaac gcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt	13680
aatgcagctg gcacgacag tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta	13740

ES 2 616 790 T3

atgtgagtta cctcactcat taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctccta 13800
 tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt 13860
 acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaacaaaa gctggagctc atttggcgag 13920
 cgttggttgg tggatcaagc ccacgcgtag gcaatcctcg agcagatccg ccaggcgtgt 13980
 atatatagcg tggatggcca ggcaacttta gtgctgacac atacaggcat atatatatgt 14040
 gtgcgacgac acatgatcat atggcatgca tgtgctctgt atgtatataa aactcttggt 14100
 ttcttctttt ctctaaatat tctttcctta tacattagga cctttgcagc ataaattact 14160
 atacttctat agacacgcaa acacaaatac acacactaat ctagacctgc aggcggcatt 14220
 attgtgtatg gctcaataat ttataaaaa aaggaactat tgggttcttag tattttcttg 14280
 ctagaagaca tattcttacc aatcctttca taagctaatt atgcatcca tatagcaaga 14340
 gaatccggtg gggggcgcct gcctatccgg cggcaacatt attactctgg tatacgggcg 14400
 taactccata atatgccacc acttaccttt aacatgttca tggtaggtac cccaccagc 14460
 cataaggaaa ttttcaaagg cgttggtatca aaaaataggc ctttatttca tgcgtgatt 14520
 gaggagcata acatgttttag tgaaggtttc ttttgaaaaa cttcagtcgc tcattattag 14580
 aaccagggag gtccaggctt tgctggtggg agagaaagct tatgaagctg gggttgcaga 14640
 tttgtcgatt ggtcgccagt acacagtttt aaaaagtcag agaatgtaga gaagtatgga 14700
 tctttgaaac cctggcgcgc cg 14722

<210> 5
 <211> 8091
 <212> ADN
 <213> Nucleótido artificial

<220>
 <223> Plásmido pBOL268

<400> 5
 aaaagctgga gctcatttgg cgagcgttgg ttggtggatc aagcccacgc gtaggcaatc 60
 ctcgagcaga tccgccaggc gtgtatatat agcgtggatg gccaggcaac tttagtgtg 120
 acacatacag gcatatatat atgtgtgcga cgacacatga tcatatggca tgcattgtgt 180
 ctgtatgtat ataaaactct tgttttcttc ttttctctaa atattctttc cttatacatt 240
 aggacctttg cagcataaat tactatactt ctatagacac gcaaacacaa atacacacac 300
 taatctagaa ctagtggatc ccccaaactc cgggtgccgt cttctacgtc aagacctctg 360
 tcccgagac cctgatggtc tgcgagacag tcaacaacat catcgggcgc accgtcaacc 420
 cacgcaacaa gaactggtcg tgcggcggca gttctggtgg tgagggtgcg atcgttggga 480
 ttcgtggtgg cgtcatcgtt gtaggaacgg atatcggtgg ctcgattcga gtccgggccg 540

ES 2 616 790 T3

cgttcaactt cctgtacggt ctaaggccga gtcattggcg gctgccgtat gcaaagatgg 600
 cgaacagcat ggaggggtcag gagacggtgc acagcggtgt cgggcccatt acgcactctg 660
 ttgaggacct ccgcctcttc accaaatccg tcctcgggtca ggagccatgg aaatacgact 720
 ccaaggtcat ccccatgccc tggcgccagt ccgagtcgga cattattgcc tccaagatca 780
 agaacggcgg gctcaatata ggctactaca acttcgacgg caatgtcctt ccacaccctc 840
 ctatcctgcg oggcgtggaa accaccgtcg ccgcactcgc caaagccggt cacaccgtga 900
 ccccgtagac gccatacaag cacgatttcg gccacgatct catctcccat atctacggcg 960
 ctgacggcag ogccgacgta atgcgcgata tcagtgcata cggcgagccg gcgattccaa 1020
 atatcaaaga cctactgaac ccgaacatca aagctgttaa catgaacgag ctctgggaca 1080
 cgcactctca gaagtggaaat taccagatgg agtaccttga gaaatggcgg gaggtgaag 1140
 aaaaggccgg gaaggaaactg gacgccatca tcgcgcgat tacgcctacc gctgcggtac 1200
 ggcagaccca gttccgggtac tatgggtatg cctctgtgat caacctgctg gatttcacga 1260
 gcgtgggtgt tccggttacc tttcgggata agaacatca taagaagaat gagagtttca 1320
 aggcgggttag tgagcttgat gccctcgtgc aggaagagta tgatccggag gcgtaccatg 1380
 gggcaccggt tgcagtgcag gttatcggac ggagactcag tgaagagagg acgttggcga 1440
 ttgcagagga agtggggaag ttgctgggaa atgtggtgac tccataggtc gagaatttat 1500
 acttagataa gtatgtactt acaggtatat ttctatgaga tactgatgta tacatgcatg 1560
 ataatattta aacggttatt agtgcgatt gtcttgtgcg ataatacgt tcctatcaaa 1620
 gcaatacact taccacctat tacatgggcc aagaaaatat tttcgaactt gtttagaata 1680
 ttagcacaga gtatatgatg atatccgtta gattatgcat gattcattec tacaactttt 1740
 tcgtagcata aggattaatt acttggtatg caataaaaaa aaaaaacatc gagaaaattt 1800
 cagcatgctc agaaacaatt gcagtgatc aaagtaaaaa aaagattttc gctacatggt 1860
 ccttttgaag aaagaaaatc atggaacatt agatttaca aaatttaacc accgctgatt 1920
 aacgattaga ccgttaagcg cacaacaggt tattagtaca gagaaagcat tctgtggtgt 1980
 tgccccggac tttcttttgc gacataggta aatcgaatac catcatacta tcttttccaa 2040
 tgactcccta aagaaagact cttcttcgat gttgtatacg ttggagcata gggcaagaat 2100
 tgtggcttga gatataactt cgtatagcat acattatacg aagttatcgt atatgtcatg 2160
 ctctgacaaa agagcgtaag atggcgaacg aattcggcgc gccgggcccc gcgctactag 2220
 ttggccggcc gtttaaacgg ccaaggagcg cgcggccgca ttttatttta ctttttttag 2280
 aatgacctgt tcccgaact atgtaagatc tagcttttaa catattatgg aaacctgaaa 2340
 tgtaaaaatc gaatttttgt atatgtgttt atatttgggt agttcttttg aggaaagcat 2400
 gcatagactt gctgtaogaa ctttatgtga cttgtagtga cgtgttttca tgagacttta 2460

ES 2 616 790 T3

gccctttgaa catattatca tatctcagct tgaaatacta tagatttact tttgcagcca	2520
tttcttggtg ctccaaggtt gtgcgtatct attacttaat ttctgtcctt gccaaagttt	2580
gcagcagggc ggtcacaaga ctctctgcc gtcattcctt agtccttcgg gaacacactt	2640
atttatgtat ttgtattcta caattctacg gtgcacaagg gttgggcact gttgagctca	2700
gcacgcaact attgctggca tgaagataag attgattttt ggaagaataa gcttgtggcc	2760
taggcccggg cgctcgacct gagtcatgta attagttatg tcacgcttac attcacgccc	2820
tccccccaca tccgctctaa ccgaaaagga aggagttaga caacctgaag tctaggtccc	2880
tatttatttt ttatagtta tgttagtatt aagaacgtta tttatatattc aaatttttct	2940
tttttttctg tacagacgcg tgtacgcatg taacattata ctgaaaacct tgcttgagaa	3000
ggttttggga cgctcgaagg cttaatttg cgcccggtac ccaattcgcc ctatagttag	3060
togtattacg cgcgctcact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc	3120
gttaccacac ttaatcgctt tgcagcacat cccctttctg ccagctggcg taatagcgaa	3180
gaggcccgca ccgatcgccc ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgcgac	3240
gcgccctgta gcggcgcat aagcgggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgaccgct	3300
acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt tctcgccacg	3360
ttcgccggct tccccgtca agctctaat cgggggctcc ctttaggggt ccgatttagt	3420
gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattaggggt atgggttcacg tagtgggcca	3480
tgcacctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt taatagtgga	3540
ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt tgatttataa	3600
gggattttgc cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac	3660
gcgaatttta acaaaatatt aacgtttaca atttctgat gcggtatttt ctcttacgc	3720
atctgtgcgg tatttcacac cgcctggatg gcggcgtag tatcgaatcg acagcagtat	3780
agcgaccagc attcacatac gattgacgca tgatattact ttctgcgcac ttaacttcgc	3840
atctgggcag atgatgtcga ggcgaaaaa aatataaatc acgctaacat ttgattaaaa	3900
tagaacaact acaatataaa aaaactatac aatgacaag ttcttgaaaa caagaatctt	3960
tttattgtca gtactgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttatc	4020
atatcaggat tatcaatacc atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac	4080
tcaccgaggc agttccatag gatggcaaga tcctggtatc ggtctgcgat tccgactcgt	4140
ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa	4200
tcaccatgag tgaogactga atccggtgag aatggcaaaa gcttatgcat ttctttccag	4260
acttgttcaa caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat cactcgcac aaccaaaccg	4320

ttattcattc gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctggt aaaaggacaa	4380
ttacaaacag gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcac cacaatattt	4440
tcacctgaat caggatattc ttctaatacc tggaatgctg ttttgccggg gatcgcagtg	4500
gtgagtaacc atgcatcacc aggagtacgg ataaaaatgct tgatggtcgg aagaggcata	4560
aattccgtca gccagtttag tctgaccacc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct	4620
ttgccatggt tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc	4680
gcacctgatt gcccgcacatt atcgcgagcc cttttatacc catataaacc agcatccatg	4740
ttggaattta atcgcggcct cgaaacgtga gtcttttccct taccatgggt tgtttatggt	4800
cggatgtgat gtgagaactg tatcctagca agattttaaa aggaagtata tgaaagaaga	4860
acctcagtg caaatccctaa ccttttatat ttctctacag gggcgcgcg tgggggacaat	4920
tcaacgcgtc tgtgagggga gcgtttccct gctcgagggt ctgcagcgag gagccgtaat	4980
ttttgcttcg cgcctgtcgg ccatcaaaat gtatggatgc aatgattat acatggggat	5040
gtatgggcta aatgtacggg cgacagtcac atcatgcccc tgagctgcgc acgtcaagac	5100
tgtcaaggag ggtattcttg gccttggtat ggtgcactct cagtacaacc tgctctgatg	5160
ccgcatagta agccagcccc gacaccggcc aacaccgct gacgcgcctt gacgggcttg	5220
tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca	5280
gagggtttta ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggccctctga tacgcctatt	5340
tttatagggt aatgtcatga taataatggt ttcttaggac ggatcgcttg cctgtaactt	5400
acacgcgcct cgtatctttt aatgatggaa taatttgga atttactctg tgtttattta	5460
tttttatggt ttgtatttg attttagaaa gtaataaag aaggtagaag agttacggaa	5520
tgaagaaaaa aaaataaaca aaggtttaaa aaatttcaac aaaaagcgta ctttacatat	5580
atatttatta gacaagaaaa gcagattaaa tagatataca ttcgattaac gataagtaaa	5640
atgtaaaacc acaggatttt cgtgtgtggt cttctacaca gacaagatga aacaattcgg	5700
cattaatacc tgagagcagg aagagcaaga taaaaggtag tatttgttgg cgatccccct	5760
agagtctttt acatcttcgg aaaacaaaaa ctattttttc ttttaattct ttttttactt	5820
tctattttta atttatatat ttatattaaa aaattttaat tataattatt tttatagcac	5880
gtgatgaaaa ggaccaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt	5940
tatttttcta aatacattca aatagtatc cgctcatgag acaataaacc tgataaatgc	6000
ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgct gcccttattc	6060
ccttttttgc ggcattttgc cttcctggtt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa	6120
aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg	6180
gtaagatcct tgagagtttt cgcgccgaag aacgttttcc aatgatgagc actttttaaag	6240

ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc	6300
gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta	6360
cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaactg	6420
cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca	6480
acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttggaacc ggagctgaat gaagccatac	6540
caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaactat	6600
taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg	6660
ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttcgggc tggctggttt attgctgata	6720
aatctggagc cggtgagcgt ggtctcgcg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta	6780
agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa	6840
atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag	6900
tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg	6960
tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact	7020
gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg	7080
taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgcgggac	7140
aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag ataccaaata	7200
ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcacgccta	7260
catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc	7320
ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg	7380
ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgacct aaccgaactg agatacctac	7440
agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg	7500
taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt	7560
atctttatag tcctgtcggg ttccgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct	7620
cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg	7680
ccttttgctg gccttttget cacatgttct ttctgcggtt atcccctgat tctgtggata	7740
accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca	7800
gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc	7860
gttgcccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg	7920
agcgcaacgc aattaatgtg agttacctca ctcataggc accccaggct ttacacttta	7980
tgcttcgggc tcctatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca	8040
gctatgacca tgattacgcc aagcgcgcaa ttaaccctca ctaaagggaa c	8091

<210> 6

<211> 416

5 <212> PRT

<213> Aspergillus niger

<400> 6

ES 2 616 790 T3

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

ES 2 616 790 T3

Ser Asp Gly Ile Pro Ile Ile Ile Ala Gly Ile Thr Phe Gln Gly Leu
225 230 235 240

Gly Phe Ser Ile Ser Phe Met Met Tyr Ala His Tyr Ile Gly Arg Leu
245 250 255

Met Glu Val Gly Leu Pro Ser Pro Glu His Arg Pro Gly Met Phe Ile
260 265 270

Cys Val Gly Pro Pro Ala Phe Thr Ala Leu Ala Leu Val Gly Met Ala
275 280 285

Lys Ala Leu Pro Asp Asp Phe Gln Ile Val Gly Asp Pro His Ala Val
290 295 300

Ile Asp Gly Arg Val Met Leu Phe Leu Ala Val Ser Ala Ala Ile Phe
305 310 315 320

Leu Trp Ala Leu Ser Phe Trp Phe Phe Cys Ile Ala Val Val Ala Val
325 330 335

Val Arg Ser Pro Pro Lys Gly Phe His Leu Asn Trp Phe Ala Met Val
340 345 350

Phe Pro Asn Thr Gly Phe Thr Leu Ala Thr Ile Thr Leu Ala Asn Met
355 360 365

Phe Glu Ser Pro Gly Val Lys Gly Val Ala Thr Ala Met Ser Leu Cys
370 375 380

Val Ile Ile Met Phe Ile Phe Val Leu Val Ser Ala Ile Arg Ala Val
385 390 395 400

Ile Arg Lys Asp Ile Met Trp Pro Gly Gln Asp Glu Asp Val Ser Glu
405 410 415

<210> 7

<211> 2188

5 <212> ADN

<213> Nucleótido artificial

<220>

<223> Construcción sintética DCT_02

10

<400> 7

gggcccgat ccggcgcgcc ccgcggaacc gccagatatt cattacttga cgcaaaagcg 60

tttgaaataa tgacgaaaaa gaaggaagaa aaaaaaagaa aaataccgct tctaggcggg 120

ttatctactg atccgagctt ccactaggat agcaccctaaa cacctgcata ttgggacgac 180

ctttacttac accacaaaa accactttcg cctctccgc ccctgataac gtccactaat 240
 tgagcgatta cctgagcggc cctcttttgt ttgcagcatg agacttgcac actgcaaactc 300
 gtaagtagca acgtctcaag gtcaaaactg tatggaaacc ttgtcacctc acttaattct 360
 agctagccta ccctgcaagt caagaggctc cctgtattcc tagccacctc aaggatgcc 420
 tctccccgga aactgtggcc tttctggca cacatgatct ccacgatttc aacatataaa 480
 tagcttttga taatggcaat attaatcaaa tttattttac ttctttcttg taacatctct 540
 cttgtaatcc cttattcctt ctagctatct ttcataaaaa accaagcaac tgcttatcaa 600
 cacacaaaca ctaaaacaaa atgaacgttg aaacttcttt gccagggtct tctggttctg 660
 acttggaac tttccaccac gaaaccaaga agcatgccaa ccacgactct ggtatttccg 720
 tcaaccatga agctgaaatt ggtgttaacc acactttcga aaagccaggc ccagttggta 780
 tcagagaaag attacgtcac ttcaacctgg cttggtacac ttgaccatg tctgtggtg 840
 gtttggtctt gttgattgtc aaccaaccac acgacttcaa gggtttgaaa gatattgcca 900
 gagttgtcta ctgtttgaac ttggctttct ttgttatcgt tacctctttg atggccatca 960
 gattcatctt gcacaagaac atgtgggaat ccttgggtca cgacagagaa ggtttgtttt 1020
 tcccaacttt ctggttatcc attgctacca tgatcactgg tttgtacaag tgtttcgggtg 1080
 atgatgctaa cgaaaagttc accaagtgtt tgcaagtttt gttctggatc tactgtggtt 1140
 gtaccatgat cactgctgtc ggtcaatact cttcgtctt tgctaccac aaatacgaat 1200
 tgcacaccat gatgccatcc tggatcttgc cagctttccc agttatgttg tctggtacta 1260
 tcgcctccgt catcggttct ggtcaaccag cttccgatgg tattccaatt attattgctg 1320
 gtatcacttt ccaaggttta ggtttctcca tctccttcat gatgtacgct cactacattg 1380
 gtagattgat ggaagttggc ttaccatctc cagaacacag accaggtatg ttcatctgtg 1440
 ttggtcctcc agctttcacc gctttggctt tggcgggtat ggccaaggct ttaccagacg 1500
 acttccaaat tgtcgggtgac cctcacgctg tcattgacgg tcgtgttatg ttgttcttgg 1560
 ctgtctctgc tgccatcttc ttatgggctt tgtctttctg gttcttctgt atcgtctgtg 1620
 ttgctgttgt cagatctcca ccaaagggtt tccatttgaa ctgggttgcc atggttttcc 1680
 caaacactgg tttcaccttg gctaccatca ctttggttaa catgttcgaa tctccagggtg 1740
 tcaagggtgt tgccactgct atgtccctat gtgtcatcat catgtttatt ttogtcttgg 1800
 tttctgcoat cagagctgtc atcagaaagg acatcatgtg gccagggtcaa gatgaagatg 1860
 tttctgaata agagcttttg attaagcctt ctagtccaaa aaacacgttt tttgtcatt 1920
 tatttcattt tcttagaata gtttagttta ttcattttat agtcacgaat gttttatgat 1980
 tctatatagg gttgcaaaca agcatttttc attttatgtt aaaacaattt caggtttacc 2040
 ttttattctg cttgtggtga cgcgggtatc cgcctgtctt tttggtcacc catgtattta 2100
 attgcataaa taattcttaa aagtggagct agtctatttc tatttacata cctctcattt 2160
 ctcatctcct ccatttaaat gcggccgc 2188

- 5 <210> 8
 <211> 19666
 <212> ADN
 <213> Nucleótido artificial

<220>

<223> Plásmido pSUC174

5 <400> 8
catcctggcg gaaaaaattc atttgtaaac tttaaaaaaa aaagccaata tccccaaaat 60
tattaagagc gcctccatta ttaactaaaa ttctactcag catccacaat gtatcaggta 120
tctactacag atattacatg tggcgaaaaa gacaagaaca atgcaatagc gcatcaagaa 180
aaaacacaaa gctttcaatc aatgaatcga aaatgtcatt aaaatagtat ataaattgaa 240
actaagtcatt aaagctataa aaagaaaatt tatttaaatg caagatttaa agtaaattca 300
ccttaactgt ccaagatgaa agacttacc ttttcaatgt tctttctcaa ttccttgaca 360
gcagtgttga ccaattgttc ttctcttgga gacaattttt ccaaacacaga agtgtcaatg 420
gaaacaacgg aaccgtttct caaaacaatt ggcaaagaga agtattcaat ggagttgtca 480
ccgactaatt gttgagcctt ottaccgttc ttcaaacctg gcaagtagac gaaagcagac 540
aaagattcag tttctggcctt ttcgttgtgg aaagaacgta agacttcttc agcaaatttg 600
gcaccagcga aagccatgga caaggtagca gaaccggcac cttgcttggc cttgacaatt 660
tcgtcaccac cgaattggac tctgtggatg aaatgttcgt attgcttgtc caattggaaa 720
accaaggatt tgtcagtgat gattggaatg atggtttcac cagagtgacc accgatgacg 780
gtgacctttc tgtgcatggt ggtcttgtct tgttcttgac cgatctttgg gttcttcaac 840
atcaagtagt caaccaagaa agtttcagct ctgaccaaatt ccaagttggt gacaccata 900
acgttacctg gcttgaactt acccatcttc ttcaaagttt caacggcaat tggaaacaaa 960
gagttaacag ggttgagat gactaagata cgagcgtttg gggcaaattt accgacagca 1020
gtaaccaaag acttaacgat accagcgttc atcttgaaca aatcatctct ggtcaaacct 1080
ggctttcttg gaacaccagc tggaatcaag acaacttgag cattggacaa agtgttttcg 1140
atggaatcct tgtcgtaacc aacacaagag gagttggtgt tgatgtggga caaatcctta 1200
ccaatacctt cagcagctct gatatcgta aaagccaatt cagaaacgta tggagacaat 1260
ttcaataata gagataatgg ttgaccgaca ccaccagaag cacctaagat ggcaacctta 1320
accattttgt ttgtttatgt gtgtttattc gaaactaagt tcttggtgtt ttaaaactaa 1380
aaaaaagact aactataaaa gtagaattta agaagtttaa gaaatagatt tacagaatta 1440

ES 2 616 790 T3

caatcaatac ctaccgtctt tatatactta ttagtcaagt aggggaataa tttcagggaa	1500
ctggtttcaa cctttttttt cagctttttt caaatcagag agagcagaag gtaatagaag	1560
gtgtaagaaa atgagataga tacatgcgtg ggtcaattgc cttgtgtcat cttttactcc	1620
aggcaggttg catcactcca ttgaggttgt gcccgttttt tgcctgtttg tgccctgtt	1680
ctctgtagtt gcgctaagag aatggacctt tgaactgatg gttggtgaag aaaacaatat	1740
tttggtgctg ggattctttt tttttctgga tgccagotta aaaagcgggc tccattatat	1800
ttagtggtatg ccaggaataa actgttcacc cagacacctt cgatgttata tattctgtgt	1860
aaccgcggcc ctattttggg catgtacggg ttacagcaga attaaaaggc taattttttg	1920
actaaggccg gccacgcgtg aagatctcgt tatgtacctg aatatgtcag tttacattgg	1980
tcagtctatt ggagaattaa gtttgatcgt aggtatagac cggacaatat gccggaatat	2040
gtaaggcaat tgttccaaga tttggaaggt attgatttaa aaagtaataa agtttcaa	2100
aaatatgata agcaagataa tagcaacggg agtgaatca atgggggctt ttttgataat	2160
gaggaagggc aggaactcca catgggtcaa aaagcaagtt attttgcaac gacatacaat	2220
tcaagattat ttgacagtaa atactccaa ttaaaaaaga aattcatgga ctgggatagt	2280
aattcctgga cagatatctc agatgattta aaaatatacc tacagcaaga tgaatcgctt	2340
tagcattaaa aaaacccctt cggtagctaa tataaaaaat tttataggta atatacatat	2400
ataaaaaatac ttcaatcatt ttacaatct tgtatacttt atacaacatg tgaatcttc	2460
tgcttctgga catcaatatt caaatacagg ccaatcttag gtaaaacatt tggagaaaag	2520
aaggataagg caggacgagg gaagataaat agtttcgtta attataaata catgcagata	2580
aataaaggaa tatcaaatat tatgaataga aaaagaagat ggtgagacaa aaaagtagta	2640
ataaataggt ccaaatcttc tttatttccc ctttcttttc ttatcctttt gttttctcca	2700
tattgtataa gaatatattc ttaggaaaat caacagggaa tacagtatag tgattttcgt	2760
tcctttttga gcgtaatccc ttcgagactg tgatgttgat ttttttgtt gtgatttcaa	2820
aattcttagg ttagttgtat agttcccggt cataacataa tggatagtaa atgaaaaatc	2880
aaaataaggg tgaacaaat agacaataaa gatgtagttt tcgaggacga aaaacaaacc	2940
taaccaacaa tgacctatc accatcgaat tcataagcag gaatttctaa gtttaagggg	3000
gcaggtcctt ttctgattct accggaaata tcataatgtg aaccatggca aggacagaac	3060
caaccaccaa aatcacgggc ttcaccaatt ggaacacaac ctaagtgagt acaaatacc	3120
agcataatta accattgagg gtctttgact ctgtcagcat cggctctgtg gtccttcaa	3180
gcggacatat ccacactggt ggcttcctga atttcatgag gagttctgtg tctaataaac	3240
acaggcttac cttgccattt gacaaccacg tttttacca atgggatagc cgctaaatta	3300

acttcaactt tagccatagc caaaacatcg gcagtagcgg tcatagatga aataaagggt	3360
tctacgggtg atttggcacc tgcagatgac aaaagacca tagcacgac cataaagtaa	3420
gcataagaac ggcctttatc agcatcgta ttttccttta aaacgtcatc aaaatttggg	3480
gtcctgtacg tggatttgct agccagcaaa gattgagaaa tcaggtaacca cggctcctcg	3540
ctgcagacct gcgagcaggg aaacgctccc ctcacagtcg cgttgaattg tccccacgcc	3600
gcgcccctgt agagaaatat aaaagggttag gatttgccac tgaggttcct ctttcatata	3660
cttcctttta aaatcttgct aggatacagt tctcacatca catccgaaca taaacaacca	3720
tgggtaagga aaagactcac gtttcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg gatgctgatt	3780
tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca atctatcgat	3840
tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaagg agcgttgcca	3900
atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg cctcttcga	3960
ccatcaagca ttttatcgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact gcgatccccg	4020
gcaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat attggtgatg	4080
cgtcggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt ccttttaaca	4140
gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt ttggttgatg	4200
cagtgatgtt tgatgacgag cgtaatggct ggctgttga acaagtctgg aaagaaatgc	4260
ataagctttt gccattotca cggattcag tcgtcaactca tggtgatttc tcaattgata	4320
accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttgacga gtcggaatcg	4380
cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt tctcctcat	4440
tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt	4500
ttcatttgat gctcgatgag tttttctaata cagtactgac aataaaaaga ttcttgtttt	4560
caagaacttg tcaatttgat agttttttta tattgtagtt gttctatttt aatcaaagt	4620
tagcgtgatt tatatttttt ttgcctcga catcatctgc ccagatgcga agttaagtgc	4680
gcagaaagta atatcatgcg tcaatcgtat gtgaatgctg gtcgctatac tgcgtgcgat	4740
tcgatactaa cgcgcctac cagggtacca tccttttggt gtttcgggt gtacaatatg	4800
gacttcctct tttctggcaa ccaaaccat acatcgggat tcctataata ccttcgttg	4860
tctccctaac atgtagggtg cggaggggag atatacaata gaacagatac cagacaagac	4920
ataatgggct aaacaagact acacaaatta cactgcctca ttgatggtg tacataacga	4980
actaatactg tagccctaga cttgatagcc atcatcatat cgaagtttca ctaccctttt	5040
tccatttgcc atctattgaa gtaataatag gcgcatgcaa cttctttct tttttttct	5100
tttctctctc ccccggtgtt gtctcaccat atccgcaatg acaaaaaaaa tgatggaaga	5160
cactaaagga aaaaattaac gacaaagaca gcaccaacag atgtcgttgt tccagagctg	5220

ES 2 616 790 T3

atgaggggta tcttgaaca cacgaaactt tttccttctt tcattcacgc acactactct	5280
ctaagtagca acggtatacg gccttccttc cagttacttg aatttgaaat aaaaaaagtt	5340
tgccgctttg ctatcaagta taaatagacc tgcaattatt aatcttttgt ttcctcgtca	5400
ttgttctcgt tcccttttct ccttgtttct ttttctgcac aatatttcaa gctataccaa	5460
gcatacaatc aactatctca tatacaatgc ctcaatcctg ggaagaactg gccgctgata	5520
agcgcgcccg cctcgcaaaa accatccctg atgaatggaa agtccagacg ctgcctgcgg	5580
aagacagcgt tattgatttc ccaaagaaat cggggatcct ttcagaggcc gaactgaaga	5640
tcacagaggc ctccgctgca gatcttgtgt ccaagctggc ggccggagag ttgacctcgg	5700
tggaagttag gctagcattc tgtaaacggg cagcaatcgc ccagcagtta acaaactgcg	5760
cccacgagtt ctccctgac gccgctctcg cgcaggcaag ggaactcgat gaatactacg	5820
caaagcacia gagaccggtt ggtccactcc atggcctccc catctctctc aaagaccagc	5880
ttcagagtaa gggctacgaa acatcaatgg gctacatctc atggctaaac aagtacgacg	5940
aaggggactc ggttctgaca accatgctcc gcaaagccgg tgccgtcttc tacgtcaaga	6000
cctctgtccc gcagaccctg atggtctgcg agacagtcaa caacatcatc gggcgacccg	6060
tcaaccacg caacaagaac tggctcgtcg cgggcagttc tgggtggtgag ggtgcgatcg	6120
ttgggattcg tgggtggcgc atcggtgtag gaacggatat cgggtggctcg attcagatgc	6180
cggccgcggt caacttctcg tacggtctaa ggccgagtcg tgggcggtcg ccgtatgcaa	6240
agatggcgaa cagcatggag ggtcaggaga cgggtgcacag cgttgtcggg ccgattacgc	6300
actctgttga ggacctcgc ctcttcacca aatccgtcct cggtcaggag ccatggaaat	6360
acgactccaa ggtcatcccc atgcctggc gccagtcga gtcggacatt attgcctcca	6420
agatcaagaa cggcgggctc aatatcggt actacaactc cgacggcaat gtccttcac	6480
accctcctat cctgcgcggc gtggaaacca ccgtcgccgc actcgccaaa gccggtcaca	6540
ccgtgacccc gtggacgcca tacaagcacg atttcggcca cgatctcatc tcccatatct	6600
acgcggtga cggcagcgcc gacgtaatgc gcgatatcag tgcacccggc gagccggcga	6660
ttccaaatat caaagacctc ctgaaccoga acatcaaagc tgttaacatg aacgagctct	6720
gggacacgca tctccagaag tggaattacc agatggagta ccttgagaaa tggcgggagg	6780
ctgaagaaaa ggccgggaag gaactggacg ccacatcgc gccgattacg cctaccgctg	6840
cggtagcgca tgaccagttc cggtagtatg ggtatgcctc tgtgatcaac ctgctggatt	6900
tcacgagcgt ggttgttccg gttaccttg cggataagaa catcgataag aagaatgaga	6960
gtttcaaggc ggttagtgag cttgatgccc tcgtgcagga agagtatgat ccggaggcgt	7020
accatggggc accggttgca gtgcaggtta tcggacggag actcagtgaa gagaggacgt	7080

ES 2 616 790 T3

tggcgattgc agaggaagtg gggaagttgc tgggaaatgt ggtgactcca taggtcgaga	7140
at ttatactt agataagtat gtacttacag gtatat tttct atgagatact gatgtataca	7200
tgc atgataa tattt aaacg gttattagt ccgattgtct tgtgcgataa tgacgttcct	7260
atcaaagcaa taca cttacc acctattaca tgggccaaaga aaatattttc gaacttgttt	7320
agaatattag caçagagtat atgatgatat cçgttagatt atgcatgatt cattcctaca	7380
actttttcgt agcataagga ttaattactt ggatgccaat aaaaaaaaa aacatcgaga	7440
aaatttcagc atgctcagaa acaattgcag tgtatcaaag taaaaaaaaag attttcgcta	7500
catgttcctt ttgaagaaag aaaatcatgg aacattagat ttacaaaaat ttaaccaccg	7560
ctgattaacg attagaccgt taagcgacaca acaggttatt agtacagaga aagcattctg	7620
tgggtgttgc cçgactttc ttttgcgaca taggtaaatc gaataccatc atactatctt	7680
ttccaatgac tccctaaaga aagactcttc ttcatgtttg tatacgttgg agcatagggc	7740
aagaattgtg gcttgagatc tagattacgt ggaagaaagg tagtaaaagt agtagtataa	7800
gtagtaaaaa gaggtaaaaa gaaaaaacgg gctacatact agagaagcac gtacacaaaa	7860
actcataggc acttcatcat acgacagttt cttgatgcat tataatagtg tattagatat	7920
tttcagaaat atgcatagaa cctcttcttg cctttacttt ttatacatag aacattggca	7980
gatttactta cactactttg tttctacgcc atttcttttg ttttcaacac ttagacaagt	8040
tgttgagaac cggactacta aaaagcaatg tccccactga aaatcatgta cctgcaggat	8100
aataaccccc taattctgca tçgatccagt atgttttttt ttctctactc atttttacct	8160
gaagatagag cttctaaaaac aaaaaaaatc agcgattaca tçcatattgt gtgttctaga	8220
attgcggatc accagatcgc cattacaatg tatgcaggca aatattttctc agaatgaaaa	8280
atagagaaaa ggaaacgaaa attctgtaag atgccttcga agagattttct çgatatgcaa	8340
ggcgtgcac c agggtgatcc aaaggaaatc gagagagagg gcgaaaggca atttaatgca	8400
ttgcttctcc attgacttct agttgagcgg ataagttcgg aaatgtaagt cacagctaat	8460
gacaaatcca ctttaggttt cçaggcacta tttaggcaaa aagacgagtg gggaaataac	8520
aaacgctcaa acatattagc atataccttc aaaaaatggg aatagtatat aaccttcçgg	8580
ttcgttaata aatcaaatct ttcacttagt tctcttaaga tttcaatatt ttgctttctt	8640
gaagaaagaa tctactctcc tccccattc gcaactgcaa gctagcttgg cactggcçgt	8700
cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc tggccttacc caacttaatc gccttgçagc	8760
acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcacçgac gcccttccca	8820
acagttgçgc agcctgaatg gcgaatggga aattgtaaac gttaatat tttt gtttaaaatt	8880
cgcgttaaat ttttgttaaa tcagctcatt ttttaaccaa taggçcgaat tcggcaaaat	8940
cccttataaa tcaaaagaat agacçgagat aggggttgagt gttgttccag tttggaacaa	9000

gagtccacta ttaaagaacg tggactccaa cgtcaaaggc cgaaaaaccg tctatcaggc	9060
cgatggccca ctacgtgaac catcaccta atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa	9120
agcactaaat cggaacccta aaggagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc	9180
gaacgtggcg agaaaggagc ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggc cgctggcaag	9240
tgtagcggtc acgctgcgcg taaccaccac acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggc	9300
cgcgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt ggcgggaacc cctatttggt tatttttcta	9360
aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata	9420
ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca ttcccgctgc gcccttatcc ccttttttgc	9480
ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga	9540
agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct	9600
tgagagtttt cgcgccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaag ttctgctatg	9660
tggcgcggtt ttatcccgtt ttgacgcccg gcaagaccaa ctcggtcgcc gcatacacta	9720
ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat	9780
gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aacctagagt gataaactg cgccaactt	9840
actttcgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga	9900
tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga	9960
gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgctg cgcaactat taactggcga	10020
actacttagt ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc	10080
aggaccactt ctgcgctcgg cccttcgggc tggctggttt attgctgata aatctggagc	10140
cggtagcgtt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg	10200
tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat	10260
cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag ttactcata	10320
tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct	10380
ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga	10440
ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg	10500
cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc	10560
acctcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct	10620
agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc	10680
tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt	10740
ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg	10800
cacacagccc agcttgagagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca	10860

ttgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag	10920
ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct tccagggga aacgcctggt atctttatag	10980
tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg	11040
gcgagaccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg	11100
gccttttgct cacaagtctt ttctgtggtt atccctgat tctgtggata accgtattac	11160
cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt	11220
gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat	11280
tcattaatgc agctggcagc acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc	11340
aattaatgtg agttagctca ctcataggc accccaggct ttacacttta tgcttcgggc	11400
tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacat	11460
gattacgaat ttaatacgac tcacaatagg gaattagctt gcgcgaaatt attggctttt	11520
tttttttttt aattaaaaga aaacattctc tagggattac gaggtaaaga tacattttca	11580
aggcttattc gattctgtga actcagttgg aatattaagg gacaggttgt ttccttgcac	11640
ccagagaagc aatatcgctg agcatgttcg acattgcgta tccttgatg aaagacgtgg	11700
aaaattcaag cagttatgtt tcaactccgat gccgtacatt ccgaaactat tttcattgac	11760
atattgtaat catataactg accagtgttc gccggtgcc aatttctaag cattaatgcg	11820
tgatctaacc ccggaatac ctttgataaa atacacttta aaaagtggcg cacattctat	11880
tagtaatcct tctccactca ttcctgataa ccctggaagg ttgttatcga gcaaaagcga	11940
ggaaactaca gagttgctgt tggacctgaa ctcatcttta gaaggtaatt catacgcgag	12000
agatacagaa tgttcaacaa gaggaattga agccattttc caacttcaat ctatccaagg	12060
cagcggatca tcaagtagaa tgactatgac acccgacttg attgaaaaat ggtttccagg	12120
tgatcggcca tcttgccga tcattctgac gttggtggag gttgggcgc tgactgtgag	12180
acagaagaga acttgtcaaa tttaacgctg cgatggattt tagcagaggc aatcaaattt	12240
ggtgttaaat tcaaacctgg tgcaatacat gatttcgcta ccaaacacac ttcgattgga	12300
tctttattcg cagacacaca tgattacctt agtttcaact caccaaaaga atgttcctta	12360
ctaggagtga gtgataatga ggatggagcc cgagaggata aatctggcag aatgagaga	12420
atggaagatt gtctaaaaa tataaaagag actagattga gcttgaaaga tgaaaaagaa	12480
aaagtgaagg atgcttttac tcttaaatgt ggacatgcaa ataaatttat gagattggtg	12540
tggtgggtat tggaactgct ccccatgga atacgaatgg aaaataaaga aggaaagtgg	12600
caaaattttc atacacctaa cctcggaaga tcgtcgacaa gcttgtggag aggtgacttc	12660
atgaaccaag tgtctgtcga tatacaaaa aaaggaaacca ttttcatctt gatggacaac	12720
atgtgcatca aaaaccttat cgtaaagagt tottggaacc ttggatggag tgtaaaccat	12780

ES 2 616 790 T3

gatttaaaac agcaaataat aaaaatcgat agcgacaaaa actgtcaatt tcaatattct	12840
ttatatattgt tgactgctta gatattttga gaaaattcag cggaaacagc gtgatgagt	12900
agttaagttc tgctgtttta ataatgtattc aactactatt gaagccgact catgaagccg	12960
gttacggaca aaaccgggca aatttcgccg gtcccggaat ttctgtttcc gcaataaaag	13020
aaccgctcat catcatagcg ccagggtagt atactataga aggtcagact aaactgagtc	13080
atctagagta atgacgcctt agtagotttt acatcttcat aagaaaagga aacttgtaga	13140
atggcctggc gatttgtttg ctttcttgtg atgaagaaat ttcgatgcga ttaaccggca	13200
aaatcagtaa aggtatttcg cggaggcggc cttcaatcat cgaatactac gtcttaatat	13260
gatgtactgt ggttcataatt ttcaagtagt gttagtaaat ttgtatacgt tcatgtaagt	13320
gtgtatcttg agtgtctgta tgggcgcata aacgtaagcg agacttccaa atggagcaaa	13380
cgagaagaga tctttaaagt attatagaag agctgggcag gaactattat gacgtaaagc	13440
cttgaccata ataaagacga ttctttgtcc ctctatacaa acatcttgca aagataccaa	13500
atattttcaa atcctactca ataaaaaatt aatgaataaa ttagtgtgtg tgcattatat	13560
atattaaaaa ttaagaatta gactaaataa agtggttcta aaaaaatatt aaagttgaaa	13620
tgtgcgtgtt gtgaattgtg ctctattaga ataattatga ctgtgtgcg tttcatattt	13680
taaaatagga aataaccaag aaagaaaaag taccatccag agaaaccaat tatatcaa	13740
caaataaaac aaccagcttc ggtgtgtgtg tgtgtgtgaa gctaagagtt gatgccattt	13800
aatctaaaaa ttttaaggtg tgtgtgtgga taaaatatta gaatgacaat tccccggaat	13860
tgcgtacgct taatccttg cagaaatcat gtcttcaggt ctaaccatt ggtcgaattc	13920
ttcagaggtc aagtaacca aagatagagc agcttctttc aaagtggtag cttccttgtg	13980
agccttcttg gcacacttg cagccttgtc gtaaccaatg tgagggttca aagcagtgc	14040
caacatcaaa gattcgttca tgatggagga gatcttcttt tcgttagctt caataccgac	14100
aacacagttc ttggtgaaag agatggaagc gtcagagatt aatctgatgg attggatcaa	14160
gttcttgatc atgactggtt taaagacatt caattcgaat tgaccgttg aaccagcaac	14220
agagatggca gtgttggttac ccatgacttg agcacaaacc atggtcatag cttcacattg	14280
agttgggttg accttacctg gcatgatgga agaacctggt tcgttttctg gtagagacaa	14340
ttcacctaaa ccacatcttg gaccagaacc caagtaacgg atatcggttg caatcttcat	14400
caaagaacaa gcaacggtgt tcaaagcacc gtgagcttca accaaagcgt cgtgagcagc	14460
caaagcttcg aatttgtttg gagcggctt gaatggtaaa ccagtgatgg aagcaatggc	14520
ttcagcaacc ttggcatcga aaccctttct ggtgttcaaa ccagtaccga cagcagtacc	14580
accttgagcc aagttgtata atctttccaa agtaccttga acacgagcaa taccgtaggt	14640

caattgttga gtgtaaccgg agaattcttg acctaaagtc aatggggtag catcttgcaa	14700
gtgggttcta ccaatcttga tgatgtgttc gaattcagca gatttggctt gcaaagcatc	14760
tctcaaagtg gtcaaagctg gaatcaatct accgtgaatt tcaacaacgg cagcaacgtg	14820
catggcagtt gggaaagtgt cgttgaaga ttgagacatg ttgacatgat cgtttgggtg	14880
gactggagcc ttggaacctt attcaccacc caacaattca atggctctgt tggagatgac	14940
ttcattgacg ttcattcttg tttgagtacc agaaccggtt tgccagacaa ccaatgggaa	15000
atggtcaatc aaagaacctt cgataacttc gtcagcagcc ttttggatgg cttcaccaac	15060
ctttgggtcc aaaccgtagg tcatgttgac ggtggcagca gccttcttca aaacaccgaa	15120
agctctgatt aatggttctg gcattctttc agttggacca ccaatgtcaa agttttgcaa	15180
agatctttga gtttgagcac ccagtaacg gtcagctgga acttgcaagt caccgaaggt	15240
atctctttca gctctgaatt tttgcaaagc agcagaagca gaggacattt tttgtttatg	15300
tatgtgtttt ttgtagtatt agatttaagc aagaaaagaa tacaacaaa aaattgaaa	15360
agattgattt agaattaaaa agaaaaatat ttacgtaaga agggaaaata gtaaatgttg	15420
caagttcact aaactcctaa attatgctgc cctttatatt ccctgttaca gcagccgagc	15480
caaagggtata taggctcctt tgcattagca tgcgtaacaa accacctgtc agtttcaacc	15540
gaggtggtat ccgagagaat tgtgtgattg ctttaattaa tttcggagaa tctcacatgc	15600
cactgaagat taaaaactgg atgccagaaa aggggtgtcc aggtgtaaca tcaatagagg	15660
aagctgaaaa gtcttagaac gggtaatctt ccaccaacct gatgggttcc tagatataat	15720
ctcgaagggg ataagtaggg tgataccgca gaagtgtctg aatgtattaa ggtcctcaca	15780
gtttaaatcc cgctcacact aacgtaggat tattataact caaaaaaatg gcattattct	15840
aagtaagtta aatatcgtta atctttaaac actatgtagt taggtctcgc gcccgattt	15900
aatggagga aatgagaaat gagaggtatg taaatagaaa tagactagct ccacttttaa	15960
gaattattta tgcaattaaa tacatgggtg accaaaagag cgggcggata cccgcgtcac	16020
cacaagcaga ataaaaggta aacctgaaat tgttttaaca taaaatgaaa aatgcttggt	16080
tgcaacccta tatagaatca taaaacattc gtgactataa aatgaataaa ctaaactatt	16140
ctaagaaaat gaaataaatg acaaaaaaac gtgttttttg gactagaagg cttaatcaaa	16200
agctcttatt cagaaacatc ttcattctga cctggccaca tgatgtcctt tctgatgaca	16260
gctctgatgg cagaaaccaa gacgaaaata aacatgatga tgacacatag ggacatagca	16320
gtggcaacac ccttgacacc tggagattcg aacatgttag ccaaagtgat ggtagccaag	16380
gtgaaaccag tgtttgggaa aacctggca aaccagttca aatggaaacc ctttgggtga	16440
gatctgacaa cagcaacaac agcgatacag aagaaccaga aagacaaagc ccataagaag	16500
atggcagcag agacagccaa gaacaacata acacgacctt caatgacagc gtgaggggtca	16560

ES 2 616 790 T3

ccgacaattt ggaagtcgtc tggtaaagcc ttggccatac cgaccaaagc caaagcgggtg	16620
aaagctggag gaccaacaca gatgaacata cctgggtctgt gttctggaga tggtaaacca	16680
acttccatca atctaccaat gtagtgagcg tacatcatga aggagatgga gaaacctaaa	16740
ccttggaag tgataccagc aataataatt ggaataccat cggaagctgg ttgaccagaa	16800
ccgatgacgg aggcgatagt accagacaac ataactggga aagctggcaa gatccaggat	16860
ggcatcatgg tgtgcaattc gtatttgtgg gtagcaaaga cgaaagagta ttgaccgaca	16920
gcagtgatca tggtaacaac acagtagatc cagaacaaaa cttgcaaaca cttggtgaac	16980
ttttcgttag catcatcacc gaaacacttg tacaaccag tgatcatggt agcaatggat	17040
aaccagaaag ttgggaaaaa caaaccttct ctgtcgtgac ccaaggattc ccacatgttc	17100
ttgtgcaaga tgaatctgat ggccatcaaa gaggtaacga taacaaagaa agccaagttc	17160
aaacagtaga caactctggc aatatctttc aaaccttga agtcgtgtgg ttggttgaca	17220
atcaacaaag ccaaaccacc acaggacatg gtcaaagtgt accaagccca ggtgaagtga	17280
cgtaatcttt ctctgatacc aactggacct ggcttttcga aagtgtggtt aacaccaatt	17340
tcagcttcat ggttgacgga aataccagag tcgtggttgg catgcttctt ggtttcgtgg	17400
tggaaagttt ccaagtcaga accagaagaa cctggcaaag aagtttcaac gttcattttg	17460
ttttagtgtt tgtgtgttga taagcagttg cttggttttt tatgaaaaat agctagaagg	17520
aataagggat tacaagagag atgttacaag aaagaagtaa aataaatttg attaatattg	17580
ccattatcaa aagctattta tatgttgaaa tcgtggagat catgtgtgcc agaaaaggcc	17640
acagtttccg gggagaggca taccttgagg tggctaggaa tcacggagac ctcttgactt	17700
gcagggtagg ctagctagaa ttaagtgagg tgacaagggt tccatacagt tttgaccttg	17760
agacgttgct acttacgatt tgcagtatgc aagtctcatg ctgcaaaca aagaggaccg	17820
ctcaggtaat cgctcaatta gtggacgtta tcaggggcgg gagaggcgaa agtggttttt	17880
ggtggtgtaa gttaaagtcg tccaaatatg caggtgtttg ggtgctatcc tagtgaagc	17940
tcggatcagt agataaccgg cctagaagcg gtatttttct ttttttttct tccttctttt	18000
tcgtcattat ttcaaacgct tttgcgtcaa gtaatgaata tctggcggtt ccgcggggcg	18060
cgccggatcc gggccgcata ggccactagt ggatctgatt cgaattctac cgttcgtata	18120
gcatacatta tacgaagta tgagctcgtt ttcgacactg gatggcggcg ttagtatcga	18180
atcgacagca gtatagcgac cagcattcac atacgattga cgcatgatat tactttctgc	18240
gcacttaact tcgcatctgg gcagatgatg tcgaggcgaa aaaaaatata aatcacgcta	18300
acatttgatt aaaatagaac aactacaata taaaaaaact atacaaatga caagttcttg	18360
aaaacaagaa tctttttatt gtcagtactg attagaaaaa ctcatcgagc atcaaatgaa	18420

ES 2 616 790 T3

actgcaat	ttt	attcatatca	ggattatcaa	taccatattt	ttgaaaaagc	cgtttctgta	18480
atgaaggaga	aaactcaccg	aggcagttcc	ataggatggc	aagatcctgg	tatcgggtctg		18540
cgattccgac	tcgtccaaca	tcaatacaac	ctattaattt	cccctcgtca	aaaataaggt		18600
tatcaagtga	gaaatcacca	tgagtgcga	ctgaatccgg	tgagaatggc	aaaagcttat		18660
gcatttcttt	ccagacttgt	tcaacaggcc	agccattacg	ctcgtcatca	aaatcactcg		18720
catcaaccaa	accgttattc	attcgtgatt	gcgcctgagc	gagacgaaat	acgcgatcgc		18780
tgttaaaagg	acaattacaa	acaggaatcg	aatgcaaccg	gcgcaggaac	actgccagcg		18840
catcaacaat	attttcacct	gaatcaggat	attcttctaa	tacctggaat	gctgttttgc		18900
cggggatcgc	agtggtgagt	aaccatgcat	catcaggagt	acggataaaa	tgcttgatgg		18960
tcggaagagg	cataaattcc	gtcagccagt	ttagtctgac	catctcatct	gtaacatcat		19020
tggcaacgct	acctttgcc	tgtttcagaa	acaactctgg	cgcacggggc	ttcccataca		19080
atcgatagat	tgtcgcacct	gattgcccga	cattatcgcg	agcccattta	tacctatata		19140
aatcagcatc	catgttgaa	tttaatcgcg	gcctcgaaac	gtgagtcttt	tccttacc		19200
tggttgttta	tgttcggatg	tgatgtgaga	actgtatcct	agcaagattt	taaaaggaag		19260
tatatgaaag	aagaacctca	gtggcaaatc	ctaacctttt	atatttctct	acagggg		19320
ggcgtgggga	caattcaacg	cgtctgtgag	gggagcggtt	ccctgctcgc	aggtctgcag		19380
cagaggagccg	taatttttgc	ttcgcgccgt	gcggccatca	aatgtatgg	atgcaaatga		19440
ttatacatgg	ggatgtatgg	gctaaatgta	cgggcgacag	tcacatcatg	cccctgagct		19500
gcgcacgtca	agactgtcaa	ggagggtatt	ctgggcctcc	atgtcgtctg	cgggtgacc		19560
cggcggggac	gaggcaagct	aaacagatct	ataacttcgt	atagcataca	ttatacgaac		19620
ggtagaattc	gtcgacctgc	agcgtacgaa	gcttcagctg	gcggcc			19666

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir un ácido dicarboxílico, que comprende fermentar una célula fúngica en un recipiente que comprende un medio adecuado de fermentación, que comprende añadir un gas que comprende del 21 al 35% v/v de oxígeno y menos del 0,1% v/v de dióxido de carbono al medio de fermentación, y mantener una presión parcial promedio de dióxido de carbono de al menos 35 kPa (0,35 bar) en el medio de fermentación, y producir el ácido dicarboxílico, en el que el gas es aire enriquecido con oxígeno.
2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la presión parcial promedio de dióxido de carbono es entre aproximadamente 35 y aproximadamente 100 kPa (0,35 y 1,0 bar).
3. Proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la presión parcial promedio de dióxido de carbono es entre aproximadamente 35 y aproximadamente 80 kPa (0,35 y 0,8 bar).
4. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el recipiente comprende una presión del espacio vacío entre aproximadamente 105 a aproximadamente 500 kPa (1,05 a 5 bar) absoluta.
5. Proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la presión del espacio vacío es entre aproximadamente 150 y aproximadamente 250 kPa (1,5 y 2,5 bar) absoluta.
6. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el gas comprende de aproximadamente el 22 a aproximadamente el 32% v/v de oxígeno.
7. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende añadir el gas a un caudal entre aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,05 metro cúbico/metro cúbico/min.
8. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de fermentación se agita.
9. Proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el medio de fermentación se agita a una potencia de entrada entre aproximadamente 0,070 a aproximadamente 0,26 kW/metro cúbico.
10. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la célula fúngica es una levadura.
11. Proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la levadura es una levadura que pertenece a *Saccharomyces cerevisiae*.
12. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula fúngica es una célula fúngica modificada genéticamente que comprende una modificación genética de un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen que codifica una piruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, una malato deshidrogenasa, una fumarasa, una fumarato reductasa, una isocitrato liasa, una malato sintasa y un transportador de ácido dicarboxílico.
13. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido dicarboxílico es ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico o ácido adípico.
14. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido dicarboxílico se recupera del medio de fermentación.

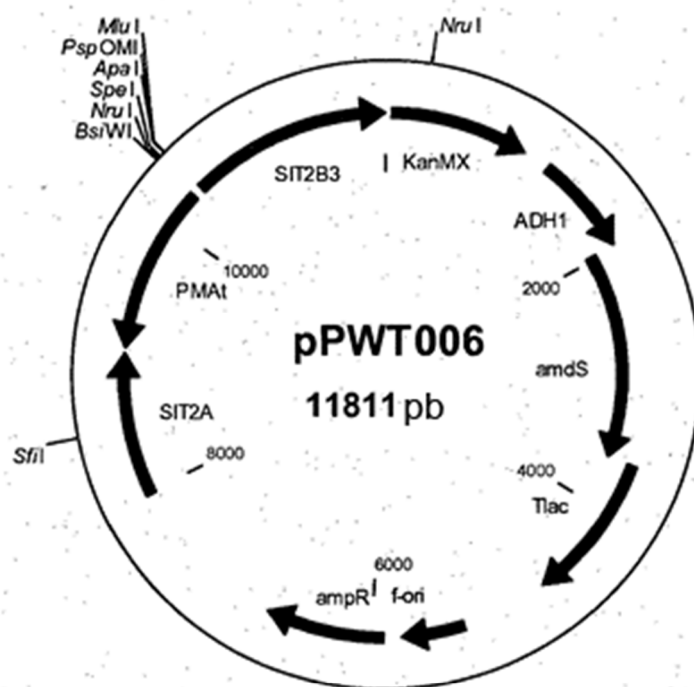


Fig.1

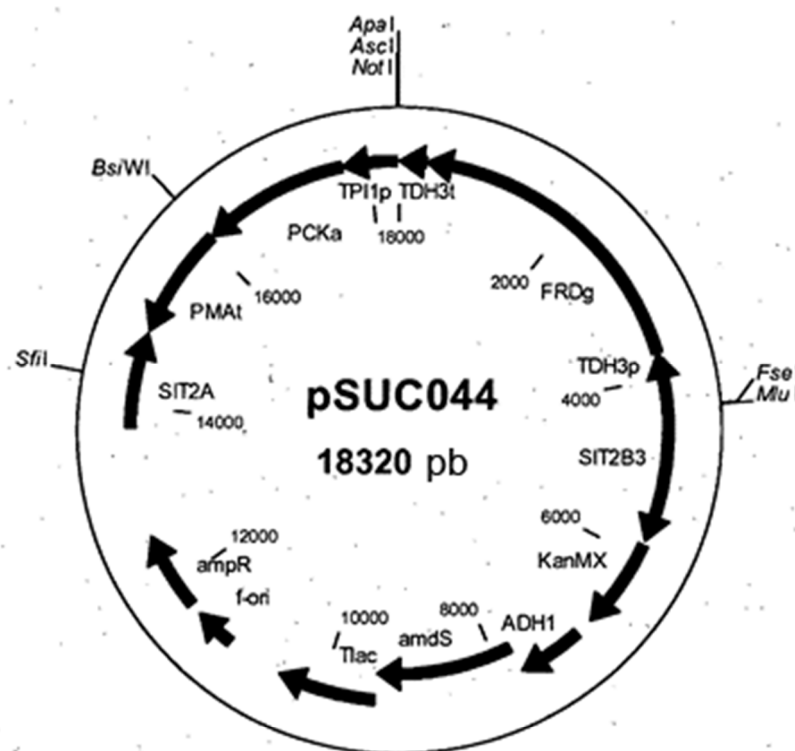


Fig.2

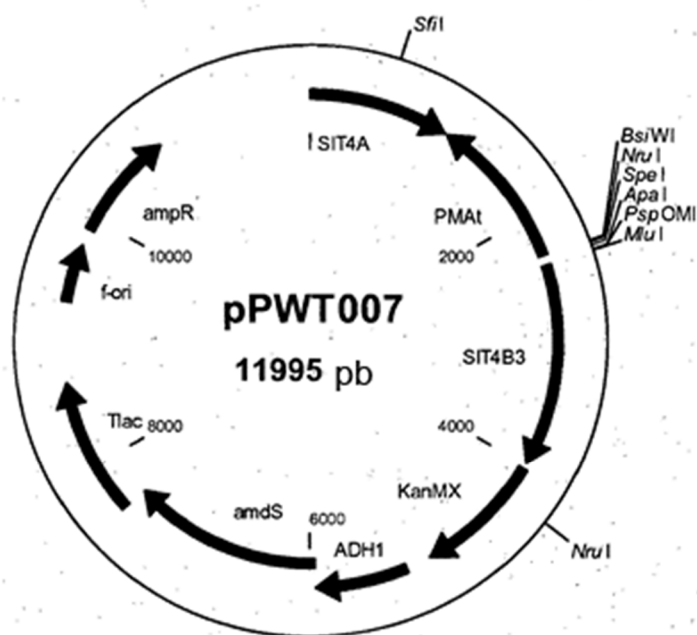


Fig.3

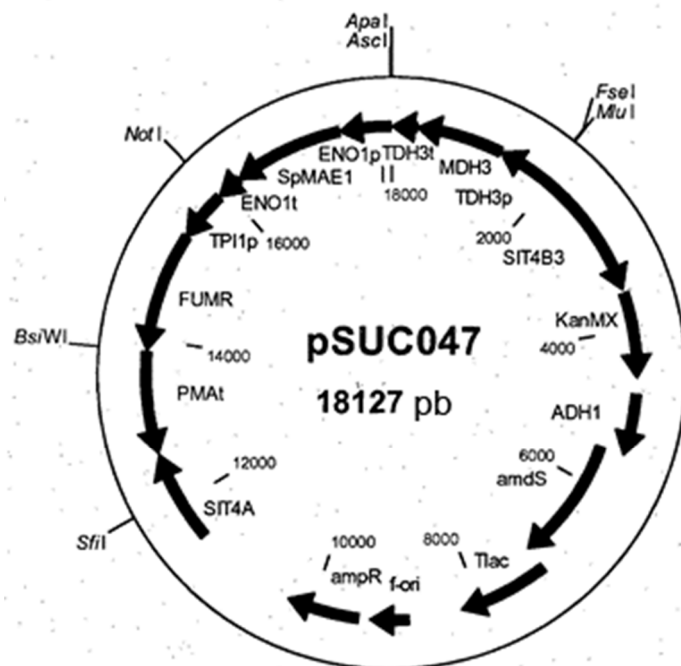


Fig.4

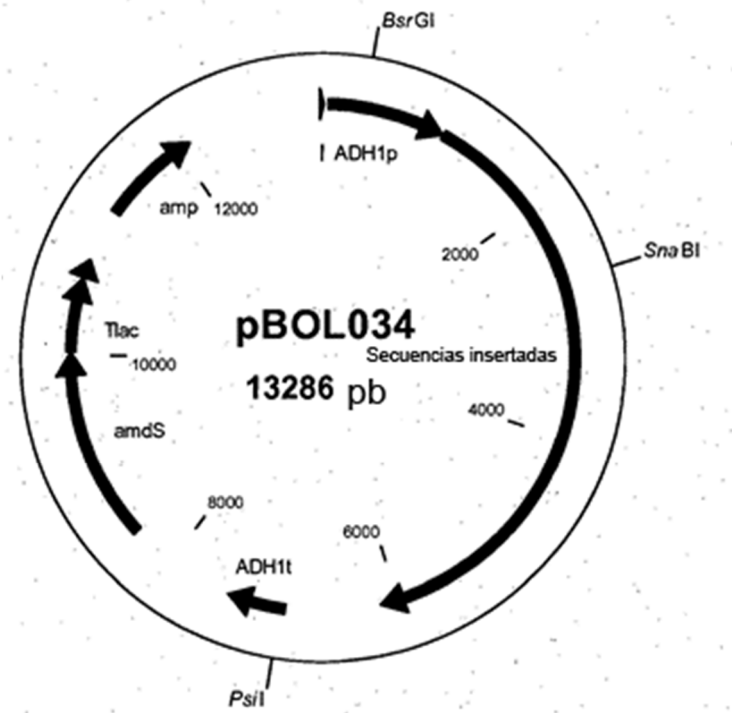


Fig.5

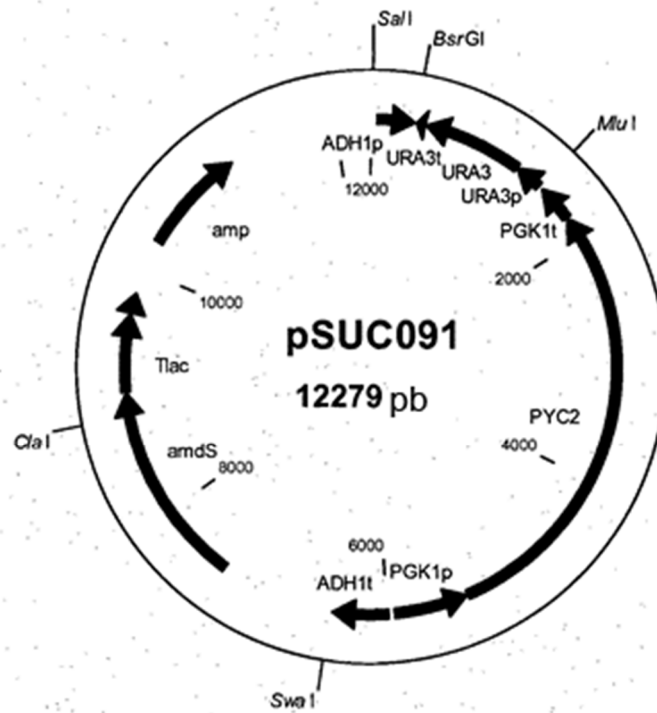


Fig.6

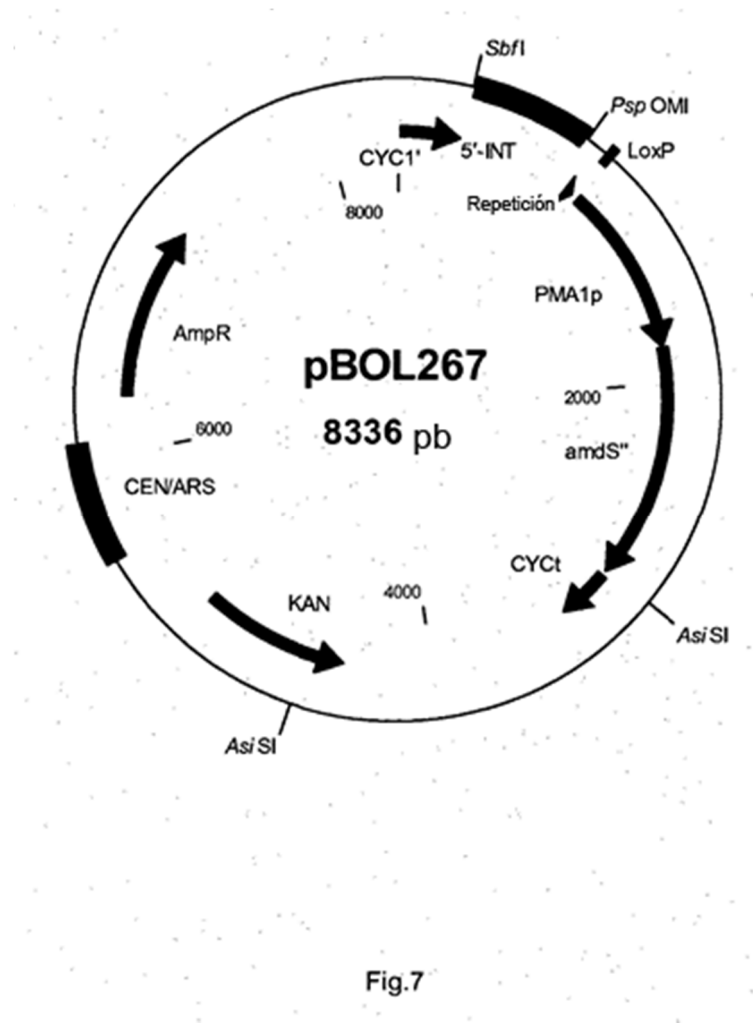


Fig.7

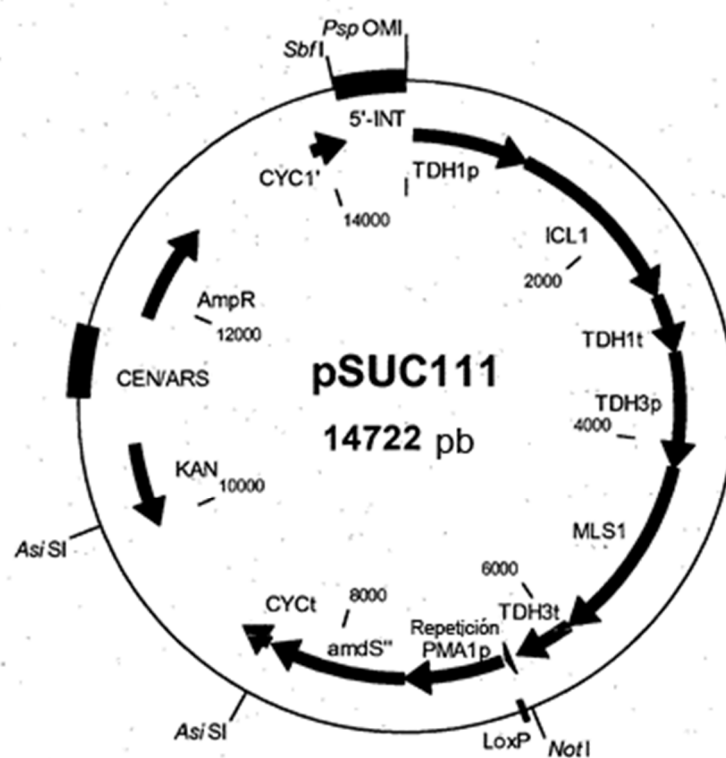


Fig.8

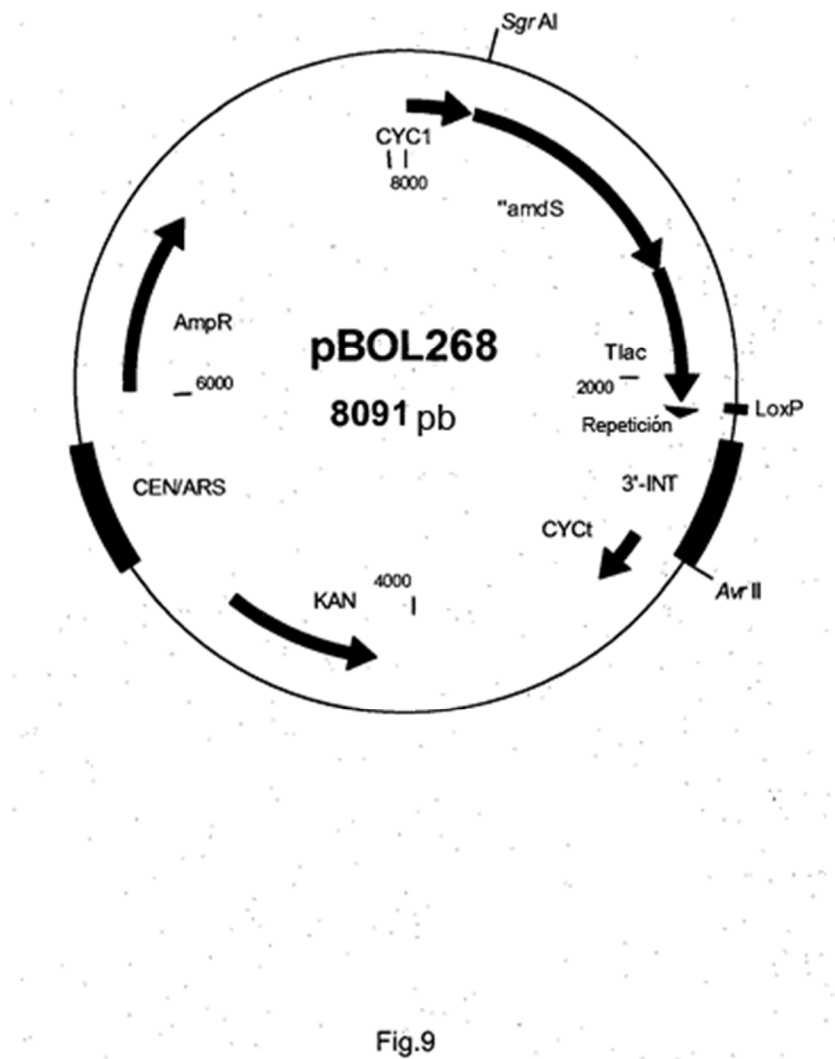


Fig.9

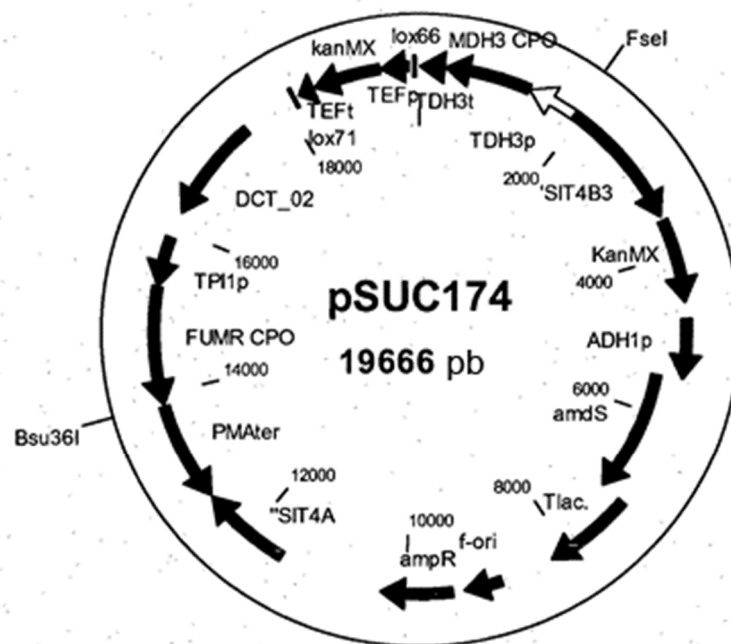


Fig.10

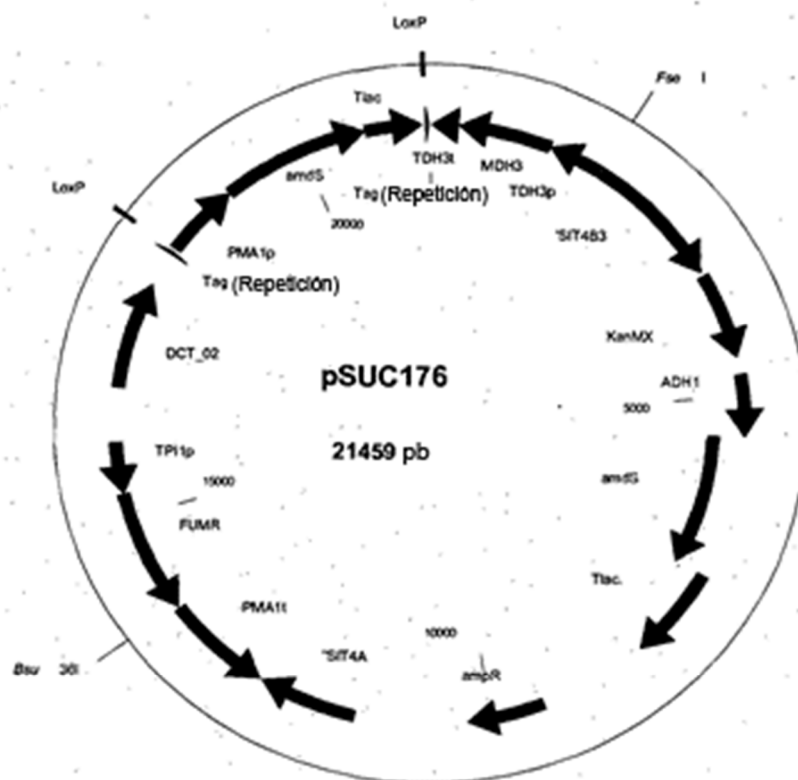


Fig.11

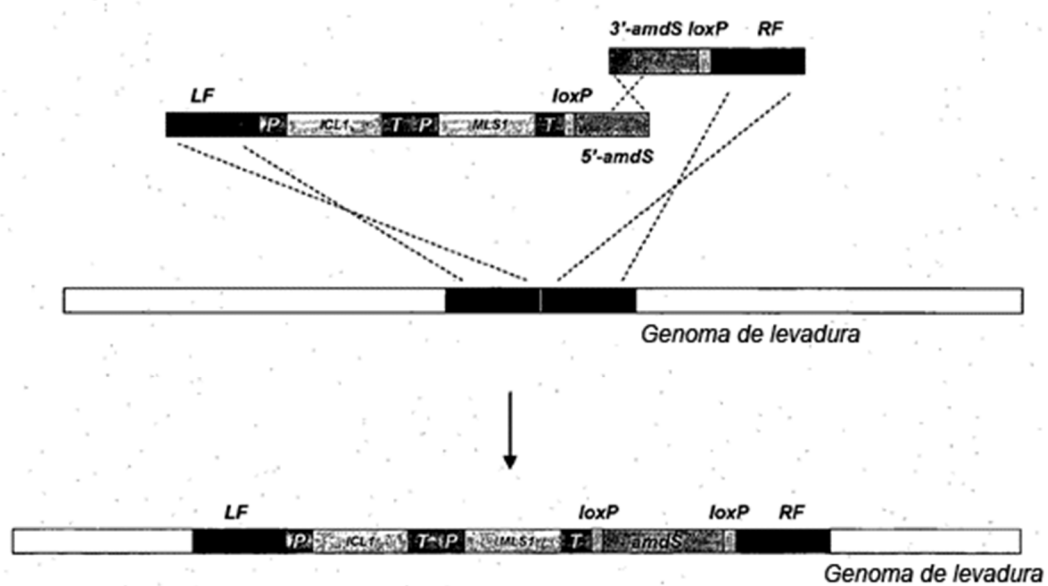


Fig.12

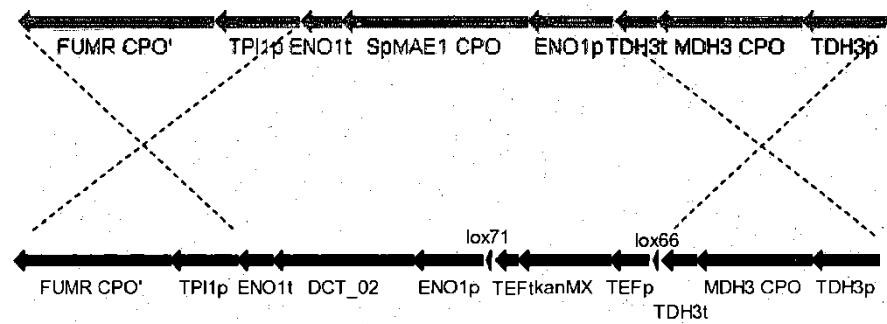


Fig.13