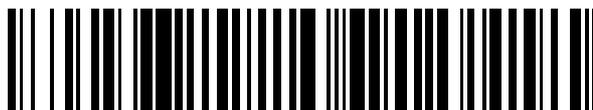


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 621**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2012 PCT/NZ2012/000022**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12115527**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2012 E 12749472 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2678432**

54 Título: **Microorganismos recombinantes y sus usos**

30 Prioridad:

**25.02.2011 US 201161446832 P**

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

**04.03.2019**

73 Titular/es:

**LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED (100.0%)  
24 Balfour Road Parnell  
Auckland 1052, NZ**

72 Inventor/es:

**SIMPSON, SEAN DENNIS;  
KOEPE, MICHAEL;  
LIEW, FUNGMIN y  
CHEN, WENDY YITING**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 702 621 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

Microorganismos recombinantes y sus usos

**Campo**

5 La presente invención se refiere a métodos para la producción de acetona, isopropanol y/o un precursor de acetona y/o isopropanol mediante fermentación microbiana de sustratos que comprenden monóxido de carbono y microorganismos modificados genéticamente para su uso en tales métodos.

**Antecedentes**

10 Se sabe que algunos microorganismos tales como *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium beijerinckii* producen acetona o isopropanol como subproductos principales durante la fermentación del butanol (fermentación ABE o IBE) [George HA, Johnson JL, Moore WEC, Holdeman LV, Chen JS: Acetone, isopropanol, and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. Appl Environ Microbiol 45: 1160-1163]. Sin embargo, todos estos organismos cuentan con sustratos basados en azúcar o almidón. Los organismos acetogénicos tales como los microorganismos íntimamente relacionados *Clostridium autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y *C. ragsdalei* son capaces de crecer quimioautótrofamente sobre gases que contienen CO o CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> como única fuente de energía y carbono y sintetizar productos tales como acetato, etanol, o 2,3-butanodiol, pero no acetona ni isopropanol [Munasinghe PC, Khanal SK: Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. Bioresource Technol 2010, 5013-22].

20 Recientemente, se informó sobre la producción de isopropanol en un estudio sobre *Clostridium ragsdalei* (*Clostridium* cepa P11) en un fermentador a escala piloto de 100 L de gas de síntesis derivado de pasto varilla [Kundiyan DK, Huhnke RL, Wilkins MR: Syngas fermentation in a 100-L pilot scale fermentor: Design and process considerations. J Biosci Bioeng 2010, 109: 492-498]. No obstante, un estudio relacionado del mismo laboratorio demostró que esto se debía a una contaminación en el gas de síntesis utilizado ya que se hacía pasar a través de una mezcla de depuración que contenía 20 % de acetona [Ramachandriya KD: Effect of biomass generated producer gas, methane and physical parameters on producer gas fermentations by *Clostridium* strain P11. Masters thesis, Oklahoma State University 2009]. Los autores también observaron que la producción de isopropanol puede ser el resultado de la reducción del ácido propiónico en lugar de acetona. Los experimentos llevados a cabo por los autores de la presente invención con *Clostridium ragsdalei* (*Clostridium* cepa P11) y también con *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii* nunca han mostrado producción de acetona, isopropanol, o ácido propiónico.

30 El coste de muchas materias primas carbohidratadas para la producción de productos químicos tales como acetona e isopropanol está condicionado por su valor como alimento para seres humanos o pienso para animales, y la plantación de cultivos productores de almidón o sacarosa para semejante producción no es económicamente sostenible en todas las geografías. Por lo tanto, resulta interesante desarrollar tecnologías para convertir las fuentes de carbono de coste más bajo y/o más abundantes en productos químicos agrícolas útiles tales como acetona e isopropanol.

35 El CO es el principal subproducto rico en energía libre de la combustión incompleta de materiales orgánicos tales como el carbón o el aceite y los productos derivados del aceite. Por ejemplo, se ha informado de que la industria del acero en Australia produce y libera a la atmósfera más de 500.000 toneladas de CO anualmente.

40 El documento WO 2010/121849 A1 describe células y métodos para la producción de acetona. Este documento también hace referencia a: un documento que resume la producción microbiana de acetona, butanol e isopropanol (Biotechnology 6:229-268); desarrollos de la fermentación clostridial de acetona, butanol e isopropanol (Appl Microbiol Biotechnol .49: 639-648); y cepas de *Clostridium ljungdahlii* específicas PETC, ERI-2 y O-52 (documentos WO 98/00558 y WO 00/68407).

Un objeto de la invención es superar una o más de las desventajas de la técnica anterior, o al menos proporcionar al público una opción útil.

**45 Compendio de la invención**

La invención proporciona generalmente métodos para la producción de isopropanol mediante fermentación microbiana de sustratos que comprenden CO.

El alcance de la invención se define por medio de las reivindicaciones.

50 En un primer aspecto, la invención proporciona un método para la producción de isopropanol mediante fermentación microbiana, que comprende fermentar un sustrato que comprende CO utilizando un microorganismo acetogénico carboxidotrófico recombinante capaz de producir isopropanol mediante fermentación de CO,

en donde el microorganismo expresa las enzimas: acetil coenzima A acetiltransferasa (tiolasa; ThIA; E.C. 2.3.1.9); acetoacetil-CoA:acetato coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA; EC 2.8.3.9); y acetoacetil-CoA:acetato coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB; EC 2.8.3.9); y

en donde el microorganismo expresa adicionalmente la enzima:

- a. acetoacetato descarboxilasa (Adc; EC 4.1.1.4); o
- b. alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD; EC4.1.1.74);

5 en donde las enzimas no están naturalmente presentes en un microorganismo parental del cual deriva el microorganismo recombinante.

En un segundo aspecto, la invención proporciona el método de la parte (a) del primer aspecto, en donde el microorganismo expresa adicionalmente la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh; EC 1.1.1.2).

En un tercer aspecto, la invención proporciona el método del segundo aspecto, en donde Adh se expresa exógenamente.

10 En un cuarto aspecto, la invención proporciona el método de la parte (a) del primer aspecto, en donde el microorganismo expresa adicionalmente la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh2; EC 1.1.1.1).

En un quinto aspecto, la invención proporciona el método del cuarto aspecto, en donde Adh2 se expresa exógenamente.

15 En un sexto aspecto, la invención proporciona el método de la parte (a) del primer aspecto, en donde el microorganismo expresa adicionalmente las enzimas alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD; EC4.1.1.74) y alcohol deshidrogenasa (Adh2; EC 1.1.1.1).

En un séptimo aspecto, la invención proporciona el método del sexto aspecto, en donde Adh2 se expresa exógenamente.

20 En un octavo aspecto, la invención proporciona el método del primer aspecto, en donde el microorganismo parental se selecciona del grupo de bacterias acetogénicas carboxidotrofas que comprende: *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Butyribacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

25 En un noveno aspecto, la invención proporciona el método del sexto aspecto, en donde el microorganismo parental es *Clostridium autoethanogenum* DSM23693 o *Clostridium ljungdahlii* DSM13528 (o ATCC55383).

En un décimo aspecto, la invención proporciona el método de uno cualquiera de los aspectos anteriores, en donde la enzima:

- a. ThIA está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 18; y
- 30 b. CtfA está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 19; y
- c. CtfB está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 20 y/o
- d. Adc está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 21; y/o
- e. KivD está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 71; y/o
- f. Adh está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 2, 3 o 4; y/o
- 35 g. Adh2 está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 75.

En un undécimo aspecto, la invención proporciona el método de uno cualquiera de los aspectos anteriores, en donde:

- a. el sustrato gaseoso que comprende CO se produce mediante un procedimiento industrial seleccionado del grupo que consiste en fabricación de productos de metal ferroso, fabricación de productos no ferrosos, procedimientos de refinado de petróleo, gasificación de carbón, gasificación de biomasa, producción energía eléctrica, producción de negro de humo, y fabricación de coque; o
- 40 b. el sustrato gaseoso comprende de 20% a 70% en volumen de CO.

También se puede comentar ampliamente que la invención consiste en las partes, elementos y características a los que se hace referencia o indicados en la memoria descriptiva de la solicitud, individual o colectivamente, en cualquiera o todas las combinaciones de dos o más de dichas partes, elementos o características.

45

**Breve descripción de las figuras**

Estos y otros aspectos de la presente invención, que deberían considerarse en todos sus nuevos aspectos, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, que se proporciona solo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 5 La Fig. 1 muestra el alineamiento de aminoácidos de la alcohol deshidrogenasa novedosa de *C. autoethanogenum* (CAU), *C. ljungdahlii* (CU), y *C. ragsdalei* (CRA) con la alcohol secundario deshidrogenasa de *C. beijerinckii* cepa NRRL-B593.
- La Fig. 2 muestra la expresión del gen de la alcohol deshidrogenasa novedosa de *Clostridium autoethanogenum* DSM23693 durante una ronda de fermentación típica, así como la expresión de genes controlados por el promotor del operón de Wood-Ljungdahl, el promotor del operón F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPasa, el promotor del operón complejo Rnf, y el promotor de Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa. Se compararon los niveles de ARNm de más de 200 genes de interés.
- 10 La Fig. 3 muestra la expresión de acetona del plásmido pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-adc.
- La Fig. 4 muestra la ruta para la producción de acetona e isopropanol a partir de gases que contienen CO o CO/H<sub>2</sub> en *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii* modificados genéticamente que portan el plásmido pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-adc.
- 15 La Fig. 5 muestra los resultados de la secuenciación del plásmido de expresión de acetona pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-adc.
- La Fig. 6 ilustra el plásmido de metilación diseñado.
- 20 La Fig. 7 muestra la detección de *ctfAB-adc* (2,2 kb) a partir de PCR de plásmidos aislados de *C. autoethanogenum* DSM23693 y *C. ljungdahlii* DSM13528 transformados. Escala = escala de ADN 1 KB Plus (Invitrogen); 1= control sin molde; 2= plásmido aislado de *C. autoethanogenum*; 3= plásmido aislado de *C. ljungdahlii*; 4= pMTL85147-thIA-ctfAB-adc original (control positivo).
- La Fig. 8 muestra el resultado de experimentos de crecimiento con *C. autoethanogenum* DSM23693 + pMTL85147-thIA-ctfAB-adc sobre gas de fábricas de acero.
- 25 La Fig. 9 muestra el resultado de experimentos de crecimiento con *C. ljungdahlii* DSM13528 + pMTL85147-thIA-ctfAB-adc sobre gas de fábricas de acero.
- La Fig. 10 muestra el resultado de GC que confirma la producción de acetona con *C. autoethanogenum* DSM13528 + pMTL85147-thIA-ctfAB-adc (superior) y *C. ljungdahlii* DSM13528 + pMTL85147-thIA-ctfAB-adc (inferior) a partir de gas de fábricas de acero.
- 30 La Fig. 11 muestra el resultado de GC que confirma la producción de acetona con *C. autoethanogenum* DSM23693 + pMTL85147-thIA-ctfAB-adc a partir de gas de síntesis.
- La Fig. 12 muestra la toxicidad de acetona sobre cultivos de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- La Fig. 13 muestra la toxicidad de isopropanol sobre cultivos de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- 35 La Fig. 14 muestra SEQ\_ID NO 1: Secuencia de aminoácidos de la alcohol deshidrogenasa novedosa de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* y *C. ragsdalei*.
- La Fig. 15 muestra SEQ\_ID NO 2: Secuencia de ácido nucleico de la alcohol deshidrogenasa novedosa de *C. autoethanogenum*.
- 40 La Fig. 16 muestra SEQ\_ID NO 3: Secuencia de ácido nucleico de la alcohol deshidrogenasa novedosa de *C. ljungdahlii*.
- La Fig. 17 muestra SEQ\_ID NO 4: Secuencia de ácido nucleico de la alcohol deshidrogenasa novedosa de *C. ragsdalei*.
- La Fig. 18 muestra SEQ\_ID NO 18: Secuencia de ácido nucleico del gen de Tiolasa (*thIA*) de *C. acetobutylicum* ATCC824.
- 45 La Fig. 19 muestra SEQ\_ID NO 19: Secuencia de ácido nucleico del gen de Acetoacetil-CoA:acetato Coenzima A transferasa A (*ctfA*) de *C. beijerinckii* NCIMB8052.
- La Fig. 20 muestra SEQ\_ID NO 20: Secuencia de ácido nucleico del gen de Acetoacetil-CoA:acetato Coenzima A transferasa B (*ctfB*) de *C. beijerinckii* NCIMB8052.

- La Fig. 21 muestra SEQ\_ID NO 21: Secuencia de ácido nucleico del gen de Acetoacetato descarboxilasa (*adc*) de *C. beijerinckii* NCIMB8052.
- La Fig. 22 muestra SEQ\_ID NO 22: Secuencia de ácido nucleico del promotor del agrupamiento Wood-Ljungdahl ( $P_{WL}$ ) de *C. autoethanogenum*.
- 5 La Fig. 23 muestra SEQ\_ID NO 34: Secuencia de aminoácidos del gen de la metiltransferasa de Tipo II diseñado.
- La Fig. 24 muestra SEQ\_ID NO 35: Secuencia de ácido nucleico del gen de la metiltransferasa de Tipo II diseñado.
- La Fig. 25 muestra SEQ\_ID NO 38: Secuencia de aminoácidos de la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593.
- 10 La Fig. 26 muestra SEQ\_ID NO 39: Secuencia de ácido nucleico de la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593.
- La Fig. 27 muestra SEQ\_ID NO 40: Secuencia de aminoácidos de la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP de *Thermoanaerobacter brockii* ATCC 53556.
- La Fig. 28 muestra SEQ\_ID NO 41: Secuencia de ácido nucleico de la alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobacter brockii*.
- 15 La Fig. 29 muestra SEQ\_ID NO 42: Secuencia de aminoácidos de la Tiolasa ThIA de *C. acetobutylicum* ATCC824.
- La Fig. 30 muestra SEQ\_ID NO 43: Secuencia de aminoácidos de la Acetoacetil-CoA:acetato Coenzima A transferasa A CtfA de *C. beijerinckii* NCIMB8052.
- La Fig. 31 muestra SEQ\_ID NO 44: Secuencia de aminoácidos de la Acetoacetil-CoA:acetato Coenzima A transferasa A CtfB de *C. beijerinckii* NCIMB8052.
- 20 La Fig. 32 muestra SEQ\_ID NO 45: Secuencia de aminoácidos de la Acetoacetato descarboxilasa Adc de *C. beijerinckii* NCIMB8052.
- La Fig. 33 muestra SEQ\_ID NO 46: Secuencia de ácido nucleico del plásmido de expresión que contiene la alcohol deshidrogenasa pMTL85147-thIA-ctfAB-*adc* novedosa.
- 25 La Fig. 34 muestra SEQ\_ID NO 47: Secuencia de ácido nucleico de operón de Acetoacetil-CoA:acetato Coenzima A transferasa A (*ctfA*), acetoacetil-CoA:acetato Coenzima A transferasa B (*ctfB*), y acetoacetato descarboxilasa (*adc*) de *C. beijerinckii*.
- La Fig. 35 muestra SEQ\_ID NO 48: Secuencia de ácido nucleico del plásmido de expresión que contiene alcohol deshidrogenasa pMTL85147-thIA-ctfAB-*adc*-*adh* novedosa.
- La Fig. 36 muestra SEQ\_ID NO 49: Secuencia de ácido nucleico del plásmido de metilación diseñado.
- 30 La Fig. 37 muestra SEQ\_ID NO 50: Secuencia de ácido nucleico del promotor *lac*.
- La Fig. 38 muestra SEQ\_ID NO 51: Secuencia de ácido nucleico de la región promotora del operón  $F_1F_0$  ATPasa de *Clostridium autoethanogenum*.
- La Fig. 39 muestra SEQ\_ID NO 52: Secuencia de ácido nucleico de la región promotora del operón Rnf de *Clostridium autoethanogenum*.
- 35 La Fig. 40 muestra SEQ\_ID NO 53: Secuencia de ácido nucleico de la región promotora de Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa de *Clostridium autoethanogenum*.
- La Fig. 41 muestra los resultados de la secuenciación del plásmido de expresión que contiene la alcohol deshidrogenasa pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-*adc*-*adh* novedosa.
- 40 La Fig. 42 muestra los resultados de la producción de acetona e isopropanol con el plásmido de control que porta *E. coli* XL-1 Blue MRF' Kan (pMTL85147), el plásmido de expresión de acetona (pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-*adc*), y el plásmido de expresión de acetona que incluye la alcohol deshidrogenasa novedosa (pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-*adc*-*adh*).
- La Fig. 43 muestra el plásmido de expresión que contiene la alcohol deshidrogenasa pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-*adc*-*adh* novedosa.
- 45 La Fig. 44 muestra SEQ\_ID NO 56: Secuencia de ácido nucleico del promotor de la agrupación de Wood-Ljungdahl ( $P_{WL}$ ) de *C. ljungdahlii*.

- La Fig. 45 muestra SEQ\_ID NO 57: Secuencia de ácido nucleico del promotor de la agrupación de Wood-Ljungdahl (P<sub>WL</sub>) de *C. ragsdalei*.
- La Fig. 46 muestra SEQ\_ID NO 58: Secuencia de ácido nucleico de la región promotora del operón F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPasa de *Clostridium ljungdahlii*.
- 5 La Fig. 47 muestra SEQ\_ID NO 59: Secuencia de ácido nucleico de la región promotora del operón F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPasa de *Clostridium ragsdalei*.
- La Fig. 48 muestra SEQ\_ID NO 60: Secuencia de ácido nucleico de la región promotora del operón complejo Rnf de *Clostridium ljungdahlii*.
- 10 La Fig. 49 muestra SEQ\_ID NO 61: Secuencia de ácido nucleico de la región promotora del operón complejo Rnf de *Clostridium ragsdalei*.
- La Fig. 50 muestra SEQ\_ID NO 62: Secuencia de ácido nucleico de la región promotora de la Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa de *Clostridium ljungdahlii*.
- La Fig. 51 muestra SEQ\_ID NO 63: Secuencia de ácido nucleico de la región promotora de la Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa de *Clostridium ragsdalei*.
- 15 La Fig. 52 muestra el gráfico de amplificación por qRT-PCR que confirma la amplificación de sondas para genes heterólogos *thIA*, *ctfA*, *ctfB*, y *adc* en *Clostridium autoethanogenum* que alberga el plásmido pMTL85147-*thIA*-*ctfAB*-*adc*.
- La Fig. 53 muestra el gráfico de amplificación por qRT-PCR que confirma la amplificación de sondas para los genes heterólogos *thIA*, *ctfA*, *ctfB*, y *adc* en *Clostridium ljungdahlii* que alberga el plásmido pMTL85147-*thIA*-*ctfAB*-*adc*.
- 20 La Fig. 54 muestra SEQ\_ID NO 73: Secuencia de aminoácidos de la alfa-cetoisovalerato descarboxilasa KivD de *Lactococcus lactis* KF147 y SEQ\_ID NO 72 Secuencia de ácido nucleico de la Alfa-cetoácido descarboxilasa (*kivd*).
- La Fig 55 muestra SEQ\_ID NO 76: Secuencia de codones optimizados de Alfa-cetoácido descarboxilasa (*kivd*), SEQ\_ID NO 75: Secuencia de aminoácidos de la alcohol deshidrogenasa *Adh2* de *Saccharomyces cerevisiae* y SEQ\_ID NO 74: Secuencia de ácido nucleico de la Alcohol deshidrogenasa (*adh2*).
- 25 La Fig 56 muestra SEQ\_ID NO 78: Operón sintético de Alfa-cetoácido descarboxilasa (*kivd*) de codones optimizados y Alcohol deshidrogenasa (*Adh2*) incluyendo la secuencia espaciadora con el sitio de unión al ribosoma, flanqueado por *NdeI* y *KpnI* y SEQ\_ID NO 77: Secuencia de codones optimizados de la Alcohol deshidrogenasa (*Adh2*).
- La Fig 57 muestra SEQ\_ID NO 82: Secuencia de ácido nucleico del vector lanzadera de *E. coli*-*Clostridium* pMTL 85245 y SEQ\_ID NO 79: Secuencia de ácido nucleico del promotor de Fosfo-transacetilasa Acetato quinasa de *C. autoethanogenum*,
- 30 La Fig 58 muestra SEQ\_ID NO 83: Secuencia de ácido nucleico del plásmido de expresión pMTL85245-*kivd*-*adh2*
- La Fig 59 muestra SEQ\_ID NO 84: Secuencia de ácido nucleico del plásmido de expresión pMTL85245-*kivd*
- La Fig 60 muestra SEQ\_ID NO 93: Secuencia de ácido nucleico del plásmido de expresión pMTL85245-P-*thI*-*ctfAB*-P-*kivd*
- 35 La Fig 61 muestra SEQ\_ID NO 98: Secuencia de ácido nucleico del plásmido de expresión pMTL83147-*thIA*-*ctfAB*-*adc*-*adh2*.
- La Fig 62 muestra SEQ\_ID NO 101: Secuencia de ácido nucleico del plásmido de expresión pMTL83147-*thIA*-*ctfAB*-*adc*-P-*kivd*-*adh2*.
- La Fig 63 muestra el plásmido de expresión de acetona pMTL85245-*kivd*-*adh2*
- 40 La Fig 64 muestra el plásmido de expresión de acetona pMTL85245-*kivd*
- La Fig 65 muestra el resultado de la GC que confirma la producción de acetona e isopropanol con *C. autoethanogenum* DSM23693 como cepa de control (superior) *C. autoethanogenum* DSM23693 + pMTL85245-*kivd*-*adh2* (inferior) de gas de fábricas de acero que contiene CO.
- 45 La Fig 66 muestra el resultado de la GC que confirma la producción de acetona e isopropanol con *C. autoethanogenum* DSM23693 + pMTL85245-*kivd* de gas de fábricas de acero que contiene CO.
- La Fig 67 muestra el plásmido de expresión de acetona pMTL85147-*thIA*-*ctfA*-*ctfB*-*adc*-P-*kivd*

La Fig 68 muestra el plásmido de expresión de acetona pMTL83147-thIA-ctfA-ctfB-adc-adh. La Fig 69 muestra el plásmido de expresión de acetona pMTL83147-thIA-ctfA-ctfB-adc-P-kivd-adh

La Fig 70 muestra el resultado de la GC que confirma la producción de acetona e isopropanol con *C. autoethanogenum* DSM23693 (superior) y *C. autoethanogenum* DSM23693 + pMTL85245-Pwl-thIA-ctfAB-kivd de gas de fábricas de acero que contiene CO.

La Fig 71 muestra el resultado de la GC que confirma la producción de acetona e isopropanol con *C. autoethanogenum* DSM23693 + pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-adh2 de gas de fábricas de acero que contiene CO.

La Fig 72 muestra el resultado de la GC que confirma la producción de acetona e isopropanol con *C. autoethanogenum* DSM23693 + pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-P-kivd-adh2 de gas de fábricas de acero que contiene CO.

La Fig 73 muestra combinaciones de genes sometidas a prueba de la ruta Clostridial y Alfa-cetoácido descarboxilasa Kivd de codones optimizados de *L. lactis* y Alcohol deshidrogenasa Adh2 de *S. cerevisiae* expresadas heterológicamente en *E. coli* y *C. autoethanogenum*.

La Fig 74 muestra la conversión completa de acetona en isopropanol a elevadas concentraciones y tasas cuando se introducen en un cultivo continuo estable de *C. autoethanogenum* DSM23693 con gas de fábricas de acero que contiene CO como sustrato.

### **Descripción detallada de la invención**

A continuación se proporciona una descripción de la presente invención, que incluye realizaciones preferidas de la misma, proporcionadas en términos generales. La invención se elucida adicionalmente en la descripción proporcionada bajo el encabezado "Ejemplos" más adelante en la presente memoria, que proporciona datos experimentales que respaldan la invención, ejemplos específicos de diferentes aspectos de la invención y medios ilustrativos para llevar a cabo la invención.

La producción de acetona y/o isopropanol mediante fermentación microbiana de los sustratos que comprenden CO no había sido referida anteriormente. Los autores de la presente invención han demostrado ahora (entre otras cosas), por medio de la modificación genética, la producción de acetona e isopropanol en especies de bacterias acetogénicas carboxidotrofas capaces de utilizar CO como fuente de carbono y energía. Los autores de la presente invención también han sido capaces de demostrar sorprendentemente la conversión enzimática natural de acetona en isopropanol en presencia de gases que contienen CO por medio de especies acetogénicas carboxidotrofas muy estrechamente relacionadas *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y *C. ragsdalei*. Se identificó una alcohol deshidrogenasa novedosa, que se mostró que era expresada constitutivamente a un elevado nivel durante una ronda de fermentación normal con *C. autoethanogenum* y era capaz de convertir la acetona en isopropanol a altas concentraciones y razones. Los autores de la presente invención también han descubierto dos genes que sorprendentemente confieren actividad hacia acetona e isopropanol en *C. autoethanogenum*. No se había informado previamente que estos genes, una alfa-cetoácido descarboxilasa (Kivd) de *Lactococcus lactis* y una alcohol deshidrogenasa (Adh2) de *Saccharomyces cerevisiae* confirieran actividad hacia acetona o isopropanol o cualquiera de sus precursores, en lugar de convertir los aminoácidos precursores en alcoholes de cadena ramificada. Los autores de la presente invención demostraron la producción de acetona e isopropanol a partir de CO en *C. autoethanogenum* utilizando varias combinaciones diferentes de genes y enzimas.

Por consiguiente, la invención proporciona, por ejemplo, los métodos para la producción de acetona, isopropanol y/o precursores de acetona y/o isopropanol mediante fermentación microbiana de sustratos que comprenden CO, microorganismos modificados genéticamente para su uso en tales métodos, ácidos nucleicos adecuados para la preparación de microorganismos modificados genéticamente y alcohol deshidrogenasas novedosas y ácidos nucleicos que las codifican.

Como se menciona en la presente memoria, un "caldo de fermentación" es un medio de cultivo que comprende al menos un medio nutriente y células bacterianas.

Como se menciona en la presente memoria, un microorganismo lanzadera es un microorganismo en el que se expresa una enzima metiltransferasa y es distinto del microorganismo de destino.

Como se menciona en la presente memoria, un microorganismo de destino es un microorganismo en el que son expresados los genes incluidos en una construcción/vector de expresión y es distinto del microorganismo lanzadera.

Se pretende que la expresión "producto de fermentación principal" el producto de fermentación que es producido a la mayor concentración y/o rendimiento.

Los términos "aumentar la eficacia", "aumento de la eficacia" y similares, cuando se utilizan en relación con un procedimiento de fermentación, incluyen, pero no se limitan a, aumento de una o más de la tasa de crecimiento de microorganismos que catalizan la fermentación, el crecimiento y/o la tasa de producción del producto a

concentraciones elevadas de acetona y/o isopropanol, el volumen de producto deseado producido por volumen de sustrato consumido, la tasa de producción o el nivel de producción del producto deseado, y la proporción relativa del producto deseado producido en comparación con otros subproductos de la fermentación.

5 Debe entenderse que la frase "sustrato que comprende monóxido de carbono" y las expresiones similares incluyen cualquier sustrato en el que haya disponible monóxido de carbono para una o más cepas de bacterias para el crecimiento y/o la fermentación, por ejemplo.

10 La frase "sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono" y frases y términos similares, incluyen cualquier gas que contiene un nivel de monóxido de carbono. En ciertas realizaciones el sustrato contiene de 20% a 70% en volumen de CO, de 30% a 60% en volumen de CO, y de 40% a 55% en volumen de CO. En realizaciones concretas, el sustrato comprende aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 50% de CO, o aproximadamente 55% de CO, o aproximadamente 60% en volumen de CO.

15 Si bien no es necesario que el sustrato contenga hidrógeno, la presencia de H<sub>2</sub> no debe ser perjudicial para la formación del producto. En descripciones particulares, la presencia de hidrógeno da como resultado una eficacia total mejorada de producción de alcohol. El sustrato puede comprender una razón de approx 2:1, o 1:1, o 1:2 de H<sub>2</sub>:CO. En una descripción el sustrato comprende aproximadamente 30% en volumen o menos de H<sub>2</sub>, 20% en volumen o menos de H<sub>2</sub>, aproximadamente 15% en volumen o menos de H<sub>2</sub> o aproximadamente 10% o en volumen menos de H<sub>2</sub>. En otras descripciones, la corriente de sustrato comprende bajas concentraciones de H<sub>2</sub>, por ejemplo, menos de 5%, o menos de 4%, o menos de 3%, o menos de 2%, o menos de 1%, o está sustancialmente libre de hidrógeno. El sustrato también puede contener por ejemplo algo de CO<sub>2</sub>, tal como de aproximadamente 1% a aproximadamente 80% en volumen de CO<sub>2</sub>, o de 1% a aproximadamente 30% en volumen de CO<sub>2</sub>. En una descripción, el sustrato comprende menos de o igual a aproximadamente 20% en volumen de CO<sub>2</sub>. En descripciones particulares el sustrato comprende menos de o igual a aproximadamente 15% en volumen de CO<sub>2</sub>, menos de o igual a aproximadamente 10% en volumen de CO<sub>2</sub>, menos de o igual a aproximadamente 5% en volumen de CO<sub>2</sub> o no contiene sustancialmente CO<sub>2</sub>.

25 En la siguiente descripción, las realizaciones de la invención se describen en términos de suministro y fermentación de un "sustrato gaseoso que contiene CO". Sin embargo, debe apreciarse que el sustrato gaseoso se puede proporcionar en formas alternativas. Por ejemplo, el sustrato gaseoso que contiene CO se puede proporcionar disuelto en un líquido. Esencialmente, se satura un líquido con un gas que contiene monóxido de carbono y después se añade el líquido al biorreactor. Esto se puede lograr usando metodología convencional. A modo de ejemplo, se podría utilizar un generador de dispersión de microburbujas (Hensirisak et. al. "Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation"; *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volumen 101, Número 3 / octubre, 2002). A modo de ejemplo adicional, el sustrato gaseoso que contiene CO se puede adsorber en un soporte sólido. Dichos métodos alternativos están englobados por el uso de la expresión "sustrato que contiene CO" y similares.

30 En realizaciones particulares de la invención, el sustrato gaseoso que contiene CO es un gas residual o de descarga industrial. Se debe considerar ampliamente que los "gases residuales o de descarga industrial" incluyen cualquiera de los gases que comprenden CO producido por un procedimiento industrial, e incluyen gases producidos como resultado de la fabricación de productos metálicos ferrosos, fabricación de productos no ferrosos, procedimientos de refinado del petróleo, gasificación de carbón, gasificación de biomasa, producción de energía eléctrica, producción de negro de humo y fabricación de coque. Se pueden proporcionar ejemplos adicionales en otra parte en la presente memoria.

35 Salvo que el contexto requiera otra cosa, se pretende que las frases "fermentación", "procedimiento de fermentación" o "reacción de fermentación" y similares, según se utilizan en la presente memoria, abarquen tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis de producto del procedimiento. Como se describirá adicionalmente en la presente memoria, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, se debe tender que la adición de metales o composiciones a la reacción de fermentación incluye la adición a uno o ambos de estos reactores.

40 El término "biorreactor" incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o torres o disposición de tuberías, que incluye el reactor de tanque agitado continuo (CSTR), el reactor celular inmovilizado (ICR), reactor de rejilla (TBR), columna de burbujas, fermentador de gas, mezclador estático u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para el contacto gas-líquido. El biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, cuando se menciona la adición de sustrato al biorreactor o reacción de fermentación debe entenderse que incluye adición a cualquiera o ambos de estos reactores donde sea apropiado.

55 Los "ácidos nucleicos exógenos" son ácidos nucleicos que se originan fuera del microorganismo en el que se introducen. Los ácidos nucleicos exógenos se pueden obtener a partir de cualquier fuente apropiada, incluyendo, pero sin limitarse al microorganismo en el que van a ser introducidos, cepas o especies de microorganismos que difieren del organismo en el que van a ser introducidos, o pueden ser creados de forma artificial o recombinante. En una realización, los ácidos nucleicos exógenos representan secuencias de ácido nucleico presentes de forma natural

dentro del microorganismo en el que se van a introducir, y se introducen para aumentar la expresión o expresar en exceso un gen particular (por ejemplo, aumentando el número de copias de la secuencia (por ejemplo un gen) o introduciendo un promotor fuerte o constitutivo para aumentar la expresión). En otra realización, los ácidos nucleicos exógenos representan secuencias de ácido nucleico que no se encuentran naturalmente dentro del microorganismo en el que se van a introducir y permiten la expresión de un producto que no se encuentra naturalmente dentro del microorganismo o el aumento de la expresión de un gen natural del microorganismo (por ejemplo, en el caso de la introducción de un elemento regulador tal como un promotor). El ácido nucleico exógeno se puede adaptar para integrarlo en el genoma del microorganismo en el que se va a introducir o para que permanezca en un estado extracromosómico.

Debe apreciarse que la invención se puede poner en práctica usando ácidos nucleicos cuya secuencia varía de las secuencias específicamente ejemplificadas en la presente memoria siempre que realicen sustancialmente la misma función. Para secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína o péptido esto significa que la proteína codificada, o el péptido, tienen sustancialmente la misma función. Para secuencias de ácido nucleico que representan secuencias promotoras, la secuencia variante tendrá la capacidad de promover la expresión de uno o más genes. Tales ácidos nucleicos se pueden denominar en la presente memoria "variantes funcionalmente equivalentes". A modo de ejemplo, las variantes funcionalmente equivalentes de un ácido nucleico incluyen variantes alélicas, fragmentos de un gen, genes que incluyen mutaciones (delección, inserción, sustituciones de nucleótidos y similares) y/o polimorfismos y similares. Los genes homólogos de otros microorganismos también se pueden considerar como ejemplos de variantes funcionalmente equivalentes de las secuencias ilustradas específicamente en la presente memoria. Estos incluyen genes homólogos en especies tales como *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* y *C. saccharoperbutylacetonicum*, de los cuales se encuentran detalles disponibles al público en sitios de internet tales como Genbank o NCBI. En el caso de los genes derivados de *Sacchomyces cerevisiae* y *Lactococcus lactics*, se pueden encontrar genes homólogos, por ejemplo, en *Staphylococcus epidermidis* (por ejemplo, NP\_765765.1, EGG67352.1, ZP\_04826144.1, ZP\_04797999.1), *Bacillus cereus* (por ejemplo, ZP\_04273468.1, ZP\_04317620.1) y *Bacillus thuringiensis* (por ejemplo, YP\_003664720.1). También se debe considerar que la frase "variantes funcionalmente equivalentes" incluye ácidos nucleicos cuya secuencia varía como resultado de la optimización de codones para un organismo particular. Las "variantes funcionalmente equivalentes" de un ácido nucleico de la presente invención tendrán preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 70%, preferiblemente aproximadamente 80%, más preferiblemente aproximadamente 85%, preferiblemente aproximadamente 90%, preferiblemente aproximadamente 95% o más con el ácido nucleico identificado.

También debe apreciarse que la invención se puede poner en práctica usando polipéptidos cuya secuencia varía de las secuencias de aminoácidos específicamente ejemplificadas en la presente memoria. Estas variantes se pueden denominar en la presente memoria "variantes funcionalmente equivalentes". Una variante funcionalmente equivalente de una proteína o un péptido incluye aquellas proteínas o péptidos que comparten al menos 40%, preferiblemente 50%, preferiblemente 60%, preferiblemente 70%, preferiblemente 75%, preferiblemente 80%, preferiblemente 85%, preferiblemente 90%, preferiblemente 95% o mayor identidad de aminoácidos con la proteína o el péptido identificados y tiene sustancialmente la misma función que el péptido o la proteína de interés. Dichas variantes incluyen dentro de su alcance fragmentos de una proteína o un péptido en donde el fragmento comprende una forma truncada del polipéptido en donde las delecciones pueden ser de 1 a 5, a 10, a 15, a 20, a 25 aminoácidos, y pueden extenderse desde el residuo 1 al 25 en cualquiera de los extremos del polipéptido, y en donde las delecciones pueden ser de cualquier longitud dentro de la región; o pueden estar en un lugar interno. También se deben tomar variantes funcionalmente equivalentes de los polipéptidos específicos de la presente invención para incluir polipéptidos expresados por genes homólogos en otras especies de bacterias, por ejemplo como se ejemplifica en el párrafo anterior.

Se pretende que "sustancialmente la misma función" según se utiliza en la presente memoria, signifique que el ácido nucleico o polipéptido es capaz de realizar la función del ácido nucleico o polipéptido del que es una variante. Por ejemplo, una variante de una enzima de la invención será capaz de catalizar la misma reacción que esa enzima. Sin embargo, no debe entenderse que la variante tiene el mismo nivel de actividad que el polipéptido o ácido nucleico del que es una variante.

Se puede evaluar si una variante funcionalmente equivalente tiene sustancialmente la misma función que el ácido nucleico o polipéptido del que es una variante usando cualquier número de métodos conocidos. No obstante, a modo de ejemplo, se pueden utilizar los métodos esbozados por Wiesenborn et al [Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents. *Appl Environ Microbiol.* 1988, 54: 2717-2722], Wiesenborn et al [Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. *Appl Environ Microbiol.* 1989, 55:323-9.], Peterson y Bennet [Purification of acetoacetate decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and cloning of the acetoacetate decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1990 56: 3491-3498], Ismail et al. [Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase of two strains of *Clostridium beijerinckii*. *J Bacteriol* 1993, 175: 5097-5105], de la Plaza et al [Biochemical and molecular characterization of  $\alpha$ -cetoisovalerate decarboxylase, an enzyme involved in the formation of aldehydes from amino acids by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 238: 367-374] o Khorkin et al [NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and

cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. J Mol Biol. 1998, 22: 278(5): 967-981] para evaluar la actividad de la enzima.

5 "Expresar en exceso", "expresión en exceso " y términos y frases similares cuando se usan en relación con la invención deben tomarse ampliamente para incluir cualquier incremento en la expresión de una o más proteínas en comparación con el nivel de expresión de la proteína de un microorganismo parental bajo las mismas condiciones. No debe entenderse que significa que la proteína se expresa a un nivel particular.

10 Un "microorganismo parental" es un microorganismo usado para generar un microorganismo recombinante de la invención. El microorganismo parental puede ser uno que aparezca en la naturaleza (es decir, un microorganismo de tipo salvaje) o uno que ha sido previamente modificado pero que no expresa o expresa en exceso una o más de las enzimas objeto de la presente invención. Por consiguiente, los microorganismos recombinantes de la invención se han modificado para expresar o expresar en exceso una o más enzimas que no se expresaron o se expresaron en exceso en el microorganismo parental.

15 Se debe considerar ampliamente que los términos "construcciones" o "vectores" de ácido nucleico y términos similares incluyen cualquier ácido nucleico (incluyendo ADN o ARN) adecuado para usar como un vehículo para transferir material genético a una célula. Se debe considerar que los términos incluyen plásmidos, virus (incluyendo bacteriófagos), cósmidos y cromosomas artificiales. Las construcciones o vectores pueden incluir uno o más elementos reguladores, un origen de replicación, un sitio de multiclonación y/o un marcador seleccionable. En una descripción particular, las construcciones o vectores se adaptan para permitir la expresión de uno o más genes codificados por la construcción o vector. Las construcciones o vectores de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos desnudos así como ácidos nucleicos formulados con uno o más agentes para facilitar el suministro a una célula (por ejemplo, ácido nucleico conjugado con liposoma, un organismo en el que está contenido el ácido nucleico).

20 La "ruta de biosíntesis de isopropanol" es la ruta enzimática que permite el metabolismo de CO o CO/H<sub>2</sub> a isopropanol, como se esboza, por ejemplo, en Figura 4.

25 La "ruta de biosíntesis de acetona" es la ruta enzimática que permite el metabolismo de CO o CO/H<sub>2</sub> a acetona, como se esboza, por ejemplo, en la Figura 4.

Un "precursor" de acetona incluye Acetil-CoA, Acetoacetil-CoA, Acetoacetato, Acetil-Fosfato y Ácido Acético.

Un "precursor" de isopropanol incluye Acetil-CoA, Acetoacetil-CoA, Acetoacetato, Acetona, Acetil-Fosfato y Ácido Acético.

30 Se debe considerar que la referencia a "alcohol deshidrogenasas" incluye alcohol deshidrogenasas que son capaces de catalizar la conversión de cetonas (tales como acetona) a alcoholes secundarios (tales como isopropanol), o viceversa. Dichas alcohol deshidrogenasas incluyen alcohol secundario deshidrogenasas y alcohol primario deshidrogenasas. Una "alcohol secundario deshidrogenasa" es aquella que convierte las cetonas (tales como acetona) en alcoholes secundarios (tales como isopropanol), o viceversa. Una "alcohol primario deshidrogenasa" es aquella que puede convertir aldehídos en alcoholes primarios, o viceversa; sin embargo, una serie de alcohol primario deshidrogenasas son capaces de catalizar la conversión de cetonas en alcoholes secundarios, o viceversa. Estas alcohol deshidrogenasas también se pueden denominar "alcohol primario-secundario deshidrogenasas".

40 Como se ha comentado anteriormente en la presente memoria, la invención proporciona un método que comprende el uso de un microorganismo recombinante capaz de producir acetona, isopropanol y/o un precursor de acetona y/o isopropanol mediante fermentación de un sustrato que comprende CO. Las referencias a los microorganismos y las enzimas de más abajo se refieren al uso de los microorganismos o enzimas en el método de la invención.

En una realización particular, el microorganismo se adapta para expresar una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de isopropanol que no están naturalmente presentes en el microorganismo parental. En otra realización, el microorganismo se adapta para expresar en exceso una o más enzimas en la ruta de biosíntesis del isopropanol que están naturalmente presentes en el microorganismo parental.

45 En una realización particular, el microorganismo se adapta para expresar una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de acetona que no están naturalmente presentes en el microorganismo parental. En otra realización, el microorganismo se adapta para expresar en exceso una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de acetona que están naturalmente presentes en el microorganismo parental.

50 En una realización particular, el microorganismo se adapta para expresar una o más enzimas implicadas en la conversión de acetona en isopropanol que no están naturalmente presentes en el microorganismo parental. En otra realización, el microorganismo se adapta para expresar en exceso una o más enzimas implicadas en la conversión de acetona en isopropanol que están naturalmente presentes en el microorganismo parental.

55 En una realización, el microorganismo parental es capaz de fermentar un sustrato que comprende CO para producir acetona pero no de convertir acetona en isopropanol y el microorganismo recombinante se adapta para expresar una o más enzimas implicadas en la conversión de acetona en isopropanol.

En otra realización, el microorganismo parental es capaz de convertir acetona en isopropanol pero no es capaz de fermentar un sustrato que comprende CO para producir acetona y el microorganismo recombinante se adapta para expresar una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de acetona.

5 En una realización, el microorganismo parental no es capaz de fermentar un sustrato que comprende CO para producir acetona e isopropanol y el microorganismo recombinante se adapta para expresar una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de acetona y una o más enzimas implicadas en la conversión de acetona en isopropanol.

10 El microorganismo puede adaptarse para expresar o expresar en exceso las una o más enzimas mediante cualquier número de métodos recombinantes, incluyendo, por ejemplo, el aumento de la expresión de genes naturales dentro del microorganismo (por ejemplo, introduciendo un promotor más fuerte o constitutivo para dirigir la expresión de un gen), el aumento del número de copias de un gen que codifica una enzima particular mediante la introducción de ácidos nucleicos exógenos que codifican y se adaptan para expresar la enzima, la introducción de un ácido nucleico exógeno que codifica y se adapta para expresar una enzima que no se encuentra naturalmente dentro del microorganismo parental.

15 En ciertas realizaciones, el microorganismo parental puede transformarse para proporcionar una combinación de aumento o expresión en exceso de uno o más genes nativos del microorganismo parental y la introducción de uno o más genes no nativos en el microorganismo parental. Por ejemplo, uno o más genes que codifican una enzima en la ruta de biosíntesis de acetona pueden ser nativos con respecto al microorganismo parental pero pueden no incluir uno o más genes que codifican una enzima implicada en la conversión de acetona en isopropanol, o viceversa. El microorganismo se podría modificar genéticamente para expresar en exceso los uno o más genes nativos que  
20 codifican una enzima en la ruta de biosíntesis de acetona y para introducir un gen que codifica una enzima implicada en la conversión de acetona en isopropanol, o viceversa. De un modo similar, el microorganismo se podría modificar genéticamente para expresar en exceso una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de acetona (y/o la conversión de acetona en isopropanol) y para introducir uno o más genes que codifican una enzima implicada en la misma ruta.

25 En una realización las una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de acetona se seleccionan del grupo que consiste en:

Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA; E.C. 2.3.1.9);

Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA; EC 2.8.3.9);

Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB; EC 2.8.3.9);

Acetoacetato descarboxilasa (Adc; EC 4.1.1.4);

30 Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD; EC4.1.1.74); e,

Una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas.

A modo de ejemplo solamente, la información de la secuencia para cada uno de los péptidos se proporciona en la tabla 6 o la tabla 18 en la presente memoria más adelante.

35 Las enzimas utilizadas en los microorganismos de la invención se pueden obtener de cualquier fuente apropiada, incluyendo diferentes géneros y especies de bacterias, u otros organismos. Sin embargo, en una realización, la Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA) es aquella de se obtiene de *C. acetobutylicum*. En una realización, la Acetil-Coenzima A acetiltransferasa tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la tabla 6 en la presente memoria más adelante, o es una variante funcionalmente equivalente de la misma.

40 En una realización, las enzimas Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB) y Acetoacetato descarboxilasa (Adc) se obtienen de *C. Beijerinckii*.

En una realización, la enzima alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD) es la que se obtiene a partir de *L. lactis*.

45 En una realización, cada enzima tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la tabla 6 o 18 en la presente memoria más adelante, o es una variante funcionalmente equivalente de la misma.

En una realización, las una o más enzimas implicadas en la conversión de acetona en isopropanol se seleccionan del grupo que consiste en:

Alcohol Deshidrogenasa (Adh; EC 1.1.1.2);

Alcohol deshidrogenasa (Adh2; EC 1.1.1.1); y,

50 Una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

- De nuevo, la enzima alcohol deshidrogenasa utilizada en la invención se puede obtener de cualquier fuente apropiada, incluyendo diferentes géneros y especies de bacterias (por ejemplo, las especies de bacterias ilustradas en la tabla 13 en la presente memoria más adelante. Sin embargo, en una realización particular, la Alcohol Deshidrogenasa (Adh) se obtiene de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y/o *C. ragsdalei*. En una descripción, la alcohol deshidrogenasa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ\_ID NO. 1 o es una variante funcionalmente equivalente de la misma. En una descripción, la variante funcionalmente equivalente tiene al menos aproximadamente 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ\_ID NO. 1.
- 5 En una realización, la Alcohol Deshidrogenasa (Adh2) se obtiene de *S. cerevisiae*.
- 10 En una realización, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar una o más de las enzimas mencionadas antes en la presente memoria. En una realización, los microorganismos comprenden uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y se adaptan para expresar al menos dos de las enzimas. En otras realizaciones, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y se adaptan para expresar 3, 4, 5, o 6 de las enzimas.
- 15 En una realización particular, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican cada una de Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA; E.C. 2.3.1.9), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA; EC 2.8.3.9), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB; EC 2.8.3.9), y Acetoacetato descarboxilasa (Adc; EC 4.1.1.4) o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas.
- 20 En una realización particular, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican Alcohol Deshidrogenasa (Adh; EC 1.1.1.2) o una variante funcionalmente equivalente de la misma.
- En una realización particular, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican cada una de Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA; E.C. 2.3.1.9), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA; EC 2.8.3.9), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB; EC 2.8.3.9), Acetoacetato descarboxilasa (Adc; EC 4.1.1.4), y Alcohol Deshidrogenasa (Adh; EC 1.1.1.2), o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas.
- 25 En una realización particular, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican cada una de Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD; EC4.1.1.74), y Alcohol deshidrogenasa (Adh2; EC 1.1.1.1), o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas.
- 30 En una realización particular, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican cada una de Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA; E.C. 2.3.1.9), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA; EC 2.8.3.9), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB; EC 2.8.3.9), y Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD; EC4.1.1.74), o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas.
- 35 En una realización particular, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD; EC4.1.1.74), o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas.
- En una realización particular, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican cada una de Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA; E.C. 2.3.1.9), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA; EC 2.8.3.9), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB; EC 2.8.3.9), Acetoacetato descarboxilasa (Adc; EC 4.1.1.4), y Alcohol deshidrogenasa (Adh2; EC 1.1.1.1), o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas.
- 40 En otra realización particular, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican cada una de Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA; E.C. 2.3.1.9), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA; EC 2.8.3.9), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB; EC 2.8.3.9), Acetoacetato descarboxilasa (Adc; EC 4.1.1.4), Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD; EC4.1.1.74), y Alcohol deshidrogenasa (Adh2; EC 1.1.1.1), o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas.
- 45 En una realización, la Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA) está codificada por un ácido nucleico que comprende SEQ\_ID NO. 18, o una de sus variantes funcionalmente equivalentes. En una realización, la Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA) está codificada por un ácido nucleico que comprende SEQ\_ID NO. 19, o una de sus variantes funcionalmente equivalentes. En una realización, la Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB) está codificada por un ácido nucleico que comprende SEQ\_ID NO. 20, o una de sus variantes funcionalmente equivalentes. En una realización, la Acetoacetato descarboxilasa (Adc) está codificada por un ácido nucleico que comprende SEQ\_ID NO. 21, o una de sus variantes funcionalmente equivalentes. En una realización, la Alcohol Deshidrogenasa (Adh) está codificada por
- 50
- 55

un ácido nucleico que comprende SEQ\_ID NO. 2, SEQ\_ID NO. 3, o SEQ\_ID NO. 4, o una variante funcionalmente equivalente de uno cualquiera de los mismos.

5 El microorganismo puede comprender uno o más ácidos nucleicos exógenos. Cuando se desea transformar el microorganismo parental con dos o más elementos genéticos (tal como genes o elementos reguladores (por ejemplo un promotor)) pueden estar contenidos en uno o más ácidos nucleicos exógenos.

10 En una realización, los uno o más ácidos nucleicos exógenos son una construcción o vector de ácido nucleico, en una realización particular un plásmido, que codifica una o más enzimas mencionadas en lo que antecede en cualquier combinación. En una realización particular, la construcción codifica cada una de ThIA, CtfA, CtfB, y Adc y opcionalmente, Adh. En otra realización, los uno o más ácidos nucleicos exógenos son una construcción de ácido nucleico o vector, en una realización particular un plásmido, que codifica Adh, y opcionalmente ThIA, CtfA, CtfB, y/o Adc. En una realización particular, la construcción codifica todas las ThIA, CtfA, CtfB, Adc y Adh. El vector también puede comprender otras combinaciones de ácidos nucleicos que codifican combinaciones de enzimas alternativas, como resulta evidente de la descripción en otra parte de este documento. En una realización particular, el vector comprende 1, 2, 3 o 4 de las secuencias de ácido nucleico SEQ\_ID NO. 19, 20, 21 y 22 o una variante funcionalmente equivalente de uno cualquiera de los mismos, en cualquier orden. En otra realización, el vector comprende SEQ\_ID\_NO. 2, 3 y/o 4, o una variante funcionalmente equivalente de uno cualquiera de los mismos, en cualquier orden. En una realización, el vector comprende 1, 2, 3, o 4 de las secuencias de SEQ\_ID NO. 19, 20, 21 y 22 o una variante funcionalmente equivalente de uno cualquiera de los mismos y de SEQ\_ID\_NO. 2, 3 o 4, o una variante funcionalmente equivalente de uno cualquiera de los mismos, en cualquier orden.

20 Los ácidos nucleicos exógenos pueden permanecer fuera del cromosoma después de la transformación del microorganismo parental o se pueden integrar en el genoma del microorganismo parental. Por consiguiente, pueden incluir secuencias de nucleótidos adicionales adaptadas para ayudar a la integración (por ejemplo, una región que permite la recombinación homóloga e integración dirigida en el genoma del anfitrión) o la expresión y replicación de una construcción extracromosómica (por ejemplo, origen de replicación y otros elementos o secuencias reguladoras).

25 En una realización, el microorganismo parental se selecciona del grupo de bacterias acetogénicas carboxidotrofas. En ciertas realizaciones el microorganismo se selecciona del grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium coskatii*, *Butyribacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, y *Thermoanaerobacter kiuvii*.

30 En una realización particular, el microorganismo parental se selecciona de la agrupación de Clostridia etanológicas, acetogénicas que comprende las especies *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y *C. ragsdalei* y productos aislados relacionados. Estos incluyen pero no se limitan a cepas de *C. autoethanogenum* JAI-1<sup>T</sup> (DSM10061) [Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: "Clostridium autoethanogenum, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol de carbon monoxide". *Arch Microbiol* 1994, 4: 345-351], *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) [Simpson SD, Forster RL, Tran PT, Rowe MJ, Warner IL: "Novel bacteria and methods thereof". Patente internacional 2009, WO/2009/064200], *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETC<sup>T</sup> (DSM13528 = ATCC 55383) [Tanner RS, Miller LM, Yang D: Clostridium ljungdahlii sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. *Int J Syst Bacteriol* 1993, 43: 232-236], *C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) [Gaddy JL: "Clostridium stain which produces acetic acid from waste gases". Patente de Estados Unidos 1997, 5.593.886], *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) [Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: "Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction from the fermentation broth". Patente de Estados Unidos, 2002, 6.368.819], *C. ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989) [Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: "Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction State fermentation broth". Patente de Estados Unidos, 2002, 6.368.819], *C. ragsdalei* P11<sup>T</sup>(ATCC BAA-622) [Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: "Isolation and Characterization of novel Clostridial Species". Patente internacional 2008, WO 2008/028055], productos aislados relacionados tales como "*C. coskatii*" [Zahn *et al* - Novel ethanologenic species Clostridium coskatii (Solicitud de Patente de Estados Unidos número US20110229947)], o cepas mutadas tales como *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*. Tesis doctoral, North Carolina State University, 2010). Estas cepas forman un subconjunto dentro del conjunto I de ARNr clostridial y su gen de ARNr 16S es más de 99% idéntico con un contenido de GC bajo similar de aproximadamente 30%. Sin embargo, la reasociación de ADN-ADN y los experimentos de huella dactilar de ADN mostraron que estas cepas pertenecen a diferentes especies [Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: "Isolation and Characterization of novel Clostridial Species". Patente internacional 2008, WO 2008/028055].

35 40 45 50 55 60 Todas las especies de este conjunto tienen una morfología y tamaño similares (las células en crecimiento logarítmico tienen entre 0,5-0,7 x 3-5 µm), son mesófilas (temperatura de crecimiento óptima 30-37°C) y estrictamente anaerobias [Tanner RS, Miller LM, Yang D: Clostridium ljungdahlii sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. *Int J Syst Bacteriol* 1993, 43: 232-236; Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: "Clostridium autoethanogenum, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide". *Arch Microbiol* 1994, 4: 345-351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: "Isolation and Characterization of novel Clostridial

Species". Patente internacional 2008, WO 2008/028055]. Además, comparten todos los mismos rasgos filogenéticos principales, tal como un mismo intervalo de pH (pH 4-7,5, con un pH inicial óptimo de 5,5-6), crecimiento autótrofo fuerte en gases que contienen CO con velocidades de crecimiento similares y un perfil metabólico similar con etanol y ácido acético como producto final de fermentación principal, y pequeñas cantidades de 2,3-butanodiol y ácido láctico formados en determinadas condiciones. [Tanner RS, Miller LM, Yang D: *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. *Int J Syst Bacteriol* 1993, 43: 232-236; Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: "Clostridium autoethanogenum, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol de carbon monoxide". *Arch Microbiol* 1994, 4: 345-351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: "Isolation and Characterization of novel Clostridial Species". Patente internacional 2008, WO 2008/028055]. La producción de indol se observó también con las tres especies. Sin embargo, las especies se diferencian en el uso de sustratos de diferentes azúcares (p. ej. ramnosa, arabinosa), ácidos (p. ej. gluconato, citrato), aminoácidos (p. ej. arginina, histidina), u otros sustratos (p. ej. betaína, butanol). Además, se encontró que algunas de las especies eran auxótrofas para ciertas vitaminas (p. ej. tiamina, biotina), mientras que otras no.

En una realización, la cepa original usa CO como única fuente de carbono y energía.

En una realización el microorganismo parental es *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*. En una realización particular, el microorganismo es *Clostridium autoethanogenum* DSM23693. En otra realización particular, el microorganismo es *Clostridium ljungdahlii* DSM13528 (o ATCC55383).

En una realización, el microorganismo parental carece de uno o más genes que codifican ThIA, CtfA, CtfB, Adc, KivD, Adh y Adh2. En una realización particular, el microorganismo parental carece de un gen que codifica Adh. En otra realización particular, el microorganismo parental carece de cada uno de los genes que codifican ThIA, CtfA, CtfB, Adc, y KivD.

Los autores de la presente invención han identificado una proteína Adh novedosa. Se describe una Alcohol Deshidrogenasa (Adh) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ\_ID NO. 1, o una cualquiera de sus variantes funcionalmente equivalentes. En una descripción, la variante funcionalmente equivalente de la Alcohol Deshidrogenasa (Adh) tiene al menos aproximadamente 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ\_ID NO. 1.

Se describe un ácido nucleico que codifica Adh de SEQ\_ID NO. 1 o una de sus variantes funcionalmente equivalentes. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente tales ácidos nucleicos, teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos proporcionada en la presente memoria y el código genético y la degeneración del mismo. No obstante, a modo de ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican Adh de SEQ\_ID NO. 1 incluyen los ácidos nucleicos de SEQ\_ID NO. 2, 3 o 4, o variantes funcionalmente equivalentes de los mismos. En una descripción particular, una variante funcionalmente equivalente de SEQ\_ID NO. 2, 3 o 4 es un ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ\_ID NO. 2, 3 o 4.

También se describen ácidos nucleicos que son capaces de hibridar con al menos una porción del ácido nucleico de SEQ\_ID NO. 2, 3 o 4, un ácido nucleico complementario a cualquiera de los mismos, o una variante funcionalmente equivalente de uno cualquiera de los mismos. Tales ácidos nucleicos hibridarán preferiblemente con el ácido nucleico de SEQ\_ID NO. 2, 3 o 4, un ácido nucleico complementario a uno cualquiera de los mismos, o una variante funcionalmente equivalente de uno cualquiera de los mismos, en condiciones de hibridación restrictivas. "Condiciones de hibridación restrictivas" significa que el ácido nucleico es capaz de hibridar con un molde diana en condiciones de hibridación convencionales tales como las descritas en Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, USA. Se apreciará que el tamaño mínimo de tales ácidos nucleicos es un tamaño que es capaz de formar un híbrido estable entre un ácido nucleico dado y la secuencia complementaria que se ha diseñado para su hibridación. Por consiguiente, el tamaño depende de la composición del ácido nucleico y del porcentaje de homología entre el ácido nucleico y su secuencia complementaria, así como de las condiciones de hibridación que se utilizan (por ejemplo, temperatura y concentraciones de sal). En una descripción, el ácido nucleico tiene al menos 10 nucleótidos de longitud, al menos 15 nucleótidos de longitud, al menos 20 nucleótidos de longitud, al menos 25 nucleótidos de longitud, o al menos 30 nucleótidos de longitud.

Los autores de la presente invención también han identificado una serie de ácidos nucleicos novedosos útiles como sondas y cebadores, como se detalla en la presente memoria más adelante en la sección de ejemplos. Por ejemplo, SEQ\_ID NO. 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 64; SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 66; SEQ ID NO: 67; SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 69; SEQ ID NO: 70; SEQ ID NO: 71; SEQ ID NO: 85; SEQ ID NO: 86; SEQ ID NO: 87; SEQ ID NO: 88; SEQ ID NO: 89; SEQ ID NO: 90; SEQ ID NO: 91; SEQ ID NO: 92; SEQ ID NO: 93; SEQ ID NO: 94; SEQ ID NO: 96; SEQ ID NO: 97; SEQ ID NO: 99; SEQ ID NO: 100.

La invención también proporciona ácidos nucleicos y construcciones de ácidos nucleicos para su uso en la generación de microorganismos recombinantes de la invención.

5 En una realización, los ácidos nucleicos comprenden secuencias que codifican una o más de las enzimas que cuando se expresan en un microorganismo permiten que el microorganismo produzca acetona, isopropanol y/o un precursor de acetona y/o isopropanol por fermentación de un sustrato que comprende CO. En una realización particular, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica dos o más enzimas que cuando se expresan en un microorganismo permiten que el microorganismo produzca acetona, isopropanol y/o un precursor de acetona y/o isopropanol por fermentación de un sustrato que comprende CO. En una realización, los ácidos nucleicos de la invención codifican 3, 4, 5 o 6 de tales enzimas.

10 En una realización particular, la enzimas se seleccionan entre Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB), Acetoacetato descarboxilasa (Adc), cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD), Alcohol Deshidrogenasa (Adh), Alcohol Deshidrogenasa (Adh2), y una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas.

15 En una realización, un ácido nucleico de la invención comprende secuencias de ácido nucleico que codifican cada una de Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB), y Acetoacetato descarboxilasa (Adc) o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas, en cualquier orden

20 En una realización, un ácido nucleico de la invención comprende secuencias de ácido nucleico que codifican cada una de Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB), Acetoacetato descarboxilasa (Adc), y Alcohol Deshidrogenasa (Adh) o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas, en cualquier orden.

25 En una realización, un ácido nucleico de la invención comprende secuencias de ácido nucleico que codifican cada una de Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD), y Alcohol deshidrogenasa (Adh2), o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas, en cualquier orden.

30 En una realización, un ácido nucleico de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican cada una de Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB), y Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD), o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas, en cualquier orden.

35 En una realización, un ácido nucleico de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD), o una variante funcionalmente equivalente de la misma. En una realización, un ácido nucleico de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican cada una de Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB), Acetoacetato descarboxilasa (Adc), y Alcohol deshidrogenasa (Adh2), o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas, en cualquier orden.

40 En otra realización, un ácido nucleico de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican cada una de Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa), Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB), Acetoacetato descarboxilasa (Adc), Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD), y Alcohol deshidrogenasa (Adh2), o una variante funcionalmente equivalente de una o más cualesquiera de las mismas, en cualquier orden.

45 Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos ilustrativas que codifican cada una de las enzimas anteriores se proporcionan en GenBank como se describe en otra parte en la presente memoria (véanse, en particular, los ejemplos proporcionados en las tablas 6 y 18 en la presente memoria más adelante). No obstante, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente secuencias de ácidos nucleicos alternativas que codifican las enzimas o variantes funcionalmente equivalentes de las mismas, teniendo en consideración la información contenida en la presente memoria, en GenBank y en otras bases de datos, y el código genético.

50 En una realización, la Alcohol Deshidrogenasa (Adh2) tiene la secuencia de SEQ\_ID NO 75, o una de sus variantes funcionalmente equivalentes.

55 En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica Acetil-Coenzima A acetiltransferasa (Tiolasa; ThIA) comprende SEQ\_ID NO. 18, o es una de sus variantes funcionalmente equivalentes. En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA) comprende SEQ\_ID NO. 19, o es una de sus variantes funcionalmente equivalentes. En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la Acetoacetil-CoA:Acetato Coenzima A transferasa B (CoA transferasa;

- CtfB) comprende SEQ\_ID NO. 20, o es una de sus variantes funcionalmente equivalentes. En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la Acetoacetato descarboxilasa (Adc) comprende SEQ\_ID NO. 21, o es una de sus variantes funcionalmente equivalentes. En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico que codifica la Alcohol Deshidrogenasa (Adh) comprende SEQ\_ID NO. 2, SEQ\_ID NO. 3, o SEQ\_ID NO. 4, o es una variante funcionalmente equivalente de uno cualquiera de los mismos. En una descripción, la variante funcionalmente equivalente de SEQ\_ID NO. 2, SEQ\_ID NO. 3, o SEQ\_ID NO. 4 tiene al menos aproximadamente 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ\_ID NO. 2, 3 o 4.
- Los ácidos nucleicos de la invención pueden permanecer fuera del cromosoma tras la transformación de un microorganismo parental o se pueden adaptar para la integración en el genoma del microorganismo. Por consiguiente, los ácidos nucleicos de la invención pueden incluir secuencias de nucleótidos adicionales adaptadas para ayudar a la integración (por ejemplo, una región que permita la recombinación homóloga y la integración dirigida al genoma del anfitrión) o la expresión estable y la replicación de una construcción extracromosómica (por ejemplo, origen de replicación, promotor y otras secuencias reguladoras).
- En una descripción, el ácido nucleico es una construcción o vector de ácido nucleico. En una descripción particular, la construcción de ácido nucleico o vector es una construcción o vector de expresión.
- Se apreciará que una construcción/vector de expresión puede contener cualquier número de elementos reguladores además del promotor así como genes adicionales adecuados para la expresión de otras proteínas si se desea. En una descripción, la construcción/vector de expresión incluye un promotor. En otra descripción, la construcción/vector de expresión incluye dos o más promotores. En una realización particular, la construcción/vector de expresión incluyen un promotor para cada gen que se vaya a expresar. En una descripción, la construcción/vector de expresión incluyen uno o más sitios de unión ribosómicos, preferiblemente un sitio de unión ribosómico para cada gen que se vaya a expresar.
- Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias de ácidos nucleicos y las secuencias de construcciones/vectores descritas en la presente memoria pueden contener nucleótidos conectores convencionales tales como los requeridos para los sitios de unión a ribosomas y/o los sitios de restricción. No se debe interpretar que se requieran tales secuencias conectoras y no proporcionan una limitación en las secuencias definidas.
- Los ácidos nucleicos y las construcciones de ácido nucleico, incluyendo las construcciones/vectores de expresión, se pueden construir usando cualquier número de mecanismos convencionales en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de síntesis química o recombinante. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook et al, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Se describen técnicas ilustrativas adicionales en la sección de ejemplos en lo sucesivo. Esencialmente, los genes individuales y los elementos reguladores estarán operativamente unidos entre sí de tal manera que los genes se puedan expresar para formar las proteínas deseadas. Los expertos en la técnica apreciarán los vectores adecuados para usar en la invención. Sin embargo, a modo de ejemplo, los siguientes vectores pueden ser adecuados: vectores pMTL80000, pIMP1, pJIR750 y los plásmidos ilustrados en la sección de Ejemplos más adelante en la presente memoria.
- Se debe apreciar que los ácidos nucleicos la invención pueden estar en cualquier forma apropiada, incluyendo ARN, ADN, o ADNc.
- También se describen organismos anfitriones, concretamente microorganismos, e incluyendo virus, bacterias, y levaduras, que comprenden uno o más cualesquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria.
- Los uno o más ácidos nucleicos exógenos se pueden suministrar a un microorganismo parental como ácidos nucleicos desnudos o se pueden formular con uno o más agentes para facilitar el proceso de transformación (por ejemplo, ácido nucleico conjugado con liposoma, un organismo en el que está contenido el ácido nucleico). Los uno o más ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN o combinaciones de los mismos, si es adecuado. Se pueden utilizar inhibidores de restricción; véase, por ejemplo, Murray, N.E. et al. (2000) *Microbial. Molec. Biol. Rev.* 64, 412.)
- Los microorganismos de la invención se pueden preparar a partir de un microorganismo parental y uno o más ácidos nucleicos exógenos usando cualquier número de mecanismos conocidos en la técnica para la producción de microorganismos recombinantes. A modo de ejemplo solo, la transformación (que incluye transducción o transfección) se puede lograr por electroporación, ultrasonidos, transformación mediada por polietilenglicol, competencia química y natural, o conjugación. Se describen técnicas de transformación adecuadas, por ejemplo, en Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989.
- Debido a los sistemas de restricción que sean activos en el microorganismo que se vaya a transformar, puede ser necesario metilar el ácido nucleico que se vaya a introducir en el microorganismo. Esto se puede hacer usando una variedad de técnicas, incluyendo las descritas a continuación e ilustradas adicionalmente en la sección de ejemplos en lo sucesivo.

A modo de ejemplo, se produce un microorganismo recombinante mediante un método que comprende las siguientes etapas:

introducción en un microorganismo lanzadera de (i) de una construcción/vector de expresión como se describe en la presente memoria y (ii) una construcción/vector de metilación que comprende un gen de metiltransferasa;

5 expresión del gen de metiltransferasa;

aislamiento de una o más construcciones/vectores a partir del microorganismo lanzadera; e,

introducción de una o más construcciones/vectores en el microorganismo de destino.

10 Una vez que la construcción/vector de expresión y la construcción/vector de metilación se introducen en el microorganismo lanzadera, es inducido el gen de metiltransferasa presente en la construcción/vector de metilación. La inducción puede ser mediante cualquier sistema promotor adecuado. Los promotres adecuados incluyen el promotor ara, tet, lac, o el sistema T7.

15 En una descripción particular, la construcción/vector de metilación tiene un origen de replicación específico para la identidad del microorganismo lanzadera, de modo que cualquiera de los genes presentes en la construcción/vector de metilación son expresados en el microorganismo lanzadera. Preferiblemente, la construcción/vector de expresión tiene un origen de replicación específico para la identidad del microorganismo de destino de modo que cualquier gen presente en la construcción/vector de expresión se expresa en el microorganismo de destino.

20 La expresión de la enzima metiltransferasa da como resultado la metilación de los genes presentes en la construcción/vector de expresión. La construcción/vector de expresión después se pueden aislar del microorganismo lanzadera de acuerdo con uno cualquiera de una serie de métodos conocidos. A modo de ejemplo solo, se puede usar la metodología descrita en la sección de ejemplos en lo sucesivo para aislar la construcción/vector de expresión.

25 La construcción/vector de expresión puede introducirse en el microorganismo de destino usando cualquier número de métodos conocidos. Sin embargo, a modo de ejemplo, se puede usar la metodología descrita en la sección de ejemplos en lo sucesivo. Dado que la construcción/vector de expresión están metilados, las secuencias de ácido nucleico presentes en la construcción/vector de expresión pueden ser incorporadas al microorganismo de destino y expresadas con éxito.

30 Está previsto que se pueda introducir un gen de metiltransferasa en un microorganismo lanzadera y se exprese en exceso. Por lo tanto, en una descripción, la enzima metiltransferasa resultante se puede recoger usando métodos conocidos y usar in vitro para metilar un plásmido de expresión. La construcción/vector de expresión pueden introducirse a continuación en el microorganismo de destino para su expresión. En otra descripción, se introduce el gen de metiltransferasa en el genoma del microorganismo lanzadera seguido de introducción de la construcción/vector de expresión en el microorganismo lanzadera, aislamiento de una o más construcciones/vectores a partir del microorganismo lanzadera y después introducción de la construcción/vector de expresión en el microorganismo de destino.

35 Se prevé que la construcción/vector de expresión y la construcción/vector de metilación como se ha definido anteriormente se pueden combinar para proporcionar una composición objeto de la memoria. Dicha composición tiene utilidad particular para evitar mecanismos barrera de restricción para producir microorganismos recombinantes de la invención.

40 En una descripción particular, la construcción/vector de expresión y/o la construcción/vector de metilación son plásmidos.

Los expertos en la técnica apreciarán una serie de metiltransferasas adecuadas para usar en la producción de microorganismos de la invención. Sin embargo, a modo de ejemplo se puede usar la metiltransferasa del fago  $\Phi$ T1 de *Bacillus subtilis* y la metiltransferasa descrita en los ejemplos en lo sucesivo.

45 Se puede usar cualquier número de construcciones/vectores adaptados para permitir la expresión de un gen de metiltransferasa, para generar una construcción/vector de metilación. Sin embargo, a modo de ejemplo, se puede usar el plásmido descrito en la sección de ejemplos en lo sucesivo.

50 La invención proporciona un método para la producción de uno o más productos deseables (acetona, isopropanol, y/o un precursor de acetona y/o isopropanol) mediante fermentación microbiana que comprende fermentar un sustrato que comprende CO utilizando un microorganismo recombinante de la invención. Los métodos de la invención se pueden usar para reducir las emisiones atmosféricas totales de carbono de un procedimiento industrial.

Preferiblemente, la fermentación comprende las etapas de fermentar anaerobiamente un sustrato en un biorreactor para producir los uno o más productos utilizando un microorganismo recombinante de la invención.

En una descripción, el método comprende las etapas de:

(a) proporcionar un sustrato que comprende CO a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos de la invención; y

(b) fermentar anaerobiamente el cultivo en el biorreactor para producir los uno o más productos.

5 En una realización el método comprende las etapas de:

(a) captura del gas que contiene CO producido como resultado del procedimiento industrial, antes de liberar el gas a la atmósfera;

(b) la fermentación anaerobia del gas que contiene CO para producir los uno o más productos por medio de un cultivo que contiene uno o más microorganismos de la invención.

10 En una realización de la invención, el sustrato gaseoso fermentado por el microorganismo es un sustrato gaseoso que contiene CO. El sustrato gaseoso puede ser un gas residual que contiene CO obtenido como un subproducto de un procedimiento industrial, o de alguna otra fuente tal como de humos de escape de automóvil. En algunas realizaciones, el procedimiento industrial se selecciona del grupo que consiste en la fabricación de productos de metales ferrosos, tales como una acería, fabricación de productos no ferrosos, procesos de refinado de petróleo, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de humo, producción de amoníaco, producción de metanol y fabricación de coque. En estas realizaciones, el gas que contiene CO puede capturarse del procedimiento industrial antes de emitirse a la atmósfera, usando cualquier método conveniente. El CO puede ser un componente de gas de síntesis (gas que comprende monóxido de carbono e hidrógeno). El CO producido de procedimientos industriales normalmente se quema para producir CO<sub>2</sub> y por lo tanto, la invención tiene utilidad particular en la reducción de las emisiones gaseosas de CO<sub>2</sub> de efecto invernadero y producción de butanol para usar como un biocombustible. Dependiendo de la composición del sustrato que contiene CO gaseoso, puede ser conveniente tratarlo para eliminar cualquier impureza indeseada, tal como partículas de polvo antes de introducirlo a la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso se puede filtrar o depurar por métodos conocidos.

25 Se apreciará que para que se produzca el crecimiento de la bacteria y CO para los uno o más productos, además del gas sustrato que contiene CO, será necesario introducir en el biorreactor un medio nutriente líquido adecuado. El sustrato y el medio se pueden alimentar al biorreactor en una forma continua, discontinua o de alimentación discontinua. Un medio nutriente contendrá vitaminas y minerales suficientes para permitir el crecimiento del microorganismo usado. Los medios anaerobios adecuados para la fermentación para producir butanol usando CO son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describen medios adecuados en Biebel (2001). En una descripción el medio es el descrito en la sección de Ejemplos en la presente memoria más adelante.

30 La fermentación se debería llevar a cabo deseablemente en condiciones apropiadas para que se produzca la fermentación del CO para los uno o más productos. Las condiciones de reacción que deberían considerarse incluyen presión, temperatura, caudal de gas, caudal de líquido, pH del medio, potencial rédox del medio, velocidad de agitación (si se usa un reactor de tanque agitado continuo), nivel de inóculo, concentraciones de sustrato gaseoso máximo para asegurar que el CO en la fase líquida no se convierte en limitante, y concentraciones de producto máximas para evitar la inhibición por producto.

35 Además, a menudo es conveniente aumentar la concentración de CO de una corriente de sustrato (o presión parcial de CO en un sustrato gaseoso) y por lo tanto aumentar la eficacia de las reacciones de fermentación cuando el CO es un sustrato. El funcionamiento a presiones más altas permite un aumento significativo en la tasa de transferencia de CO desde la fase gaseosa a la fase líquida en la que puede ser absorbido por el microorganismo como una fuente de carbono para la producción de los uno o más productos. Esto a su vez significa que el tiempo de retención (definido como el volumen líquido en el biorreactor dividido entre el caudal de gas de entrada) se puede reducir cuando los biorreactores se mantienen a presión elevada en lugar de a presión atmosférica. Las condiciones de reacción óptimas dependerán en parte del microorganismo particular de la invención usado. Sin embargo, en general, se prefiere que la fermentación se lleve a cabo a presión mayor que la presión ambiente. Asimismo, puesto que la tasa de conversión dada de un CO para los uno o más productos es en parte función del tiempo de retención del sustrato, y que la consecución de un tiempo de retención deseado dicta a su vez el volumen requerido de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados puede reducir enormemente el volumen del biorreactor requerido, y por consiguiente el gasto de capital del equipo de fermentación. De acuerdo con los ejemplos dados en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.593.886, el volumen del reactor se puede reducir en proporción lineal a los aumentos de la presión de trabajo del reactor, es decir, los biorreactores que trabajan a 10 atmósferas de presión necesitan solo una décima parte del volumen de los que trabajan a 1 atmósfera de presión.

40 A modo de ejemplo, se han descrito los beneficios de llevar a cabo una fermentación de gas a etanol a presiones elevadas. Por ejemplo, el documento WO 02/08438 describe fermentaciones de gas a etanol realizadas a presiones de 2,11 kg/cm<sup>2</sup> (30 psig) y 5,27 kg/cm<sup>2</sup> (75 psig), proporcionando productividades de etanol de 150 g/l/día a 369 g/l/día respectivamente. Sin embargo, se encontró que fermentaciones ilustrativas realizadas usando medios y composiciones de gas de entrada similares a presión atmosférica, producen entre 10 y 20 veces menos etanol por litro por día.

Es conveniente también que la velocidad de introducción del sustrato gaseoso que contiene CO sea tal que asegure que la concentración de CO en la fase líquida no se convierta en limitante. Esto se debe a que una consecuencia de las condiciones limitadas por el CO puede ser que el producto etanol sea consumido por el cultivo.

5 La composición de las corrientes de gas usadas para alimentar una reacción de fermentación puede tener un impacto importante en la eficacia y/o en los costes de esta reacción. Por ejemplo, el O<sub>2</sub> puede reducir la eficacia de un procedimiento de fermentación anaerobia. El procesamiento de gases no deseados o innecesarios en fases de un procedimiento de fermentación antes o después de la fermentación, puede aumentar la carga en dichas etapas (p. ej., donde la corriente de gas es comprimida antes de entrar en un biorreactor, se puede usar energía innecesaria para comprimir gases que no son necesarios en la fermentación). Por consiguiente, puede ser conveniente tratar las  
10 corrientes de sustrato, en particular corrientes de sustrato obtenidas de fuentes industriales, para separar componentes no deseados y aumentar la concentración de los componentes convenientes.

En algunas descripciones, un cultivo de una bacteria de la invención se mantiene en un medio de cultivo acuoso. Preferiblemente, el medio de cultivo acuoso es un medio de crecimiento microbiano anaerobio mínimo. Los medios adecuados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.173.429 y 5.593.886 y el documento WO 02/08438, y como se describe en la sección de Ejemplos más adelante en este documento.

La acetona, el isopropanol, o una corriente mixta que contiene acetona y/o isopropanol y/o uno o más productos distintos, se pueden recuperar del caldo de fermentación mediante métodos conocidos en la técnica, tales como destilación o evaporación fraccionadas, pervaporación, extracción por destilación de gas y fermentación extractiva,  
20 incluyendo por ejemplo, extracción líquido-líquido.

En ciertas descripciones, los uno o más productos se recuperan del caldo de fermentación eliminando de manera continua una porción del caldo del biorreactor, separando las células microbianas del caldo (convenientemente por filtración), y recuperando uno o más productos del caldo. Los alcoholes se pueden recuperar convenientemente, por ejemplo, por destilación. La acetona se puede recuperar por ejemplo por destilación. Cualquier ácido producido se  
25 puede recuperar, por ejemplo, por adsorción sobre carbón activado. Las células microbianas separadas preferiblemente se devuelven al biorreactor de fermentación. El producto permeado exento de células que queda después de haber separado todos los alcoholes y ácidos, preferiblemente también se devuelve al biorreactor de fermentación. Se pueden añadir nutrientes adicionales (tales como vitamina B) al producto permeado exento de células para recargar el medio nutriente antes de devolverlo al biorreactor.

Además, si el pH del caldo se ajustó como se ha descrito antes para potenciar la absorción de ácido acético en el carbón activado, el pH debería reajustarse a un pH similar al del caldo en el biorreactor de fermentación, antes de devolverlo al biorreactor.

#### **Ejemplos:**

La invención ahora se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

#### **35 Microorganismos y condiciones de crecimiento**

*Acetobacterium woodii* DSM1030, *Clostridium aceticum* DSM1496, *C. autoethanogenum* DSM23693, *C. carboxidivorans* DSM15243, y *C. ljungdahlii* DSM13528 procedían de DSMZ (The German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania). *C. autoethanogenum* DSM23693 es un producto derivado de *C. autoethanogenum* DSM10061.

40 *C. ragsdalei* ATCC BAA-622 procedían de la Colección de Cultivos Tipo Americana, Manassas, VA 20108, EE.UU.

*C. acetobutylicum* ATCC824, *C. beijerinckii* NRRL-B593, y *C. beijerinckii* NCIMB8052 se obtuvieron del Prof. David Jones (University of Otago) y también se puede obtener de las colecciones de cepas públicas DSMZ y ATCC con los números de acceso ATCC824/DSM792, DSM6423, y ATCC51743 respectivamente.

45 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -T1<sup>R</sup> procedía de Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, EE.UU. y *Escherichia coli* XL1-Blue MRF<sup>R</sup> Kan y ABLE K de Stratagene (Santa Clara, CA 95051-7201, EE.UU.). *Escherichia coli* JW3350-2 procedía de The Coli Genetic Stock Center (CGSC), New Haven, CT 06520-8103.

*E. coli* se cultivó en condiciones tanto aerobias como anaerobias, mientras las otras cepas se hicieron crecer estrictamente de manera anaerobia en un volumen de 50 ml de medio líquido en frascos de suero con fructosa (crecimiento heterótrofo) o gas a 206,84 kpa (30 psi) de fábricas de acero que contenía CO (recogido de la planta de New Zealand Steel en Glenbrook, NZ; composición: 44% de CO, 32% de N<sub>2</sub>, 22% de CO<sub>2</sub>, 2% de H<sub>2</sub>) en el espacio libre superior (crecimiento autótrofo).  
50

El medio se preparó utilizando técnicas anaerobias convencionales [Hungate RE: A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, en Norris JR y Ribbons DW (eds.), Methods in Microbiology, vol. 3B. Academic Press, Nueva York, 1969: 117-132; Wolfe RS: Microbial formation of methane. Adv Microb Physiol 1971, 6: 107-146] de acuerdo con las

formulaciones proporcionadas en la Tab. 2-4. Para el medio sólido, se añadió Bacto agar (BD, Frankton Lakes, NJ 07417, EE.UU.) al 1,2 %.

Todas las cepas se hicieron crecer a 37°C, excepto *A. woodii*, *C. aceticum*, y *C. ragsdalei* que se hicieron crecer a 30°C.

- 5 **Tab. 2: Medio PETC (*A. woodii*, pH 8,2; *C. aceticum*, pH 7,4; *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii*, y *C. ragsdalei*, pH 5,6)**

Componente del medio	Concentración por 1,0 litros de medio
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
Solución de metales traza (véase más abajo)	10 ml
Solución de vitamina de Wolfe (véase más abajo)	10 ml
Extracto de levadura (opcional)	1 g
Resazurina (2 g/l de cultivo de partida)	0,5 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
Agente reductor	0,006-0,008 % (v/v)
Fructosa (para crecimiento heterótrofo)	5 g
<b>Solución de metales traza</b>	<b>por litro de solución de partida</b>
<b>Ácido nitrilotriacético</b>	<b>2 g</b>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1 g
Fe (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,8 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,02 g
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02 g

Componente del medio	Concentración por 1,0 litros de medio
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Solución de partida de agente reductor	<b>por 100 ml de solución de partida</b>
NaOH	0,9 g
Cisteína.HCl	4 g
Na <sub>2</sub> S	4 g

**Tab. 3: Medio Clostridial Reforzado RCM (*C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*)**

Componente del medio	Concentración por 1,0 litros de medio
Producto digerido pancreático de caseína	5 g
Peptona proteasa Núm. 3	5 g
Extracto de carne de vacuno	10 g
Extracto de levadura	3 g
Dextrosa	5 g
NaCl	5 g
Almidón soluble	1 g
Cisteína.HCl	0,5 g
Acetato de sodio	3 g

5 **Tab. 4: Medio Luria Bertani LB (*E. coli*)**

Componente del medio	Concentración por 1,0 litros de medio
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Tab. 5: Medio mínimo SD-8 (*E. coli*)

Componente del medio	Concentración por 1,0 litros de medio
NH <sub>4</sub> Cl	7 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,85 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,17 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,5 g
Solución de metales traza (véase más abajo)	0,8 ml
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
<b>Solución de metales traza</b>	<b>por 100 L de provisión de partida</b>
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4 g
COCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,4 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2 g
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2,83 g
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,5 g

Las fermentaciones con *C. autoethanogenum* DSM23693 se llevaron a cabo en biorreactores de 1,5 L a 37°C y gas de fábricas de acero que contenía CO como única fuente de energía y fuente de carbono como se describe más abajo. Se utilizó un medio definido que contenía por litro: Se preparó MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> (0,5 mM), KCl (2 mM), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (5 mM), Fe (100 μM), Ni, Zn (5 μM), Mn, B, W, Mo, Se (2 μM) para el crecimiento del cultivo. El medio se transfirió al biorreactor y se trató en autoclave a 121°C durante 45 minutos. Después del tratamiento en autoclave, el medio se complementó con tiamina, pantotenato (0,05 mg), biotina (0,02 mg) y se redujo con cisteína-HCl 3 mM. Para lograr las condiciones anaerobias el recipiente de reacción se lavó con nitrógeno a través de un filtro de 0,2 μm. Antes de la inoculación, el gas se intercambiaba por gas de fábricas de acero que contenía CO, introduciéndolo continuamente en el reactor. El flujo de gas se ajustó inicialmente a 80 ml/min, aumentando a 200 ml/min durante la fase exponencial media, mientras se incrementaba la agitación de 200 a 350 rpm. Se administró Na<sub>2</sub>S al reactor a 0,25 ml/h. Una vez alcanzada la DO<sub>600</sub> de 0,5, el biorreactor se cambió a modo continuo a una velocidad de 1,0 ml/min (Velocidad de dilución 0,96 d<sup>-1</sup>). Se tomaron muestras de medio para medir la biomasa y los metabolitos y se realizó un análisis del espacio libre superior del gas que fluía hacia dentro y hacia afuera de forma regular.

#### **Análisis de metabolitos**

El análisis HPLC de acetona, isopropanol y otros metabolitos se llevó a cabo utilizando un sistema de HPLC Agilent Serie 1100 equipado con un RID (Detector del Índice de Refracción) controlado a 35°C y una columna de ácido Orgánico Alltech IOA-2000 (150 x 6,5 mm, tamaño de partícula 5 μm) mantenido a 60°C. Se usó agua ligeramente

acidulada ( $H_2SO_4$  0,005 M) como fase móvil, con un caudal de 0,7 ml/min. Para separar las proteínas y otros residuos celulares, se mezclaron muestras de 400  $\mu$ l con 100  $\mu$ l de un ácido 5-sulfosalicílico al 2% (p/v) y se centrifugó a 14.000 x g durante 3 min para separar los residuos precipitados. Después se inyectaron 10  $\mu$ l del líquido sobrenadante en la HPLC para el análisis.

5 El análisis GC de la acetona, el isopropanol y otros metabolitos se realizó utilizando una GC del espacio libre superior de Agilent 6890N equipado con una fibra de 1 cm de PDMS 100 de Supelco, una columna Alltech EC-1000 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), y un detector de ionización de llama (FID). Se transfirieron muestras de 5 ml a un tubo Hungate, se calentaron a 40°C en un baño de agua y se expusieron a la fibra durante exactamente 5 min. El inyector se mantuvo a 250°C y se utilizó helio con un flujo constante de 1 ml/min como gas portador. El programa del horno fue 40°C durante 5 min, seguido de un incremento de 10°C/min hasta 200°C. La temperatura se incrementó después adicionalmente a 220°C con una tasa de 50°C/min seguido de un mantenimiento de 5 min a esta temperatura, antes de que la temperatura se hiciera disminuir a 40°C con una tasa de 50°C/min y un mantenimiento final de 1 min. El FID se mantuvo a 250°C con 40 ml/min de hidrógeno, 450 ml/min de aire y 15 ml/min de nitrógeno como gas constitutivo.

#### 15 **Análisis del espacio libre superior**

Las mediciones se llevaron a cabo en un GC Varian CP-4900 Micro con dos canales instalados. El canal 1 era una columna Mol-Sieve 10m que funcionaba a 70°C, argón a 200 kPa y un tiempo de flujo de retorno de 4,2 s, mientras el canal 2 era una columna PPQ 10m que funcionaba a 90°C, helio a 150 kPa y sin flujo de retorno. La temperatura del inyector para ambos canales fue de 70°C. Los tiempos de ejecución se ajustaron a 120 s, pero todos los picos de interés eluirían normalmente antes de 100 s.

#### **Modificación genética de *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii* para la producción de acetona utilizando la ruta Clostridial**

25 *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii* no son capaces de producir naturalmente acetona, por lo tanto la ruta de biosíntesis de acetona que existe en otras especies Clostridiales fue introducida en ambos organismos (Fig. 4). La primera etapa de la ruta de biosíntesis de acetona Clostridial a partir de acetil-CoA a acetoacetil-CoA es catalizada por una acetil-Coenzima A acetiltransferasa o tiolasa. La conversión de acetoacetil-CoA en acetona es catalizada a continuación por un conjunto especializado de enzimas complejo acetato/butirato-acetoacetato CoA-transferasa y acetoacetato descarboxilasa, que se pueden encontrar en pocos organismos como *C. acetobutylicum* y *C. beijerinckii* (Tab. 6).

30 **Tab. 6: Números de acceso de genes y enzimas implicados en la formación de acetona a isopropanol.**

Descripción	<i>C. acetobutylicum</i>		<i>C. beijerinckii</i>	
	ácido nucleico	aminoácido	ácido nucleico	Aminoácido
<b>Tiolasa (ThIA)</b>	NC_003030.1; GI: 1119056	NP_349476.1	NC_009617; GI: 5294796	YP_001310706.1
<b>Acetato/Butirato-acetoacetato transferasa subunidad A (CtfA)</b>	<b>CoA-</b> NC_001988.2; GI: 1116168	NP_149326.1	NC_009617; GI: 5294994	YP_001310904.1
<b>Acetato/Butirato-acetoacetato transferasa subunidad A CtfB</b>	<b>CoA-</b> NC_001988.2; GI: 1116169	NP_149327.1	NC_009617; GI: 5294995	YP_001310905.1
<b>Acetoacetato descarboxilasa (Adc)</b>	NC_001988.2; GI: 1116170	NP_149328.1	NC_009617; GI: 5294996	YP_001310906.1

Mientras los genes de *C. acetobutylicum* que codifican las respectivas enzimas se dividen en 2 operones, los genes de *C. beijerinckii* forman un operón común, lo que los autores de la presente invención consideran que ofrece una ventaja. Los genes que codifican una tiolasa de *C. acetobutylicum* y el operón que codifica las enzimas acetato/butirato-acetoacetato CoA-transferasa subunidad A, acetato/butirato-acetoacetato CoA-transferasa subunidad B y acetoacetato descarboxilasa se ensamblaron en un operón sintético bajo el control de un promotor de *C. autoethanogenum* nativo, fuerte (Fig. 3). Esta construcción se utilizó para modificar genéticamente ambos organismos para la producción de acetona. Con el fin de crear una cepa recombinante, se utilizó una metiltransferasa novedosa para metilar la construcción, que a continuación se transformó y se expresó en *C. autoethanogenum* DSM23693 y *C. ljungdahlii* DSM13528 (descrito en la presente memoria más adelante). La

producción de acetona se mostró en diferentes corrientes de gas industrial (agua de desecho de fábricas de acero, gas de síntesis).

**Construcción de plásmido de expresión con genes de la ruta de acetona Clostridial:**

5 En esta invención se utilizaron técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular convencionales [Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989; Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K: Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 1987]. Las secuencias de ADN de los genes biosintéticos de acetona se muestran en la Tab. 7. Se utilizó el promotor de la agrupación de Wood-Ljungdahl de *C. autoethanogenum* (aguas arriba del gen de la CO deshidrogenasa *acsA*) para la expresión de genes diana (Tab. 7).

10 **Tab. 7: Secuencias utilizadas para el plásmido de expresión de acetona Clostridial**

Descripción	Fuente	SEQ ID NO:
Tiolasa ( <i>thlA</i> )	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824; NC_003030.1; GI: 1119056	18
Acetoacetil-CoA: operón acetato Coenzima A transferasa A ( <i>ctfA</i> ), acetoacetil-CoA:acetato Coenzima A transferasa B ( <i>ctfB</i> ), y acetoacetato descarboxilasa ( <i>adc</i> )	<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052; NC_009617; región: 4,400,524-4,402,656; que incluye GI: 5294994, GI: 5294995, y GI: 5294996	47
Promotor de la agrupación Wood-Ljungdahl ( <i>P<sub>wL</sub></i> )	<i>Clostridium autoethanogenum</i> DSM10061	22

15 Se aisló ADBN genómico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824, *C. beijerinckii* NCIMB8052 y *C. autoethanogenum* DSM10061 utilizando un método modificado por Bertram y Dürre (Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. *Arch Microbiol* 1989, 151: 551-557). Se recogió un cultivo de 100 ml de toda la noche (6000 xg, 15 min, 4°C), se lavó con tampón de fosfato de potasio (10 mM, pH 7,5) y se suspendió en 1,9 ml de tampón STE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, Sacarosa 200 mM; pH 8,0). Se añadieron 300 µl de lisozima (~100.000 U) y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min, seguido de la adición de 280 µl de una solución de SDS al 10 % (p/v) y otra incubación durante 10 min. El ARN se digirió a temperatura ambiente mediante la adición de 240 µl de una solución de EDTA (0,5 M, pH 8), 20 µl de Tris-HCl (1 M, pH 7,5), y 10 µl de ARNasa A. A continuación, se añadieron 100 µl de Proteinasa K (0,5 U) y la proteólisis tuvo lugar durante 1-3 h a 37°C. Finalmente, se añadieron 600 µl de perclorato sódico (5 M), seguido de una extracción con fenol-cloroformo y una precipitación con isopropanol. La cantidad y calidad de ADN se inspeccionaron espectrofotométricamente.

25 Los genes biosintéticos de acetona y el promotor de la agrupación de Wood-Ljungdahl se amplificaron mediante PCR con oligonucleótidos de la Tab. 8 utilizando ADN Polimerasa iProof High Fidelity (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, EE.UU.) y el siguiente programa: desnaturalización inicial a 98°C durante 30 segundos, seguido de 32 ciclos de desnaturalización (98°C durante 10 segundos), recocido (50-62°C durante 30-120 segundos) y elongación (72°C durante 45 segundos), antes de una etapa de extensión final (72°C durante 10 minutos).

**Tab. 8: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de biosíntesis de acetona y la región promotora**

Descripción	Nombre oligonucleótido del	Secuencia de ADN (de 5' a 3')	SEQ ID NO:
ThIA	ThIA-Cac-NdeI-F	GTTTCATATGAAAGAAGTTGTAATAGC	23
	ThIA-Cac-EcoRI-R	CAAGAATTCCTAGCACTTTTCTAGC	24
Operón CtfA, CtfB, Adc	Ctf-adc-cbei-KpnI-F	CTAGGTACCAGGGAGATATTA AAAATG	25
	Ctf-adc-cbei-BamH1-R	CGTGGATCCTCTATATTGCTTTTATT	26

Descripción	Nombre oligonucleótido del	Secuencia de ADN (de 5' a 3')	SEQ ID NO:
P <sub>WL</sub>	Pwoodlj-NotI-F	AAGCGGCCGCAGATAGTCATAATAGTTCC	27
	Pwoodlj-NdeI-R	TTCCATATGAATAATCCCTCCTTAAAGC	28

La región promotora de 573 pb amplificada de la agrupación de Wood-Ljungdahl (P<sub>WL</sub>) se clonó en el vector lanzadera de *E. coli-Clostridium* pMTL 85141 (FJ797651.1; Nigel Minton, University of Nottingham, Reino Unido) [Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. A modular system for Clostridium shuttle plasmids. J Microbiol Methods. 2009, 78: 79-85] utilizando los sitios de restricción *NotI* y *NdeI* y la cepa DH5 $\alpha$ -T1<sup>R</sup>. El plásmido creado pMTL85147 y el producto de PCR de 1.194 pb del gen de la tiolasa se cortaron ambos con *NdeI* y *EcoRI*. Una ligación se transformó en *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan dando como resultado el plásmido pMTL85147-thIA. Con posterioridad, el fragmento de PCR de 2.177 pb amplificado del operón *ctfA-ctfB-adc* de *C. beijerinckii* NCIMB 8052 se clonó en este vector utilizando *KpnI* y *BamHI* y *E. coli* ABLE K, creando un plásmido pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-  
 10 *adc*. El inserto del plásmido resultante pMTL85147-thIA-ctfAB-*adc* se secuenció completamente utilizando los oligonucleótidos proporcionados en la Tab. 9 y los resultados confirmaron que los genes de biosíntesis de acetona y la región promotora estaban libres de mutaciones (Fig. 5).

**Tab. 9: Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación**

Nombre del oligonucleótido	Secuencia de ADN (de 5' a 3')	SEQ ID NO:
Seq-ThIA-CtfAB-Adh 3539-4139	CAGAGGATGTTAATGAAGTC	29
Seq-ThIA-CtfAB-Adh 4140-4740	CTGTGCAGCAGTACTTGT	30
Seq-ThIA-CtfAB-Adh 4741-5341	GCAATGATACAGCTT	31
Seq-ThIA-CtfAB-Adh 5342-5942	AACCTTGGAATAGGACTTC	32
Seq-ThIA-CtfAB-Adh 6544-7144	TGTGAACTAATATGTGCAGA	33
M13 Directo	GTA AACGACGGCCAG	56
M13 Inverso	CAGGAAACAGCTATGAC	57

15 **Producción de acetona en *E. coli* con los genes de la ruta de acetona Clostridial:**

Para confirmar la funcionalidad del plásmido construido, se obtuvo un perfil metabólico de un cultivo durante la noche de 5 ml de *E. coli* ABLE K que albergaba el plásmido pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-*adc* utilizando GC y HPLC, confirmando la producción de acetona.

20 Para investigar esto, se llevaron a cabo experimentos de crecimiento detallados adicionales por triplicado con medio SD-8 mínimo que contenía 25  $\mu$ g/ml de cloramfenicol y *E. coli* XL-1 Blue MRF' Kan que portaba el plásmido pMTL 85147 (control negativo) o el plásmido de expresión pMTL 85147-thIA-ctfA-ctfB-*adc* (Fig. 42). Si bien no se pudo observar producción de acetona en el control negativo, se midió una producción máxima promedio de acetona de 75,05 mg/L con una biomasa seca promedio de 1,44 g/L para la cepa que portaba el plásmido de acetona.

**Metilación del plásmido de expresión con genes de la ruta de acetona Clostridial:**

25 La metilación del plásmido de expresión de acetona pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-*adc* se llevó a cabo *in vivo* en *E. coli* utilizando un gen de metiltransferasa de Tipo II híbrido sintetizado (SEQ\_ID NO 35) diseñado a partir genes de metiltransferasa de *C. autoethanogenum*, *C. ragsdalei* y *C. ljungdahlii*. La metiltransferasa (SEQ\_ID NO 34) se sintetizó y se fusionó con un promotor *lac* inducible en el vector pGS20 (ATG:biosynthetics GmbH, Merzhausen, Alemania) (Fig. 6; SEQ\_ID NO 49).

30 Tanto el plásmido de expresión como el plásmido de metilación se transformaron en las mismas células de *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan negativas para la restricción, lo que es posible debido a sus orígenes de replicación Gram(-)

compatibles (elevado número de copias de ColE1 en el plásmido de expresión y bajo número de copias de p15A en el plásmido de metilación). La metilación *in vivo* fue inducida por la adición de IPTG 1 mM, y los plásmidos metilados se aislaron utilizando QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). La mezcla resultante se utilizó para los experimentos de transformación con *C. autoethanogenum* DSM23693 y *C. ljungdahlii* DSM 13528, pero solamente el plásmido de expresión abundante (elevado número de copias) tiene un origen de replicación Gram-(+) (*repL*) que permite la replicación en Clostridia.

#### **Transformación del plásmido de expresión de acetona metilado en *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii*:**

Para hacer competentes las células de *C. autoethanogenum* DSM23693 y *C. ljungdahlii* DSM 13528, se subcultivó un cultivo de 50 ml (medio PETC (Tab. 2) con gas de fábricas de acero y fructosa como fuente de carbono; 37°C) en medio de nueva aportación durante 3 días consecutivos. Estas células se usaron para inocular 50 ml de medio PETC que contenía DL-treonina 40 mM a una DO<sub>600nm</sub> de 0,05. Cuando el cultivo alcanzó una DO<sub>600nm</sub> de 0,4, las células se transfirieron a una cámara anaerobia y se recuperaron a 4.700 x g y 4°C. El cultivo se lavó dos veces con tampón de electroporación enfriado con hielo (sacarosa 270 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, fosfato sódico 7 mM, pH 7,4) y finalmente se suspendió en un volumen de 500 µl de tampón de electroporación de nueva aportación. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación previamente enfriada con una separación entre electrodos de 0,4 cm que contenía ~1 µg de la mezcla de plásmido metilado. Puesto que se identificó un sistema de restricción de Tipo I adicional en el genoma de *C. ljungdahlii* en comparación con *C. autoethanogenum*, se añadieron 5 µl de un inhibidor de restricción de Tipo I (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI 53713, EE.UU.) a la mezcla de plásmido, lo que incrementó la eficacia de transformación de *C. ljungdahlii* en 2-10 veces. Las células se mezclaron con el plásmido y el inhibidor de restricción e inmediatamente se pulsaron utilizando un sistema de electroporación Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, EE.UU.) con los siguientes ajustes: 2,5 kV, 600 Ω y 25 µF. Las constantes de tiempo estuvieron entre 3,7-5,1 ms. Para la regeneración, el cultivo se transfirió en 5 ml de medio de regeneración especial (Tab. 10), lo que incrementó la recuperación de las células, que se controló a una longitud de onda de 600 nm utilizando un Espectrofotómetro Spectronic Helios Epsilon (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA 02454, EE.UU.) equipado con un soporte para tubos. Una vez que se observó crecimiento (una duplicación) las células se cosecharon, se suspendieron en 200 µl de medio de nueva aportación y se cultivaron en placa sobre placas PETC selectivas con 15 µg/ml de tiamfenicol (disuelto en dimetilfurano (DMF) al 100 % (v/v)) y 206,84 kpa (30 psi) de gas de fábricas de acero en el espacio libre superior. Después de 4-6 días, estuvieron visibles 50-200 colonias, que se utilizaron para inocular 2 ml de medio PETC que contenía 15 µg/ml de tiamfenicol (en DMF) y fructosa y 206,84 kpa (30 psi) de gas de fábricas de acero como fuente de carbono. Cuando se produjo crecimiento, el cultivo se aumentó a escala a 5 ml y más tarde a 50 ml de medio PETC que contenía 15 µg/ml de tiamfenicol (en DMF) y 206,84 kpa (30 psi) de gas de fábricas de acero en el espacio libre superior como única fuente de carbono.

**Tab. 10: Medio de regeneración**

Componente del medio	Concentración por 1,0 litros de medio
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
Solución de metales traza (véase la Tab. 2)	10 ml
Solución de vitamina de Wolfe (véase la Tab. 2)	10 ml
Extracto de levadura	2 g
Resazurina (2 g/l de cultivo de partida)	0,5 ml
Ácido 2-(N-morfolino)etanesulfónico (MES)	20 g
Agente reductor	0,006-0,008 % (v/v)

Componente del medio	Concentración por 1,0 litros de medio
Fructosa	5 g
Acetato de sodio	0,25 g
Fe (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,05 g
Ácido nitriolotriacético	0,05 g
pH 5,7	Ajustado con NaOH

**Confirmación de la transformación satisfactoria de *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii* con plásmido para acetona con genes de la ruta de acetona Clostridial:**

5 Para verificar la transferencia de ADN, se preparó una mini prep de plásmido a partir de 10 ml de volumen de cultivo utilizando el kit miniprep de plásmido Zyppy (Zymo Research, Irvine, CA 92614, EE.UU.). Puesto que la calidad del plásmido aislado no era suficiente para un producto digerido con enzimas de restricción debido a la actividad exonucleasa Clostridial [Burchardt G y Dürre P, Isolation and characterization of DNase-deficient mutants of Clostridium acetobutylicum. Curr Microbiol 1990, 21: 307-311] con el plásmido aislado como molde, se utilizaron los cebadores ctf-*adc*-cbei-KpnI-F (Seq\_ID no 25) y ctf-*adc*-cbei-BamH1-R (SEQ\_ID NO 26) para confirmar la presencia del plásmido (Fig. 7). La PCR se llevó a cabo usando el kit de PCR iNtRON Maximise Premix (Intron Bio Technologies) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C durante 20 segundos), reasociación (55°C durante 20 segundos) y elongación (72°C durante 135 segundos), antes de una etapa de extensión final (72°C durante 5 minutos).

15 Para confirmar la identidad de los clones, el ADN genómico se aisló utilizando el protocolo proporcionado más arriba de cultivos de 50 ml de cada uno de *C. autoethanogenum* DSM23693 y *C. ljungdahlii* DSM13528. Se llevó a cabo una PCR frente al gen de ARNr 16s utilizando los oligonucleótidos fd1 (SEQ\_ID NO 36: CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y rP2 (SEQ\_ID NO 37: CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTACGACTT) [Weisberg WG, Barns SM, Pelletier BA y Lane DJ, 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 1990, 173: 697-703] y el kit iNtRON Maximise Premix PCR (Intron Bio Technologies, Sangdaewon Joongwon Seognam Kyunggi, Korea) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C durante 20 segundos), reasociación (55°C durante 20 segundos) y elongación (72°C durante 60 segundos), antes de una etapa de extensión final (72°C durante 5 minutos). Todas las secuencias obtenidas tenían >99,9 % de identidad frente al gen de ARNr 16s (*rrsA*) de *C. autoethanogenum* (Y18178, GI:7271109) y respectivamente *C. ljungdahlii* (CP001666.1; GI:300433347).

**Producción de acetona a partir de CO y CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> con genes de la ruta de acetona Clostridial en *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii*:**

30 Se llevaron a cabo experimentos de crecimiento con *C. autoethanogenum* DSM23693 y *C. ljungdahlii* DSM 13528 transformados que portaban el plásmido pMTL85147-*thiA*-*ctfAB*-*adc* en 250 ml de medio PETC (Tab. 2; sin fructosa y extracto de levadura) en frascos Schott de 1 litro con tapones de goma y gas de fábricas de acero a 206,84 kpa (30 psi) (recogido de la planta de New Zealand Steel en Glenbrook, NZ; composición: 44% de CO, 32% de N<sub>2</sub>, 22% de CO<sub>2</sub>, 2% de H<sub>2</sub>) en el espacio libre superior como única fuente de energía y carbono. La producción de acetona se confirmó con ambas cepas utilizando análisis de HPLC y GC. En los frascos Schott, se alcanzaron concentraciones de acetona de alrededor de 0,3 g/l (6,5 mM) después de 48 horas tanto con *C. autoethanogenum* DSM23693 (Fig. 8 y 10) como con *C. ljungdahlii* DSM 13528 (Fig. 9 y 10). Utilizando condiciones apropiadas, la acetona producida se puede convertir después adicionalmente en isopropanol. También se demostró una producción de acetona de 153 mg/ml en gas de síntesis de biomasa a 206,84 kpa (30 psi) (Range Fuels Inc., Broomfield, CO; composición: 29 % de CO, 45 % de H<sub>2</sub>, 13 % de CH<sub>4</sub>, 12 % de CO<sub>2</sub>, 1 % de N<sub>2</sub>) como única fuente de energía y carbono en 50 ml de medio PETC (Tab. 2; sin fructosa ni extracto de levadura) en frascos de suero con *C. autoethanogenum* DSM23693 (Fig. 11).

**Expresión de heterólogos con genes de la ruta de acetona Clostridial en *C. autoethanogenum*:**

40 Se llevaron a cabo experimentos de qRT-PCR para confirmar la expresión satisfactoria de los genes introducidos *thiA*, *ctfA*, *ctfB*, y *adc* que conducían a la producción de acetona en *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii*. Se pudieron detectar satisfactoriamente señales para todos los genes (Fig. 52 y 53).

Un cultivo de 50 ml de cada uno de *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii* que albergaban el plásmido pMTL85147, cosechado por centrifugación (6.000 x g, 5 min, 4°C), se sometió a congelación instantánea en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta la extracción del ARN. El ARN total se aisló utilizando PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se hizo eluir en 100 µL de agua libre de ARNasa. Después del tratamiento con ADNasa I (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EE.UU.), se llevó a cabo la etapa de transcripción inversa utilizando SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). El ARN se comprobó usando un dispositivo Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), fluorómetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y por electroforesis en gel. Se realizó un control distinto de RT para cada par de cebadores. Todas las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo por duplicado utilizando un MyiQ Single Colour Detection System (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, EE.UU.) en un volumen de reacción total de 15 µL con 25 ng de molde de ADNc, 67 nM de cada cebador (Tabla 17), y 1x iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Carlsbad, CA, EE.UU.). Las condiciones de reacción fueron 95°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 55°C durante 15 s y 72°C durante 30 s. Para la detección de dimerización de cebadores u otros artefactos de amplificación, se llevó a cabo un análisis de la curva de fusión inmediatamente después de completarse la qPCR (38 ciclos de 58°C a 95°C a 1°C/s). Se incluyeron dos genes constitutivos (Guanilato quinasa y formiato tetrahidrofolato ligasa) para cada muestra de ADNc para la normalización. La obtención de expresión génica relativa se llevó a cabo utilizando Relative Expression Software Tool (REST©) 2008 V2.0.7 (38). Se usaron diluciones seriadas de ADNc que abarcaban 4 unidades logarítmicas para generar curvas de referencia y las eficacias de amplificación relativas resultantes para calcular la concentración de ARNm.

20 **Tabla 17: Oligonucleótidos para qRT-PCR**

Diana	Nombre oligonucleótido del	Secuencia de ADN (de 5' a 3')	SEQ_I D NO.
Guanilato quinasa ( <i>gnk</i> )	GnK-F	TCAGGACCTTCTGGAAGCTGG	5
	GnK-R	ACCTCCCCTTTTCTTGGAGA	6
Formiato tetrahidrofolato ligasa (FoT4L)	FoT4L-F	CAGGTTTCGGTGCTGACCTA	7
	FoT4L-R	AACTCCGCCGTTGTATTTCA	8
Tiolasa A	thIA-RT-F	TTGATGAAATGATCACTGACGGATT	64
	thIA-RT-R	GAAATGTTCCATCTCTCAGCTATGT	65
Acetoacetil-CoA:Acetato transferasa B	CoA-ctfB-RT-F	CTAATACGAGGAGGACATGTTGATG	66
	CoA-ctfB-RT-R	CACCCATACCTGGGACAATTTTATT	67
Acetoacetil-CoA:Acetato transferasa A	ctfA-RT-F	GGGCTGCTACTAAAAATTTCAATCC	68
	CoA-ctfA-RT-R	CAGGAGTCATTATGGCATCTCTTTT	69
Acetoacetato descarboxilasa	adc-RT-F	TAGTACCAGAGCCACTTGAATTAGA	70
	adc-RT-R	GGAATAGCTTGACCACATTCTGTAT	71

**Conversión de acetona en isopropanol por medio de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y *C. ragsdalei*:**

La acetona se puede convertir adicionalmente en isopropanol por la acción de una alcohol deshidrogenasa. No obstante, solo se han descrito unos pocos microorganismos tales como *C. beijerinckii* NRRL-B593 que producen isopropanol, y las enzimas conversoras de acetona en isopropanol son muy raras en la naturaleza. Por ahora, solamente se han identificado dos alcohol secundario deshidrogenasas y se han descrito hasta la fecha, la de *C. beijerinckii* NRRL-B593 [Ismaiel AA, Zhu CX, Colby GD, Chen JS: Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. J Bacteriol 1993, 175: 5097-5105]

(SEQ\_ID NO 38-39) y la de *Thermoanaerobacter brockii* [Peretz M y Burstein Y: Amino acid sequence of alcohol dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermoanaerobium brockii*. Biochemistry. 1989, 28:6549-6555] (SEQ\_ID NO 40-41).

5 Por lo tanto, se sometió a prueba una colección de microorganismos - bacterias acetogénicas, Clostridia que producen acetona e isopropanol y *E. coli* - para determinar su capacidad para convertir acetona en isopropanol (Tab. 11).

**Tab. 11: Adición de acetona a cultivos en crecimiento de diversos microorganismos.**

Organismo/Muestra	Descripción	Medio	Directamente después de la adición de acetona		Fin del crecimiento	
			Acetona [g/l]	Isopropanol [g/l]	Acetona [g/l]	Isopropanol [g/l]
<i>Acetobacterium woodii</i> DSM1030	Especies acetogénicas	PETC (pH 8,2)	10,81	0	10,83	0
<i>Clostridium aceticum</i> DSM1496		PETC (pH 7,4)	10,07	0	10,09	0
<i>C. autoethanogenum</i> DSM23693		PETC (pH 5,9)	9,25	0	1,13	8,03
<i>C. carboxidivorans</i> DSM15243			10,43	0	10,34	0
<i>C. ljungdahlii</i> DSM13528			10,23	0	3,73	6,54
<i>C. ragsdalei</i> ATCC BAA-622			11,25	0	9,94	1,34
<i>C. beijerinckii</i> NRRL-B593	Especies productoras de isopropanol	RCM	9,96	0	7,65	2,54
<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052	Especies productoras de acetona		10,49	0	10,59	0
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824			10,80	0	10,91	0
<i>Escherichia coli</i> DH5 (Invitrogen)		LB glucosa +	11,67	0	11,71	0
Medio blanco	Control	PETC	10,51	0	10,55	0

10 Todos los cultivos se inocularon a una  $DO_{600nm}$  de 0,1 en 50 ml de medio apropiado que contenía una fuente de carbono heterótrofa y gas de fábricas de acero a 206,84 kpa (30 psi). Se dejó que los cultivos se duplicaran ( $DO_{600nm} = 0,2$ ) antes de añadir la acetona. Se tomó una muestra y se analizó mediante HPLC y GC inmediatamente después de la adición de acetona y de nuevo al final del crecimiento (que estuvieron seguidos de la medición de la densidad óptica). Los resultados se resumen en la Tab. 11. Se utilizó medio blanco como control negativo.

15 Como se esperaba, la cepa productora de isopropanol *C. beijerinckii* NRRL-B593 [George HA, Johnson JL, Moore WEC, Holdeman LV, Chen JS: Acetone, isopropanol, and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. Appl Environ Microbiol 45: 1160-1163] tenía la capacidad de reducir la acetona añadida externamente a isopropanol por la acción de su alcohol deshidrogenasa. Una cepa

diferente de *C. beijerinckii*, NRCIMB8052, que carecía de esta enzima no fue capaz de convertir la acetona en isopropanol, como *C. acetobutylicum* ATCC-824 productora de acetona. Lo mismo se verificó también para *E. coli*.

Sorprendentemente, se encontró que tres bacterias acetogénicas carboxidotrofas *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y *C. ragsdalei*, que forman una subagrupación dentro del Grupo I de Homología del ARNr Clostridial, eran capaces también de convertir acetona en isopropanol, mientras otras bacterias acetogénicas sometidas a prueba no pudieron utilizar la acetona (Tab. 11). A continuación se sometió a prueba la conversión de diferentes cantidades de acetona en isopropanol por *C. autoethanogenum* utilizando diferentes concentraciones (Tab. 12).

**Tab. 12: Conversión de diferentes concentraciones de acetona en isopropanol por cultivos de *C. autoethanogenum* DSM23693.**

Acetona [g/l] añadida	Acetona [g/l] que queda al final del crecimiento	Isopropanol [g/l] que queda al final del crecimiento
0	0	0
1,66	0,22	1,48
9,25	1,13	8,03
26,13	17,82	8,39
50,01	43,30	6,95

Se llevó a cabo un estudio en reactor con *C. autoethanogenum* DSM23693 para demostrar la conversión eficaz de acetona en isopropanol a tasas elevadas. El reactor se configuró como se ha descrito anteriormente. Una vez en el modo continuo con una producción de biomasa y metabolito estable, se añadió acetona tanto al biorreactor como al medio de alimentación. La acetona se incorporó al reactor a un cierto nivel, que se obtuvo después mediante alimentación continua. Inicialmente, se añadió 1 g/L de acetona, una vez que las concentraciones de metabolitos se hubieron estabilizado, la concentración se incrementó a 5 g/L, 15 g/L, y en un segundo experimento a 20 g/L. Incluso a concentraciones elevadas de 20 g/L el cultivo convirtió toda la acetona en isopropanol a una tasa elevada demostrando que la alcohol primario:secundario deshidrogenasa identificada es altamente eficaz (Fig. 74).

#### **Identificación de una alcohol deshidrogenasa novedosa en *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y *C. ragsdalei*:**

Para confirmar que la conversión de acetona en isopropanol por *C. autoethanogenum* está conducida enzimáticamente, se llevaron a cabo ensayos enzimáticos con extracto bruto de *C. autoethanogenum* 23693, *C. beijerinckii* NRRL-B593, y *C. carboxidivorans* DSM15243 de acuerdo con Ismaiel et al [Ismaiel AA, Zhu CX, Colby GD, Chen JS: Purification and characterization of a primary-secondary alcohol deshidrogenasa de two strains of *Clostridium beijerinckii*. J Bacteriol 1993, 175: 5097-5105]. Se obtuvieron extractos brutos mediante sonicación y tratamiento con lisozimas (100.000 U/mL) de cultivos exponenciales tardíos. Los desechos celulares se eliminaron por centrifugación y se determinó la concentración de proteínas utilizando el ensayo de proteína Pierce BCA - compatible con agente reductor (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA 02454, EE.UU.). La mezcla de ensayo (1 ml) contenía tampón Tris 50 mM (pH 7,5), ditiotreitól 1 mM (DTT), y NAD(P)H 0,2 mM. La reacción se inició añadiendo 10 mM de la acetona sustrato (de una dilución 1:10 en agua) y se hizo un seguimiento espectrofotométricamente con Spectramax M2 (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA 94089-1136, EE.UU.) a una longitud de onda de 365 nm. Se utilizó H<sub>2</sub>O como control negativo en lugar de extracto bruto y acetona respectivamente. La actividad de la enzima se pudo detectar con extractos brutos de *C. beijerinckii* y *C. autoethanogenum* y NADPH (no NADH), pero no con extractos brutos de *C. carboxidivorans* DSM15243 o H<sub>2</sub>O (tanto con NADPH como con NADH). Esto demuestra que la conversión de acetona en isopropanol por *C. autoethanogenum* es dirigida enzimáticamente, y como no se detectó actividad con NADH, la enzima parece ser dependiente de NADPH.

Mediante secuenciación y análisis cuidadoso, se identificó un gen/enzima alcohol deshidrogenasa novedoso en las tres cepas, *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y *C. ragsdalei* (Fig. 1; SEQ ID NO: 1-4). Se encontró que la secuencia de aminoácidos era idéntica en las tres especies y compartía cierta homología con la alcohol primario-secundario deshidrogenasa de *C. beijerinckii* NRRL-B593 (87 %) y *T. Brockii* ATCC 53556 (76 %) (Tab. 13). En comparación con la alcohol secundario deshidrogenasa bien descrita de *C. beijerinckii* NRRL-B593 [Ismaiel AA, Zhu CX, Colby GD, Chen JS: Purification and characterization of a primary-secondary alcohol deshidrogenasa from two strains of *Clostridium beijerinckii*. J Bacteriol 1993, 175: 5097-5105], se encontraron un total de 49 cambios de aminoácidos. 4 aminoácidos del centro catalítico de la proteína están conservados, sin embargo, otros aminoácidos

del dominio catalítico no lo están (Fig. 1). Una búsqueda de motivos pronosticó que el gen/enzima de la alcohol deshidrogenasa novedoso era cinc y era dependiente de NAD(P)H. Se encontró que los respectivos genes que codificaban la alcohol deshidrogenasa novedosa eran 98 % idénticos en las 3 especies *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y *C. ragsdalei*, pero solamente 82 % idénticos al de *C. bejerinckii* y 72 % idénticos al de *T. brockii* (Tab. 14).

5

**Tab. 13: Comparación de secuencias de aminoácidos de la alcohol deshidrogenasa novedosa y las alcohol secundario deshidrogenasas conocidas**

Organismo	Descripción	Seq ID	Número de acceso	Referencia	Puntuación	Valor e	Identidad
<i>C. autoethanogenum</i>	-	SEQ_ID NO.1	-	-	717 bits (1852)	0	351/351 (100%)
<i>C. ljungdahlii</i>	alcohol deshidrogenasa que contiene cinc	SEQ_ID NO.1	YP_003780646.1	-	717 bits (1852)	0	351/351 (100%)
<i>C. ragsdalei</i>	-	SEQ_ID NO.1	-	-	717 bits (1852)	0	351/351 (100%)
<i>C. bejerinckii</i> NRRL B-593	alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP	SEQ ID NO: 38	P25984.2	Ismaiel et al., 1993	630 bits (1626)	7E-179	302/351 (87%)
<i>T. brockii</i> ATCC 53556	alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP	SEQ ID NO: 40	P14941.1	Peretz and Burstein, 1989	557 bits (1436)	7E-157	264/351 (76%)

**Tab. 14: Comparación de secuencias de ácido nucleico la alcohol deshidrogenasa novedosa y alcohol secundario deshidrogenasas conocidas**

10

Organismo	Descripción	Seq ID	Número de acceso	Referencia	Puntuación	Valor e	Identidad
<i>C. autoethanogenum</i>	-	SEQ_ID NO.2	-	-	1905 bits (2112)	0	1056/1056 (100%)
<i>C. ljungdahlii</i>	alcohol deshidrogenasa que contiene cinc	SEQ_ID NO.3	CP001666.1	-	1900 bits (2106)	0	1055/1056 (99%)
<i>C. ragsdalei</i>	-	SEQ_ID NO.4	-	-	1803 bits (1998)	0	1033/1056 (98%)
<i>C. bejerinckii</i> NRRL B-593	alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP	SEQ ID NO: 39	AF157307.2	-	558 bits (618)	0	861/1056 (82%)
<i>T. brockii</i>	alcohol deshidrogenasa	SEQ ID NO: 41	X64841.1	-	562 bits (622)	3,00E-155	757/1053 (72%)

#### **Estudios de expresión de la alcohol deshidrogenasa novedosa de *C. autoethanogenum***

Para identificar, si el gen que codificaba la alcohol deshidrogenasa novedosa era activo durante una fermentación normal con *C. autoethanogenum*, así como para identificar las regiones promotoras potenciales para la expresión excesiva del gen, se llevó a cabo un estudio de qRT-PCR con más de 250 genes.

15

Se tomaron muestras de una ronda de fermentación discontinua de 1,5 L típica como se ha descrito anteriormente a lo largo de todo el crecimiento (4 días). Las muestras se cosecharon por centrifugación (6.000 x g, 5 min, 4°C) y el sedimento celular se sometió a congelación instantánea en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Se aisló el ARN descongelando el sedimento celular sobre hielo y suspendiéndolo en 100 µL de solución de lisozima (50.000 U de lisozima, 0,5 µL de SDS al 10%, Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM; pH 8). Después de 5 minutos, se añadieron 350 µL de tampón de lisis (que contenía 10 µl de 2-mercaptoetanol. La suspensión de células se interrumpió mecánicamente pasando cinco veces a través de una aguja de calibre 18-21. A continuación el ARN se aisló utilizando PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, EE.UU.) y se hizo eluir en 100 µL de agua libre de ARNasa. El ARN se comprobó mediante PCR y electroforesis en gel y se cuantificó espectrofotométricamente, y se trató con ADNasa I (Roche) cuando fue necesario. La etapa de transcripción inversa se llevó a cabo utilizando SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, EE.UU.). Las reacciones de RT-PCR se realizaron en MyiQ Single Colour Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, EE.UU.) en un volumen de reacción de 15 µL con 25 ng de molde de ADNc, 67 nM de cada cebador (Tab. 15), y 1x iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, EE.UU.). Se utilizaron guanilato quinasa (GnK) y formiato tetrahidrofolato ligasa (FoT4L) como gen constitutivo y no se incluyeron moldes de control. Las condiciones de reacción fueron 95°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 55°C durante 15 s y 72°C durante 30 s. Se realizó un análisis de curvas de fusión inmediatamente después de completarse la qRT PCR (38 ciclos de 58 °C a 95 °C a 1°C/s), para la detección de la dimerización de cebadores u otros artefactos de amplificación. Los datos del nivel de expresión se computaron en forma de valores del ciclo umbral (C<sub>t</sub>) basándose en el método de ajuste de la curva con valores de referencia sustraídos de la PCR calculados mediante el soporte lógico Biorad iQ5 2.0. Los valores C<sub>t</sub> brutos se analizaron adicionalmente utilizando Relative Expression Software Tool (REST©) 2008 V2.0.7.

**Tab. 15: Oligonucleótidos para RT-PCR**

Diana	Nombre del oligonucleótido	Secuencia de ADN (de 5' a 3')	SEQ_ID NO
Guanilato quinasa ( <i>gnk</i> )	GnK-F	TCAGGACCTTCTGGAAGTGG	5
	GnK-R	ACCTCCCCTTTTCTTGGAGA	6
Formiato tetrahidrofolato ligasa (FoT4L)	FoT4L-F	CAGGTTTCGGTGCTGACCTA	7
	FoT4L-F	AACTCCGCCGTTGTATTTCA	8
CO deshidrogenasa ( <i>acsA</i> )	acsA-F	ACAAGA TGGGGTCGAAACAGTTTGG	9
	acsA-R	TGGCACTGGACTTACTCTACATGGG	10
Formil-THF sintasa ( <i>fhs</i> )	fhs-F	TATTTCCGAAGATGATATTGAATTGTATGG	11
	fhs-R	TCCAGCAGGTGTTGGGTTTATAGC	12
Formimido-THF	fchA-F	AGCTGCAACTCCTGGTGGAGGC	13
Ciclodesaminasa ( <i>fchA</i> )	fchA-R	GCCTTTTACCTTTTCGTCATACTGTGC	14
Metileno-THF deshidrogenasa	foID-F	GCTTACATTAGTAAGAGTTGGAGCAAA CG	15
Formil-THF ciclohidrolasa ( <i>foID</i> )	foID-R	ACTTGTCTGTGATATATCTGCTGGTAG C	16
Alcohol deshidrogenasa ( <i>adh</i> )	Adh-F	GGTCCTTATGATGCGATTGTACATCC	17
	Adh-R	GCTATTTACCTACAGCTTCATGGCC	18

El resultado del estudio de qRT-PCR mostró que el gen para la alcohol deshidrogenasa novedosa se expresaba a lo largo de todo el crecimiento a un nivel relativamente constante y solamente cesaba al final del crecimiento (Fig. 2). En comparación con más de 200 genes seleccionados de cada parte del metabolismo, el gen de la alcohol deshidrogenasa pertenece a los 50 genes más expresados. La expresión génica más alta de todos los genes analizados mostró los genes del operón de Wood-Ljungdahl, con un nivel de ARNm más de 10 veces más alto que el gen de la alcohol deshidrogenasa (Fig. 2). La respectiva región promotora (SEQ\_ID NO 22) es por lo tanto ideal para expresar en exceso genes, tales como los genes para las enzimas de biosíntesis de acetona y un gen de alcohol deshidrogenasa, aunque en el caso de la expresión en exceso de un gen de alcohol deshidrogenasa nativo para los microorganismos puede requerir una modificación genética adicional para garantizar suficiente disponibilidad de co-factores. Esto podría incluir, por ejemplo, la expresión (en exceso) de genes adicionales para aumentar la reserva de NADPH tales como la transhidrogenasa, la eliminación de reacciones que consuman NADPH competidoras, o la modificación genética de proteínas para cambiar el requerimiento de co-factores por NADH. Otras regiones promotoras útiles identificadas para la expresión en exceso de genes incluyen la región promotora del operón F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa (SEQ\_ID NO 51), el operón complejo Rnf (SEQ\_ID NO 52), y la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (SEQ\_ID NO 53).

#### **Producción de isopropanol a partir de CO y CO<sub>2</sub>H<sub>2</sub> por *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii* con el plásmido de expresión que contiene genes de acetona Clostridiales**

Se demostró que los cultivos en frascos Schott de 250 mL de cepas recombinantes de *C. autoethanogenum* DSM23693 y *C. ljungdahlii* DSM 13528 que portaban el plásmido de expresión de acetona pMTL85147-thIA-ctfAB-*adc* producían acetona, pero no se pudo detectar isopropanol (Fig. 8 + 9). Esto podría ser debido a la carencia de poder reductor al final del crecimiento, debido a las condiciones estáticas dadas en los frascos Schott, donde el CO se agota en el espacio libre superior y no es alimentado constantemente como en un procedimiento de fermentación discontinuo o continuo. Los equivalentes reductores tales como NAD(P)H o ferredoxina son generados por el CO, pero también se consumen para la producción de etanol, que ya se produce durante el crecimiento estacionario exponencial y temprano. En este punto es la concentración de la acetona producida, que es necesaria como precursor para la producción de isopropanol, la que es todavía relativamente baja.

Por lo tanto, ambos cultivos fueron re-gasificados con 206,84 kps (30 psi) de gas de fábricas de acero de nueva aportación después de 48 h de crecimiento y también re-inoculados. Si bien la biomasa no aumentó mucho más, parte de la acetona producida se convirtió en isopropanol en 24 horas (Tab. 16).

**Tab. 16: Conversión de acetona en isopropanol por cultivos de *C. autoethanogenum* DSM23693 y *C. ljungdahlii* DSM 13528**

Organismo	Acetona [mg/l]		Isopropanol [mg/l]	
	Después de 48 h	Después de 72 horas	Después de 48 h	Después de 72 horas
<i>C. autoethanogenum</i> + pMTL85147-thIA-ctfAB- <i>adc</i>	220	295	0	25
<i>C. ljungdahlii</i> + pMTL85147-thIA-ctfAB- <i>adc</i>	171	175	0	5

En un sistema de fermentación con suministro constante de CO, se encuentra presente suficiente poder reductor para una producción continua de isopropanol a partir de CO o CO/H<sub>2</sub> y tanto la acetona como el isopropanol se produjeron en una ronda de fermentación respectiva con *C. autoethanogenum* DSM23693 que portaba el plásmido de expresión de acetona pMTL85147-thIA-ctfAB-*adc*.

#### **Clonación de la alcohol deshidrogenasa novedosa**

La alcohol deshidrogenasa novedosa se clonó en el plásmido de expresión de acetona y se colocó bajo el control del promotor de Wood-Ljungdahl para la expresión en exceso del gen y la prueba de funcionalidad en *E. coli*.

La alcohol deshidrogenasa se amplificó a partir de ADN cromosómico de *C. autoethanogenum* DSM10061 aislado utilizando los oligonucleótidos SecAdh-Sall-F (SEQ\_ID NO 54: TATTTGTCGACTTAGGAGTTCTATTATGAAAGG) y SecAdh-XhoI-R (SEQ\_ID NO 55: AAAACTCGAGACATTTTTTAAATGCGACAG). El fragmento de la PCR de 1129 pb se clonó en el plásmido pMTL85147-thIA-ctfAB-*adc* utilizando *Sall* y *XhoI* y *E. coli* XL-1 Blue MRF' Kan. El plásmido resultante pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-*adc*-*adh* (SEQ\_ID NO 48; Fig. 43) se secuenció completamente utilizando los oligonucleótidos proporcionados en la Tab. 9 y los resultados confirmaron que los genes de biosíntesis de isopropanol y la región promotora estaban libres de mutaciones (Fig. 41).

**Producción de isopropanol con la alcohol deshidrogenasa novedosa de *C. autoethanogenum* en *E. coli***

Para someter a ensayo adicionalmente la funcionalidad de la alcohol deshidrogenasa novedosa de *C. autoethanogenum*, se llevaron a cabo experimentos de crecimiento utilizando *E. coli* XL-1 Blue MRF' Kan que expresaba solamente los genes de biosíntesis de acetona (que portaban el plásmido pMTL 85147-thlA-ctfA-ctfB-*adh*) y que expresaba los genes de biosíntesis de acetona mas la alcohol deshidrogenasa novedosa (que portaba el plásmido pMTL85147-thlA-ctfA-ctfB-*adh*) en 100 mL de medio mínimo SD-8 con cloramfenicol (Fig. 42).

Si bien no se pudo detectar isopropanol con la cepa que portaba el plásmido de acetona, se midió un máximo promedio de 32,7 mg/L de isopropanol con la cepa que expresaba adicionalmente la alcohol deshidrogenasa novedosa de *C. autoethanogenum*.

**Identificación de genes de *Lactococcus lactis* y *Saccharomyces cerevisiae* que confieren una actividad novedosa hacia acetona o isopropanol en *C. autoethanogenum***

Además de la ruta Clostridial de la acetona y el isopropanol, se identificaron dos enzimas, la Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (KivD) de *Lactococcus lactis* y una Alcohol deshidrogenasa (Adh2) de *Saccharomyces cerevisiae* (Tab. 18) que conferían actividad con vistas a la producción de acetona e isopropanol en *C. autoethanogenum*. No se había informado de que esas dos enzimas estuvieran implicadas en la producción de acetona o isopropanol o tuvieran funciones catalíticas sobre ninguno de los precursores de la ruta Clostridial de la acetona y el isopropanol. La expresión heteróloga de estas proteínas en *E. coli* (Atsumi et al., 2008. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. Nature, 451: 86-90) u otros organismos como *Corynebacterium glutamicum* (Blombach et al., 2011. Corynebacterium glutamicum tailored for efficient Isobutanol production. Appl. Environ. Microbiol. 77: 3300-10) o *Clostridium cellulolyticum* (Higashide W., et al. 2011. Metabolic Engineering of Clostridium cellulolyticum for Production of Isobutanol from Cellulose. Appl. Environ. Microbiol. 77: 2727-33) condujeron a la producción de alcoholes superiores de cadena ramifica como isobutanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol y 2-feniletanol a partir de precursores de aminoácidos, pero no se informó sobre cetona o isobutanol. La expresión de la Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (KivD) de codones optimizados de *Lactococcus lactis* sola o de una combinación de Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (KivD) de codones optimizados de *Lactococcus lactis* y una Alcohol deshidrogenasa (Adh2) de *Saccharomyces cerevisiae* en *C. autoethanogenum* sin embargo, condujo sorprendentemente a la producción de acetona e isopropanol.

**Tab. 18: Secuencias de *Lactococcus lactis* y *Saccharomyces cerevisiae* que confieren una actividad novedosa para acetona o isopropanol en *C. autoethanogenum***

Descripción		
	<b><i>L. lactis</i></b>	
	<b>ácido nucleico</b>	<b>aminoácido</b>
<b>Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (KivD)</b>	SEQ_ID NO 72	SEQ_ID NO 73;
	AJ746364	YP_003353820.1
	<b><i>S. cerevisiae</i></b>	
	<b>ácido nucleico</b>	<b>aminoácido</b>
<b>Alcohol deshidrogenasa (Adh2)</b>	SEQ_ID NO 74	SEQ_ID NO 75;
	NC_001145.2, ID Gen: 855349	AAA34408.1

**Construcción del plásmido de expresión con Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (KivD) de *Lactococcus lactis* y Alcohol deshidrogenasa (Adh2) de *Saccharomyces cerevisiae***

La Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD) de *L. lactis*, y la Alcohol deshidrogenasa (Adh2) de *S. cerevisiae* (Tab. 18) se sometieron a optimización de codones por medio de ATG:Biosynthetics GmbH (Merzhausen, Alemania) y se flanquearon con sitios de restricción para *Nde*I y *Kpn*I para su posterior subclonación. Se utilizó el promotor del operón Fosfotransacetilasa/Acetato quinasa de *C. autoethanogenum* para la expresión de genes diana. Todas las secuencias de ADN utilizadas se proporcionan en la Tab. 19.

**Tab. 19: Secuencias utilizadas para el plásmido de expresión con Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (KivD) de *Lactococcus lactis* y Alcohol deshidrogenasa (Adh2) de *Saccharomyces cerevisiae***

Descripción	Fuente	SEQ ID NO:
Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (KivD) y Alcohol deshidrogenasa (Adh2)	Codones optimizados	76-78
Región promotora del operón Fosfotransacetilasa/Acetato quinasa	<i>Clostridium autoethanogenum</i> DSM10061	79

- 5 La región promotora del operón fosfotransacetilasa-acetato quinasa ( $P_{pta-ack}$ ) se amplificó utilizando cebadores Ppta-ack-NotI-F (SEQ\_ID. No. 80: GAGCGGCCGCAATATGATATTTATGTCC) y Ppta-ack-NdeI-R (SEQ\_ID. No. 81: TTCCATATGTTTCATGTTTCATTTCTCC) y se clonó en el vector lanzadera de *E. coli-Clostridium* pMTL 85141 (FJ797651.1; Nigel Minton, University of Nottingham, Reino Unido) [Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. J Microbiol Methods. 2009, 78: 79-85] utilizando sitios de restricción *NotI* y *NdeI* y la cepa XL1-Blue MRF' Kan.
- 10 El gen de resistencia a antibióticos del plásmido creado pMTL85145 se reemplazó con posterioridad por un gen de resistencia a eritromicina de pMTL 82254 (FJ797646.1; Nigel Minton, University of Nottingham, Reino Unido) [Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. J Microbiol Methods. 2009, 78: 79-85] utilizando sitios de restricción *FseI* y *PmeI* y la cepa XL1-Blue MRF' Kan.
- 15 El plásmido creado pMTL85245 (SEQ\_ID. No. 80) y el producto de codones optimizados de 2746 pb de la agrupación de genes de la descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa (*Adh2*) se cortaron con *NdeI* y *KpnI*. Una ligación se transformó en *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan dando como resultado el plásmido pMTL85245-kivd-adh2 (SEQ\_ID. No. 83; Fig. 63). El inserto del plásmido resultante pMTL85245-kivd-adh se secuenció completamente utilizando los oligonucleótidos proporcionados en la Tab. 20 y los resultados confirmaron que los genes y la región promotora estaban libres de mutaciones.
- 20 El gen *kivD* solo se amplificó utilizando el par de cebadores M13 Inverso (SEQ\_ID. 57: CAGGAAACAGCTATGAC) y *Adh\_seqR1* (SEQ\_ID. 85; Tab. 16). El fragmento de la PCR de 2635 pb de *KivD* se clonó en el vector lanzadera de *E. coli-Clostridium* pMTL 85245 utilizando los sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI* y la cepa *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan, creando el plásmido pMTL85245-kivd (SEQ\_ID NO 84; Fig. 64). El inserto del plásmido resultante pMTL85245-kivd se secuenció completamente utilizando los oligonucleótidos proporcionados en la Tab. 20 y los resultados confirmaron que el gen de biosíntesis de acetona estaba libre de mutaciones.
- 25

**Tab. 20: Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación**

Adh_seqR1	TCAGTTCCTGTGGAATGTGTGC	SEQ ID No. 85
Kivd_seqR2	TCAGTAGCACCGAAAGATTCAG	SEQ ID No. 86
Kivd_seqR3	AGTGCCTCATCTACTGAACTC	SEQ ID No. 87
-ori_F	ATTAGTTTAAACACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTAC	SEQ ID No. 88
ctfAB_seqR1	TCCTATTCCAAGGTTTACGAGTTGGTC	SEQ ID No. 89
ctfAB_seqR2	ACCCCAACCCATAATTGTCATGCCATC	SEQ ID No. 90
ctfAB_seqR3	TGCAAGAGCAAATCATCTTGTCTTC	SEQ ID No. 91
P-thl-ctfAB_R2	AGGGTGCGGCCGCGATTCATATCCATAATCTTTAAGTTATC	SEQ ID No. 92

**Expresión de genes de codones optimizados para Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (KivD) de *Lactococcus lactis* y Alcohol deshidrogenasa (Adh2) de *Saccharomyces cerevisiae* en *C. autoethanogenum* para la producción de acetona e isopropanol**

5 Los plásmidos de expresión contruidos pMTL85245-kivd-adh2 y pMTL85245-kivd se transformaron en la cepa de *E. coli* JW3350-2 y se prepararon para la transformación en *C. autoethanogenum* DSM23693, que se realizó como se ha descrito anteriormente. Mientras en *E. coli* que albergaba los dos plásmidos, no se pudieron detectar ni acetona ni isopropanol (excepto alcoholes superiores de cadena ramificada tales como isobutanol como se describe en la bibliografía), en *C. autoethanogenum*, se pudieron detectar tanto acetona como isopropanol. En experimentos en frascos de suero, las concentraciones de isopropanol más altas de gas de fábricas de acero que contenía CO fueron 10 0,050-0,064 g/L para ambos plásmidos de expresión (Fig. 65 y 66).

**Producción de acetona e isopropanol con una combinación de genes de la ruta Clostridial y Alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (KivD) de *Lactococcus lactis* y Alcohol deshidrogenasa (Adh2) de *Saccharomyces cerevisiae***

15 Sin desear estar limitado por ninguna teoría concreta, los autores de la presente invención creen que la alfa-cetoácido descarboxilasa Kivd de codones optimizados de *Lactococcus lactis* tiene actividad conversora de acetoacetato en acetona, como la acetoacetato descarboxilasa Clostridial, mientras la alcohol deshidrogenasa Adh2 de codones optimizados de *Saccharomyces cerevisiae* tiene actividad conversora de acetona en isopropanol como la alcohol primario:secundario deshidrogenasa novedosa identificada o la alcohol primario:secundario deshidrogenasa de *Clostridium beijkerickii*. Para someter a prueba esta hipótesis se han creado diversas 20 combinaciones de genes de la ruta de acetona/isopropanol Clostridial y la alfa-cetoácido descarboxilasa Kivd de *Lactococcus lactis* y la alcohol deshidrogenasa Adh2 de *Saccharomyces cerevisiae* y se han sometido a prueba con *E. coli* y *C. autoethanogenum* demostrando la producción de acetona e isopropanol.

**Construcción de plásmidos de expresión con diferentes combinaciones de genes**

25 Basándose en los plásmidos de expresión contruidos pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-adc, pMTL85245-kivd-adh2 y pMTL85245-kivd, se construyeron nuevas combinaciones.

Se amplificó un fragmento P<sub>WL</sub>-thIA-ctfAB de 3122 pb a partir del plásmido pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-adc utilizando los oligonucleótidos P-thI-ctfAB\_F2 (SEQ\_ID. No. 93: ATCTTCTGCAGGGCCGCGAGATAGTCATAATAGTTCCAG) y P-thI-ctfAB\_R2 (SEQ\_ID. No. 94: AGGGTGCAGGGCCGCGATTCATATATCCATAATCTTTAAGTTATC). El fragmento amplificado se clonó en el plásmido pMTL 85245-kivd utilizando sitios de restricción *Pst*I y *Not*I y la cepa *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan, creando el plásmido pMTL85245-P<sub>WL</sub>-thIA-ctfAB-kivd (SEQ\_ID. No. 95; Fig. 67). El inserto del plásmido resultante pMTL85245-P<sub>WL</sub>-thIA-ctfAB-kivd se secuenció completamente utilizando los oligonucleótidos proporcionados en la Tab. 9 y 20 y se confirmó que el plásmido estaba libre de mutaciones. El gen Adh2 se amplificó a partir del plásmido pMTL85245-kivd-adh2 utilizando el par de cebadores adh\_F (SEQ\_ID. No. 96: ACGTTGGATCCAGGAGGAACAAAGATGAGTATACC) y P-kivd-adh\_R (SEQ\_ID. No. 97: AGCGTCCATGGCCTTATTTACTTGTATCTACAACATATC). El fragmento de PCR de 1084 pb se clonó en el plásmido pMTL85147-thIA-ctfAB-adc utilizando sitios de restricción *Bam*HI y *Nco*I y la cepa *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan, creando el plásmido pMTL85147-thIA-ctfAB-adc-adh2 (SEQ\_ID. No. 98; Fig. 68). El plásmido creado pMTL85147-thIA-ctfAB-adc-adh2 y un fragmento de 1625 pb del gen repL de pMTL83151 (FJ797647.1; Nigel Minton, University of Nottingham, Reino Unido) [Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. A modular system for Clostridium shuttle plasmids. J Microbiol Methods. 2009, 78: 79-85] se cortaron con *Fse*I y *Asc*I. Se llevó a cabo una ligación que dio como resultado el plásmido pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-adh2. El inserto del plásmido resultante pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-adh2 se secuenció completamente utilizando los oligonucleótidos proporcionados en la Tab. 9 y 20 y los resultados confirmaron que el fragmento estaba libre de mutaciones.

Se utilizaron los oligonucleótidos P-kivd-adh\_F (SEQ\_ID. No. 99: ATATTGGATCCACAGCTATGACCGCGGCCGCAATATG) y P-kivd-adh\_R (SEQ\_ID. No. 100: AGCGTCCATGGCCTTATTTACTTGTATCTACAACATATC) para amplificar un fragmento de PCR de 3266 pb de P<sub>pta-ack</sub>-kivd-adh2 a partir del plásmido pMTL85245-kivd-adh2, que después se clonó en el plásmido pMTL85147-thIA-ctfAB-adc utilizando sitios de restricción *Bam*HI y *Nco*I y la cepa *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan, creando el plásmido pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-P<sub>pta-ack</sub>-kivd-adh2 (SEQ\_ID. 101; Fig. 69). El plásmido creado pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-P<sub>pta-ack</sub>-kivd-adh2 y un fragmento de 1625 pb del gen repL de pMTL83151 (FJ797647.1; Nigel Minton, University of Nottingham, Reino Unido) [Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. A modular system for Clostridium shuttle plasmids. J Microbiol Methods. 2009, 78: 79-85] se cortaron con *Fse*I y *Asc*I. Se llevó a cabo una ligación que dio como resultado el plásmido pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-P<sub>pta-ack</sub>-kivd-adh2. El inserto del plásmido resultante pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-P<sub>pta-ack</sub>-kivd-adh2 se secuenció completamente utilizando los oligonucleótidos proporcionados en la Tab. 9 y los resultados confirmaron que el plásmido estaba libre de mutaciones.

**Producción de acetona e isopropanol en *C. autoethanogenum* utilizando diferentes combinaciones de genes**

La metilación de los plásmidos de expresión recién contruidos pMTL85147-thIA-ctfA-ctfB-adc, pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-adh2 y pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-P<sub>pta-ack</sub>-kivd-adh2 se llevó a cabo *in vivo* en *E. coli* utilizando un gen de

metiltransferasa de Tipo II híbrido sintetizado (SEQ\_ID NO 35) diseñado a partir de genes de metiltransferasa de *C. autoethanogenum*, *C. ragsdalei* y *C. ljungdahlii* y transformado en *C. autoethanogenum* DSM23693 como se ha descrito anteriormente.

5 Todas las construcciones de plásmidos se sometieron a prueba en *E. coli* y *C. autoethanogenum* DSM23693 utilizando experimentos en frascos de suero con azúcar (*E. coli*) o gas de fábricas de acero que contenía CO (*C. autoethanogenum*) como único sustrato. Con todas las combinaciones sometidas a prueba, se midió la producción de acetona e isopropanol cuando se expresaban heterológamente en *C. autoethanogenum*, mientras en *E. coli* la producción de acetona solamente se producía con unas pocas combinaciones y era necesario un gen de alcohol deshidrogenasa para la producción de isopropanol (Tab. 21). Los resultados presentados muestran que tanto en *E. coli* como en *C. autoethanogenum*, la Alfa-cetoácido descarboxilasa Kivd de codones optimizados de *Lactococcus lactis* es capaz de remplazar la acetoacetato descarboxilasa Clostridial y catalizar la conversión de acetoacetato en acetona (Fig. 4). En *C. autoethanogenum*, la producción de acetona e isopropanol se producía incluso con la expresión de descarboxilasa como único gen heterólogo, indicando actividad CoA-transferasa. La Figura 4 ilustra la ruta propuesta y la Tab. 21 la formación de acetona e isopropanol a partir de CO y la Figura 73 proporciona una visión general de las combinaciones de genes de la ruta Clostridial y los genes de codones optimizados para la Alfa-cetoácido descarboxilasa Kivd de *L. lactis* y la Alcohol deshidrogenasa Adh2 de *S. cerevisiae* sometidas a prueba en *E. coli* y *C. autoethanogenum*.

20 La producción de acetona e isopropanol con *C. autoethanogenum* DSM23693 y plásmidos pMTL85245-P<sub>WL</sub>-thIA-ctfAB-kivd, pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-adh2 y pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-P<sub>pta-ack</sub>-kivd-adh2 de gas de fábricas de acero que contiene CO se muestra en las Fig. 70, 71, y 72 respectivamente.

**Tab. 21: Acetona e isopropanol producidos a partir de diversas combinaciones de genes**

Genes de Clostridia	Organismo	Sustrato	Acetona (g/L)	Isopropanol (g/L)
pMTL85147-thIA-ctfAB-adc	<i>E. coli</i>	Azúcar	0,200	N/A
	<i>C. autoethanogenum</i>	CO	0,300	0,025
	<i>C. ljungdahlii</i>	CO	0,180	0,005
pMTL85147-thIA-ctfAB-adc-sadh ( <i>C. beijerinckii</i> )	<i>E. coli</i>	Azúcar	0,080	0,070
pMTL85147-thIA-ctfAB-adc-sadh ( <i>C. autoethanogenum</i> )	<i>E. coli</i>	Azúcar	0,060	0,080
Genes novedosos	Organismo	Sustrato	Acetona (g/L)	Isopropanol (g/L)
pMTL85245-kivd-adh2	<i>E. coli</i>	Azúcar	N/A	N/A
	<i>C. autoethanogenum</i>	CO	Detectado mediante GC cualitativamente	0,050
pMTL85245-kivd	<i>E. coli</i>	Azúcar	N/A	N/A
	<i>C. autoethanogenum</i>	CO	Detectado mediante GC cualitativamente	0,064
Combinación de genes de Clostridia y novedosos	Organismo	Sustrato	Acetona (g/L)	Isopropanol (g/L)

Genes de Clostridia	Organismo	Sustrato	Acetona (g/L)	Isopropanol (g/L)
pMTL85147-thIA-ctfAB-adc-kivd	<i>E. coli</i>	Azúcar	Detectado mediante GC cualitativamente	N/A
	<i>C. autoethanogenum</i>	CO	Detectado mediante GC cualitativamente	0,091
pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-adh2	<i>E. coli</i>	Azúcar	0,040	N/A
	<i>C. autoethanogenum</i>	CO	Detectado mediante GC cualitativamente	0,648
pMTL83147-thIA-ctfAB-adc-P-kivd-adh2	<i>E. coli</i>	Azúcar	0,076	N/A
	<i>C. autoethanogenum</i>	CO	Detectado mediante GC cualitativamente	0,043

#### Tolerancia a acetona e isopropanol y destoxificación de acetato en acetógenos

Se sabe que varios metabolitos tales como los alcoholes (etanol y butanol) o los ácidos (ácido acético y ácido butírico) son tóxicos para las bacterias a concentraciones elevadas y por lo tanto limitan su producción biotecnológica [Alsaker KV, Parades C, Papoutsakis ET: Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals - systems analysis of butanol, butyrate, and Acetate Stresses in the Anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 105: 1131-1147]. Para observar si la acetona y el isopropanol tienen un efecto tóxico sobre los cultivos, se llevaron a cabo experimentos de crecimiento en 50 ml de medio PETC (Tab. 2) en frascos de suero, añadiendo diferentes concentraciones de acetona (Fig. 12) e isopropanol (Fig. 13) a cultivos en crecimiento de *Clostridium autoethanogenum* DSM23693. El crecimiento celular era visible en presencia de concentraciones tal elevadas como 5 % de acetona o isopropanol (solamente con una ligera inhibición de la tasa de crecimiento).

Se sabe que una elevada concentración de ácido acético libre o no disociado, por otra parte, es perjudicial para la mayor parte de bacterias anaerobias (incluyendo bacterias acetogénicas) debido al efecto deletéreo sobre el gradiente de membrana [Warnecke T, Gill RT: Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microb Cell Fact*, 2005, 4: 25; Köpke M, Dürre P: Biochemical production of biobutanol, en Luque R, Campelo J, Clark JH (Eds.): *Handbook of biofuel production - Processes and technologies*, Woodhead Publishing, Cambridge, 2010: 221-257]. No obstante, las bacterias acetogénicas, necesarias para producir ácido acético para obtener ATP de la fosforilación a nivel del sustrato [Drake HL, Küsel K, Matthies C: Acetogenic Prokaryotes. En Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.): *The Prokaryotes*, 3ª Edición, Volumen 2, Springer, Nueva York, 2006: 354-420] y por lo tanto todas las especies acetogénicas conocidas producen ácido acético [Drake HL, Küsel K, Matthies C: Acetogenic Prokaryotes. En Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.): *The Prokaryotes*, 3ª Edición, Volumen 2, Springer, Nueva York, 2006: 354-420]. La conversión de ácido acético en otros productos tales como etanol a través de la aldehído ferredoxina oxidoreductasa (AOR) o de vuelta a la acetil-CoA a través de la fosfotranscetilasa/acetato quinasa (Pta/Ack) o la acetil-CoA sintasa dependiente de AMP (Acs) es desfavorable, ya que requiere energía en forma de ferredoxina reducida o ATP [Wolfe AJ: The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69: 12-50]. Esta invención presenta un modo novedoso de destoxificación de ácido acético en bacterias acetogénicas, que está libre de requerimiento de energía. El ácido acético puede volverse a reciclar a acetil-CoA a través de un sistema de Acetoacetil-CoA:Acetato/Butirato Coenzima A transferasa que consiste en Acetil-Coenzima A acetiltransferasa, Acetoacetil-CoA:Acetato/Butirato Coenzima A transferasa A, Acetoacetil-CoA:Acetato/Butirato Coenzima A transferasa B. Esta reacción conduce la conversión de Acetoacetil-CoA en Acetoacetato, que se puede descarboxilar a continuación a acetona y reducir a isopropanol (Fig. 4).

La invención se ha descrito en la presente memoria con referencia a determinadas realizaciones preferidas, con el fin de permitir que el lector lleve a la práctica la invención sin excesiva experimentación. Los títulos, encabezamientos o similares se proporcionan para aumentar la comprensión del lector de este documento, y no deben leerse como limitantes del alcance de la presente invención.

La referencia a cualquier solicitud, patente y publicación en esta memoria descriptiva no es ni debe ser tomada como un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que constituyen una técnica anterior válida o forman parte del conocimiento común general en cualquier país del mundo.

A lo largo de esta memoria descriptiva y cualquiera de las siguientes reivindicaciones, salvo que el contexto requiera otra cosa, las palabras "comprende", "que comprende" y similares, deben considerarse en un sentido inclusivo en contraposición a un sentido exclusivo, es decir, en el sentido de "que incluye, pero no limitado a".

**Listado de secuencias**

- 5 <110> Lanzatech New Zealand Limited  
 Koepke, Michael  
 Chen, wendy  
 Liew, Fungmin  
 Simpson, Sean
- 10 <120> Microorganismos recombinantes y métodos de uso de los mismos  
 <130> 509018PCTPR  
 <150> US 61/446.832  
 <151> 2011-02-25  
 <160> 101
- 15 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 351  
 <212> PRT  
 <213> clostridium autoethanogenum
- 20 <400> 1  
 Ala Val Gly Leu Met Gly Ile Ala Gly Ser Lys Leu Arg Gly Ala Gly  
                           180                          185                          190  
 Arg Ile Ile Gly Val Gly Ser Arg Pro Val Cys Val Glu Thr Ala Lys  
                   195                          200                          205  
 Phe Tyr Gly Ala Thr Asp Ile Val Asn Tyr Lys Asn Gly Asp Ile Val  
           210                          215                          220  
 Glu Gln Ile Met Asp Leu Thr His Gly Lys Gly Val Asp Arg Val Ile  
   225                          230                          235  
 Met Ala Gly Gly Gly Ala Glu Thr Leu Ala Gln Ala Val Thr Met Val  
                           245                          250                          255  
 Lys Pro Gly Gly Val Ile Ser Asn Ile Asn Tyr His Gly Ser Gly Asp  
                   260                          265                          270  
 Thr Leu Pro Ile Pro Arg Val Gln Trp Gly Cys Gly Met Ala His Lys  
           275                          280                          285  
 Thr Ile Arg Gly Gly Leu Cys Pro Gly Gly Arg Leu Arg Met Glu Met  
   290                          295                          300  
 Leu Arg Asp Leu Val Leu Tyr Lys Arg Val Asp Leu Ser Lys Leu Val  
   305                          310                          315                          320  
 Thr His Val Phe Asp Gly Ala Glu Asn Ile Glu Lys Ala Leu Leu Leu  
                   325                          330                          335  
 Met Lys Asn Lys Pro Lys Asp Leu Ile Lys Ser Val Val Thr Phe  
           340                          345                          350

ES 2 702 621 T3

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

<210> 2

<211> 1056

5 <212> ADN

<213> clostridium autoethanogenum

<400> 2

atgaaagggtt ttgcaatggt aggtattaac aaattaggat ggattgaaaa gaaaaaccca	60
gtgccagggtc cttatgatgc gattgtacat cctctagctg tatccccatg tacatcagat	120
atacatacgg tttttgaagg agcacttggt aatagggaaa atatgatttt aggccatgaa	180
gctgtagggtg aaatagccga agttggcagc gaagttaaag attttaaagt tggcgataga	240
gttatcgtac catgcacaac acctgactgg agatctttag aagtccaagc tggttttcag	300
cagcattcaa acggtatgct tgcaggatgg aagttttcca attttaaaga cgggtgtattt	360
gcagattact ttcatgtaaa cgatgcagat atgaatcttg ccatactccc agatgaaata	420
ccttttagaaa gtgcagttat gatgacagac atgatgacta ctggttttca tggagcagaa	480

ES 2 702 621 T3

cttgcagaca taaaaatggg ctccagcgtt gtagtaattg gtataggagc tgttggatta 540  
atgggaatag ccggttccaa acttcgagga gcaggcagaa ttatcgggtg tggaagcaga 600  
cctgtttgtg ttgaaacagc taaatthttat ggagcaactg atattgtaaa ttataaaaaat 660  
ggtgatatag ttgaacaaat catggactta actcatggta aagggtgtaga ccgtgtaatc 720  
atggcaggcg gtgggtgctga aacactagca caagcagtaa ctatgggtaa acctggcggc 780  
gtaatttcta acatcaacta ccatggaagc ggtgatactt taccaatacc tcgtgttcaa 840  
tggggctgcg gcatggctca caaaactata agaggaggat tatgccccgg cggacgtctt 900  
agaatggaaa tgctaagaga tcttgttcta tataaacgtg ttgatttgag taaacttggt 960  
actcatgtat ttgatgggtc agaaaatatt gaaaaggccc ttttgcttat gaaaaataag 1020  
ccaaaagatt taattaaatc agtagttaca ttctaa 1056

<210> 3

<211> 1056

<212> ADN

5 <213> clostridium ljundahlia

<400> 3

atgaaaggtt ttgcaatggt aggtattaac aaattaggat ggattgaaaa gaaaaaccca 60  
gtgccaggct cttatgatgc gattgtacat cctctagctg tatccccatg tacatcagat 120  
atacatacgg ttttgaagg agcacttggg aatagggaaa atatgatttt aggccatgaa 180  
gctgtagggtg aaatagccga agttggcagc gaagttaaag attttaaagt tggcagataga 240  
gttatcgtac catgcacaac acctgactgg agatcttttag aagtccaagc tggttttcag 300  
cagcattcaa acggtatgct tgcaggatgg aagttttcca attttaaaga tgggtgattt 360  
gcagattact ttcattgtaa cgatgcagat atgaatcttg ccatactccc agatgaaata 420  
ccttttagaaa gtgcagttat gatgacagac atgatgacta ctggttttca tggagcagaa 480  
cttgcagaca taaaaatggg ctccagcgtt gtagtaattg gtataggagc tgttggatta 540  
atgggaatag ccggttccaa acttcgagga gcaggcagaa ttatcgggtg tggaagcaga 600  
cctgtttgtg ttgaaacagc taaatthttat ggagcaactg atattgtaaa ttataaaaaat 660  
ggtgatatag ttgaacaaat catggactta actcatggta aagggtgtaga ccgtgtaatc 720  
atggcaggcg gtgggtgctga aacactagca caagcagtaa ctatgggtaa acctggcggc 780  
gtaatttcta acatcaacta ccatggaagc ggtgatactt taccaatacc tcgtgttcaa 840  
tggggctgcg gcatggctca caaaactata agaggaggat tatgccccgg cggacgtctt 900  
agaatggaaa tgctaagaga tcttgttcta tataaacgtg ttgatttgag taaacttggt 960  
actcatgtat ttgatgggtc agaaaatatt gaaaaggccc ttttgcttat gaaaaataag 1020  
ccaaaagatt taattaaatc agtagttaca ttctaa 1056

<210> 4

<211> 1056

<212> ADN

10 <213> clostridium ragsdalei

ES 2 702 621 T3

	<400> 4		
	atgaaaggtt ttgcaatggt aggtattaac aagttaggat ggattgaaaa gaaaaaccca	60	
	gtaccaggtc cttatgatgc gattgtacat cctctagctg tatccccatg tacatcagat	120	
	atacatacgg tttttgaagg agcacttggt aatagggaaa atatgatttt aggtcacgaa	180	
	gctgtaggtg aatagactga agttggcagt gaagttaaag attttaaagt tggcgataga	240	
	gttatcgtac catgcacaac acctgactgg agatccttag aagtccaagc tggttttcaa	300	
	cagcattcaa acggtatgct tgcaggatgg aagttttcca attttaaaga cgggtgtattt	360	
	gcagattact ttcattgtaa cgatgcagat atgaatcttg caatacttcc agatgaaata	420	
	ccttttagaaa gtgcagttat gatgacagac atgatgacta ctgggtttca tggggcagaa	480	
	cttgctgaca taaaaatggg ttccagtgtt gtcgtaattg gtataggagc tgttggatta	540	
	atgggaatag ccggttccaa acttcgagga gcaggtagaa ttatcgggtg tgggaagcaga	600	
	cccgtttgtg ttgaaacagc taaattttat ggagcaactg atattgtaa ttataaaaat	660	
	ggtgatatag ttgacaaat aatggactta actcatggta aagggtgtaga ccgtgtaatc	720	
	atggcaggcg gtggtgctga aacactagca caagcagtaa ctatgggtaa acctggcggc	780	
	gtaatttcta acatcaacta ccatggaagc ggtgatactt tgccaatacc tcgtgttcaa	840	
	tggggctgcg gcatggctca caaaactata agaggagggt tatgtcccgg cggacgtctt	900	
	agaatggaaa tgctaagaga ccttgttcta tataaacgtg ttgatttgag caaactgtt	960	
	actcatgtat ttgatgggtc agaaaatatt gaaaaggccc ttttgcttat gaaaaataag	1020	
	ccaaaagatt taattaaatc agtagttaca ttctaa	1056	
	<210> 5		
	<211> 20		
5	<212> ADN		
	<213> Sintético		
	<400> 5		
	tcaggacctt ctggaactgg	20	
	<210> 6		
10	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> cebador sintético		
	<400> 6		
	acctcccctt ttctggaga	20	
15	<210> 7		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> cebador sintético		
	<400> 7		
20	caggttcgg tgctgaccta	20	
	<210> 8		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> cebador sintético		
25	<400> 8		
	aactccgccg ttgtattca	20	
	<210> 9		
	<211> 25		
	<212> ADN		
30	<213> cebador sintético		

ES 2 702 621 T3

<400> 9  
 acaagatggg gtcgaaacag ttgg 25  
  
 <210> 10  
 <211> 25  
 5 <212> ADN  
 <213> cebador sintético  
  
 <400> 10  
 tggcactgga ctactctac atgg 25  
  
 <210> 11  
 10 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético  
  
 <400> 11  
 tattccgaa gatgatattg aattgatgg 30  
  
 15 <210> 12  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético  
  
 <400> 12  
 20 tccagcaggt gttgggtta tagc 24  
  
 <210> 13  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético  
  
 25 <400> 13  
 agctgcaact cctggtggag gc 22  
  
 <210> 14  
 <211> 27  
 30 <212> ADN  
 <213> cebador sintético  
  
 <400> 14  
 gcctttacc tttctgcat actgtgc 27  
  
 <210> 15  
 <211> 29  
 35 <212> ADN  
 <213> cebador sintético  
  
 <400> 15  
 gcttacatta gtaagagtg gagcaaacg 29  
  
 <210> 16  
 40 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético  
  
 <400> 16  
 actgtcctg tgatatatct gctgtagc 29  
  
 45 <210> 17  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético  
  
 <400> 17  
 50 ggtcctatg atgcgattgt acatcc 26  
  
 <210> 18  
 <211> 26

ES 2 702 621 T3

	<212> ADN	
	<213> cebador sintético	
	<400> 18	
	gctatttcac ctacagcttc atggcc	26
5	<210> 19	
	<211> 654	
	<212> ADN	
	<213> Clostridium beijerinckii	
	<400> 19	
	atgaataaat tagtaaaatt aacagattta aagcgcattt tcaaagatgg catgacaatt	60
	atggttgggg gttttttaga ttgtggaact cctgaaaata ttatagatat gctagttgat	120
	ttaaataaa aaaatctgac tattataagc aatgatacag cttttcctaa taaaggaata	180
	ggaaaactta ttgtaaatgg tcaagtttct aaagtaattg ctccacatat tggaactaat	240
	cctgaaactg gaaaaaaat gagctctgga gaacttaaag ttgagctttc cccacaagga	300
	acactgattg aaagaattcg tgcagctgga tctggactcg gaggtgtatt aactccaact	360
	ggacttggaa ctatcgttga agaaggtaag aaaaaagtta ctatcgatgg caaagaatat	420
	ctattagaac ttctttatc tgctgatgtt tcattaataa aaggtagcat tgtagatgaa	480
	tttgaaata ctttctatag ggctgctact aaaaatttca atccatatat ggcaatggct	540
	gcaaaaacag ttatagttga agcagaaaat ttagttaaat gtgaagattt aaaaagagat	600
10	gccataatga ctctggcgt attagtagat tatatcgta aggaggcggc ttaa	654
	<210> 20	
	<211> 666	
	<212> ADN	
	<213> Clostridium beijerinckii	
15	<400> 20	
	ttgattgtag ataaagtttt agcaaaagag ataattgcc aagagttgc aaaagaacta	60
	aaaaaagacc aactcgtaaa ctttggaaata ggacttcaa ctttagtagc aaattatgta	120
	ccaaaagaaa tgaacattac ttttgaatca gaaaatggca tggttggtat ggcacaaatg	180
	gcatcatcag gtgaaaatga cccagatata ataaatgctg gcggggaata tgtaacatta	240
	ttacctcaag gttcattttt tgatagttca atgtctttcg cactaatacg aggaggacat	300
	gttgatgttg ctgttcttgg tgctctagaa gttgatgaaa aaggtaattt agctaactgg	360
	attgttccaa ataaaattgt cccaggtatg ggtggcgcta tggatttagc aataggcgca	420
	aaaaaataa tagtggaat gcaacataca ggaaaaagta aacctaaaat cgtaaaaaa	480
	tgtactctcc cacttactgc taaggctcaa gtggatttaa ttgtcacaga actttgtgta	540
	attgatgtaa caaatgacgg cttactttta aaagaaattc ataaagatac aactattgat	600
	gaaattaaat ttttaacaga tgcagattta attattccag ataacttaaa gattatggat	660
	atatga	666
20	<210> 21	
	<211> 741	
	<212> ADN	
	<213> clostridium beijerinckii	

ES 2 702 621 T3

	<400> 21		
	atgtttagaaa gtgaagtatc taaacaaatt acaactccac ttgctgctcc agcgtttcct	60	
	agaggacccat ataggtttca caatagagaa tatctaaaca ttatttatcg aactgattta	120	
	gatgctcttc gaaaaatagt accagagcca cttgaattag atagagcata tgttagattt	180	
	gaaatgatgg ctatgcctga tacaaccgga ctaggctcat atacagaatg tggcaagct	240	
	attccagtaa aatataatgg tgттаagggt gactacttgc atatgatgta tctagataat	300	
	gaacctgcta ttgctgттгг aagagaaagt agcgcttатc caaaaaagct tggctatcca	360	
	aagctatttg ttgattcaga tacttttagtt gggacactta aatatggtac attaccagta	420	
	gctactgcaa caatgggata taagcacgag cctctagatc ttaaagaagc ctatgctcaa	480	
	attgcaagac ccaattttat gctaaaaatc attcaaggтt acgatggtaa gccaagaatt	540	
	tgtgaaactaa tatgtgcaga aaactactgat ataactattc acggtgcttg gactggaagt	600	
	gcacgtctac aattatttag ccatgacta gctcctcttg ctgatttacc tgtattagag	660	
	attgtatcag catctcatat cctcacagat ttaactcttg gaacacctaa ggттgtacat	720	
	gattatcttt cagtaaaata a	741	
	<210> 22		
	<211> 558		
5	<212> ADN		
	<213> Clostridium autoethanogenum		
	<400> 22		
	tacatccatg tagtgcttaa aaaacaaaa tatgtcacat gcaattgtat atttcaaata	300	
	acaatattta ttttctcgtt aaattcacia ataatttatt aataatatca ataaccaaga	360	
	ttatacttaa atggatgттt attttttaac acttttatag taaatatatt tattttatgt	420	
	agtaaaaagg ttataattat aattgtattt attacaatta attaaaataa aaaatagggt	480	
	tttaggtaaa attaagттtат ttttaagaagt aattacaata aaaattgaag ttatttcttt	540	
	aaggagggaa ttattaaa	558	
	agatagтcat aatagттcca gaatagттca atttagaaat tagactaaac ttcaaaatgt	60	
	ttgttaaata tataccaac tagtatagat attttttaaa tactggactt aaacagtagt	120	
	aatttgцcta aaaaattttt tcaatttttt ttaaaaaatc cttttcaagt tgtacattgt	180	
10	tatggtaata tgtaattgaa gaagттtатgт agtaatattg taaacgттtс ttgatttttt	240	
	<210> 23		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> cebador sintético		
15	<400> 23		
	gttcatatga aagaagттgт aatagc	26	
	<210> 24		
	<211> 25		
	<212> ADN		
20	<213> cebador sintético		
	<400> 24		
	caagaattcc tagcactттt ctagc	25	
	<210> 25		
	<211> 26		
25	<212> ADN		
	<213> cebador sintético		

<400> 25  
 ctaggtacca gggagatatt aaaatg 26

5 <210> 26  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético

<400> 26  
 cgtggatcct ctatattgct ttatt 26

10 <210> 27  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético

<400> 27  
 aagcggccgc agatagtcac aatagtcc 29

15 <210> 28  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético

20 <400> 28  
 ttccatatga ataattccct ccttaaagc 29

<210> 29  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético

25 <400> 29  
 cagaggatgt taatgaagtc 20

<210> 30  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 30 <213> cebador sintético

<400> 30  
 ctgtgcagca gtactgt 18

<210> 31  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 35 <213> cebador sintético

<400> 31  
 gcaatgatac agctt 15

<210> 32  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 40 <213> cebador sintético

<400> 32  
 aaccttgaa taggacttc 19

45 <210> 33  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético

<400> 33  
 50 tgtgaactaa tatgtgcaga 20

<210> 34  
 <211> 601

ES 2 702 621 T3

<212> PRT

<213> proteína sintética

<400> 34

Met Phe Pro Cys Asn Ala Tyr Ile Glu Tyr Gly Asp Lys Asn Met Asn  
1 5 10 15

Ser Phe Ile Glu Asp Val Glu Gln Ile Tyr Asn Phe Ile Lys Lys Asn  
20 25 30

Ile Asp Val Glu Glu Lys Met His Phe Ile Glu Thr Tyr Lys Gln Lys  
35 40 45

Ser Asn Met Lys Lys Glu Ile Ser Phe Ser Glu Glu Tyr Tyr Lys Gln  
50 55 60

Lys Ile Met Asn Gly Lys Asn Gly Val Val Tyr Thr Pro Pro Glu Met

5



ES 2 702 621 T3

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

- <210> 35
- <211> 1806
- <212> ADN
- <213> gen sintético

5

ES 2 702 621 T3

<400> 35  
atgtttccgt gcaatgccta tatcgaatat ggtgataaaa atatgaacag ctttatcgaa 60  
gatgtggaac agatctacaa cttcattaaa aagaacattg atgtggaaga aaagatgcat 120  
ttcattgaaa cctataaaca gaaaagcaac atgaagaaag agattagctt tagcgaagaa 180  
tactataaac agaagattat gaacggcaaa aatggcgttg tgtacacccc gccggaaatg 240  
gcggccttta tggttaaaaa tctgatcaac gttaacgatg ttattggcaa tccgtttatt 300  
aaaatcattg acccgagctg cggtagcggc aatctgattt gcaaatgttt tctgtatctg 360  
aatcgcattt ttattaagaa cattgaggtg attaacagca aaaataacct gaatctgaaa 420  
ctggaagaca tcagctacca catcgctcgc aacaatctgt ttggcttcga tattgacgaa 480  
accgcatca aagtgtgaa aattgatctg tttctgatca gcaaccaatt tagcgagaaa 540  
aatttccagg ttaaagactt tctggtgaa aatattgatc gcaaatatga cgtgttcatt 600  
ggtaatccgc cgtatatcgg tcacaaaagc gtggacagca gctacagcta cgtgctgctc 660  
aaaatctacg gcagcatcta ccgcgacaaa ggcgatatca gctattgttt ctttcagaag 720  
agcctgaaat gtctgaagga aggtggcaaa ctggtgtttg tgaccagccg ctacttctgc 780  
gagagctgca gcggtaaaga actgcgtaaa ttcctgatcg aaaacacgag catttacaag 840  
atcattgatt tttacggcat ccgcccgttc aaacgcgtgg gtatcgatcc gatgattatt 900  
tttctggttc gtacgaagaa ctggaacaat aacattgaaa ttattcgccc gaacaagatt 960  
gaaaagaacg aaaagaacaa attcctggat agcctgttcc tggacaaaag cgaaaagtgt 1020  
aaaaagtta gcattagcca gaaaagcatt aataacgatg gctgggtttt cgtggacgaa 1080  
gtggagaaaa acattatcga caaaatcaaa gagaaaagca agttcattct gaaagatatt 1140  
tgccatagct gtcaaggcat tatcaccggt tgtgatcgcg ctttattgt ggaccgtgat 1200  
atcatcaata gccgtaagat cgaactgcgt ctgattaaac cgtggattaa aagcagccat 1260  
atccgtaaga atgaagttat taagggcgaa aaattcatca tctatagcaa cctgattgag 1320  
aatgaaaccg agtgtccgaa tgcgattaa tatatcgaac agtacaagaa acgtctgatg 1380  
gagcgcgcg aatgcaaaaa gggcacgcgt aagtgtgatg aactgcaatg gggccgtaaa 1440  
ccggaatct tcgaagaaaa gaaaattgtt ttcccgtata aaagctgtga caatcgtttt 1500  
gcactggata agggtagcta ttttagcgca gacatttata gcctggttct gaagaaaaat 1560  
gtgccgttca cctatgagat cctgctgaat atcctgaata gcccgctgta cgagttttac 1620  
tttaagacct tcgcgaaaaa gctgggagag aatctgtacg agtactatcc gaacaacctg 1680  
atgaagctgt gcatcccag catcgatttc ggcggtgaga acaatattga gaaaaagctg 1740  
tatgatttct ttggtctgac ggataaagaa attgagattg tggagaagat caaagataac 1800  
tgctaa 1806

<210> 36  
<211> 37  
5 <212> ADN  
<213> cebador sintético

<400> 36  
ccgaattcgt cgacaacaga gtttgatcct ggctcag 37

10 <210> 37  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> cebador sintético

ES 2 702 621 T3

<400> 37  
 cccgggatcc aagcttacgg ctacctgtt acgactt 37

<210> 38

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Clostridium beijerinckii

<400> 38

Met Lys Gly Phe Ala Met Leu Gly Ile Asn Lys Leu Gly Trp Ile Glu  
 1 5 10 15

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

Ala Val Ser Pro Cys Thr Ser Asp Ile His Thr Val Phe Glu Gly Ala  
 35 40 45

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

Val Val Glu Val Gly Ser Glu Val Lys Asp Phe Lys Pro Gly Asp Arg  
 65 70 75 80

Val Ile Val Pro Cys Thr Thr Pro Asp Trp Arg Ser Leu Glu Val Gln  
 85 90 95

Ala Gly Phe Gln Gln His Ser Asn Gly Met Leu Ala Gly Trp Lys Phe  
 100 105 110

Ser Asn Phe Lys Asp Gly Val Phe Gly Glu Tyr Phe His Val Asn Asp  
 115 120 125

Ala Asp Met Asn Leu Ala Ile Leu Pro Lys Asp Met Pro Leu Glu Asn  
 130 135 140

Ala Val Met Ile Thr Asp Met Met Thr Thr Gly Phe His Gly Ala Glu  
 145 150 155 160

Leu Ala Asp Ile Gln Met Gly Ser Ser Val Val Val Ile Gly Ile Gly  
 165 170 175

ES 2 702 621 T3

Ala Val Gly Leu Met Gly Ile Ala Gly Ala Lys Leu Arg Gly Ala Gly  
 180 185 190

Arg Ile Ile Gly Val Gly Ser Arg Pro Ile Cys Val Glu Ala Ala Lys  
 195 200 205

Phe Tyr Gly Ala Thr Asp Ile Leu Asn Tyr Lys Asn Gly His Ile Val  
 210 215 220

Asp Gln Val Met Lys Leu Thr Asn Gly Lys Gly Val Asp Arg Val Ile  
 225 230 235 240

Met Ala Gly Gly Gly Ser Glu Thr Leu Ser Gln Ala Val Ser Met Val  
 245 250 255

Lys Pro Gly Gly Ile Ile Ser Asn Ile Asn Tyr His Gly Ser Gly Asp  
 260 265 270

Ala Leu Leu Ile Pro Arg Val Glu Trp Gly Cys Gly Met Ala His Lys  
 275 280 285

Thr Ile Lys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Gly Arg Leu Arg Ala Glu Met  
 290 295 300

Leu Arg Asp Met Val Val Tyr Asn Arg Val Asp Leu Ser Lys Leu Val  
 305 310 315 320

Thr His Val Tyr His Gly Phe Asp His Ile Glu Glu Ala Leu Leu Leu  
 325 330 335

Met Lys Asp Lys Pro Lys Asp Leu Ile Lys Ala Val Val Ile Leu  
 340 345 350

<210> 39

<211> 1056

<212> ADN

<213> Clostridium beijerinckii

<400> 39

atgaaagggtt ttgcaatgct aggtattaat aagttaggat ggatcgaaaa agaaaggcca	60
gttgcggggtt catatgatgc tattgtacgc ccattagcag tatctccgtg tacatcagat	120
atacatactg tttttgaggg agctcttggga gataggaaga atatgatttt agggcatgaa	180
gctgtaggtg aagttgttga agtaggaagt gaagtgaagg attttaaacc tggtgacaga	240
gttatagttc cttgtacaac tccagattgg agatctttgg aagttcaagc tggttttcaa	300
cagcactcaa acggtatgct cgcaggatgg aaattttcaa atttcaagga tggagttttt	360
ggtgaatatt ttcattgtaa tgatgcggat atgaatcttg cgattctacc taaagacatg	420
ccattagaaa atgctgttat gataacagat atgatgacta ctggatttca tggagcagaa	480
cttgagata ttcaaagggt ttcaagtgtt gtggaattg gcattggagc tgttgctta	540

5

ES 2 702 621 T3

atgggaatag caggtgctaa attacgtgga gcaggtagaa taattggagt ggggagcagg 600  
 ccgatttggtg ttgaggctgc aaaattttat ggagcaacag atattctaaa ttataaaaat 660  
 ggtcatatag ttgatcaagt tatgaaatta acgaatggaa aaggcgttga ccgcgtaatt 720  
 atggcaggcg gtggttctga aacattatcc caagcagtat ctatggttaa accaggagga 780  
 ataatttcta atataaatta tcatggaagt ggagatgctt tactaatacc acgtgtagaa 840  
 tggggatgtg gaatggctca caagactata aaaggaggtc tttgtcctgg gggacgtttg 900  
 agagcagaaa tgtaagaga tatggtagta tataatcgtg ttgatctaag taaattagtt 960  
 acacatgtat atcatggatt tgatcacata gaagaagcac tgttattaat gaaagacaag 1020  
 ccaaaagact taattaaagc agtagttata ttataa 1056

<210> 40

<211> 352

5 <212> PRT

<213> Thermoanaerobacter brockii

<400> 40

Met Lys Gly Phe Ala Met Leu Ser Ile Gly Lys Val Gly Trp Ile Glu  
 1 5 10 15

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

Ala Val Ala Pro Cys Thr Ser Asp Ile His Thr Val Phe Glu Gly Ala  
 35 40 45

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

Val Val Glu Val Gly Ser Glu Val Lys Asp Phe Lys Pro Gly Asp Arg  
 65 70 75 80

Val Val Val Pro Ala Ile Thr Pro Asp Trp Arg Thr Ser Glu Val Gln  
 85 90 95

Arg Gly Tyr His Gln His Ser Gly Gly Met Leu Ala Gly Trp Lys Phe  
 100 105 110

Ser Asn Val Lys Asp Gly Val Phe Gly Glu Phe Phe His Val Asn Asp  
 115 120 125

Ala Asp Met Asn Leu Ala His Leu Pro Lys Glu Ile Pro Leu Glu Ala  
 130 135 140

Ala Val Met Ile Pro Asp Met Met Thr Thr Gly Phe His Gly Ala Glu  
 145 150 155 160

Leu Ala Asp Ile Glu Leu Gly Ala Thr Val Ala Val Leu Gly Ile Gly

ES 2 702 621 T3

165 170 175

Pro Val Gly Leu Met Ala Val Ala Gly Ala Lys Leu Arg Gly Ala Gly  
180 185 190

Arg Ile Ile Ala Val Gly Ser Arg Pro Val Cys Val Asp Ala Ala Lys  
195 200 205

Tyr Tyr Gly Ala Thr Asp Ile Val Asn Tyr Lys Asp Gly Pro Ile Glu  
210 215 220

Ser Gln Ile Met Asn Leu Thr Glu Gly Lys Gly Val Asp Ala Ala Ile  
225 230 235 240

Ile Ala Gly Gly Asn Ala Asp Ile Met Ala Thr Ala Val Lys Ile Val  
245 250 255

Lys Pro Gly Gly Thr Ile Ala Asn Val Asn Tyr Phe Gly Glu Gly Glu  
260 265 270

Val Leu Pro Val Pro Arg Leu Glu Trp Gly Cys Gly Met Ala His Lys  
275 280 285

Thr Ile Lys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Gly Arg Leu Arg Met Glu Arg  
290 295 300

Leu Ile Asp Leu Val Phe Tyr Lys Arg Val Asp Pro Ser Lys Leu Val  
305 310 315 320

Thr His Val Phe Arg Gly Phe Asp Asn Ile Glu Lys Ala Phe Met Leu  
325 330 335

Met Lys Asp Lys Pro Lys Asp Leu Ile Lys Pro Val Val Ile Leu Ala  
340 345 350

<210> 41

<211> 1056

<212> ADN

<213> Thermoanaerobacter brockii

<400> 41

atgaaagggtt ttgcaatgct aggtattaat aagttaggat ggatcgaaaa agaaaggcca 60

gttgcgggtt catatgatgc tattgtacgc ccattagcag tatctccgtg tacatcagat 120

atacactactg tttttgaggg agctcttggga gataggaaga atatgatttt agggcatgaa 180

gctgtagggtg aagttgttga agtaggaagt gaagtgaagg attttaaac tggtgacaga 240

gttatagttc cttgtacaac tccagattgg agatctttgg aagttcaagc tggttttcaa 300

cagcactcaa acggtatgct cgcaggatgg aaattttcaa atttcaagga tggagttttt 360

ggtgaatatt ttcatgtaaa tgatgcggat atgaatcttg cgattctacc taaagacatg 420

ccattagaaa atgctgttat gataacagat atgatgacta ctggatttca tggagcagaa 480

5

ES 2 702 621 T3

cttgcagata ttcaaatggg ttcaagtgtt gtggaattg gcattggagc tgttgctta 540  
atgggaatag caggtgctaa attacgtgga gcaggtagaa taattggagt ggggagcagg 600  
ccgatttgtg ttgaggctgc aaaattttat ggagcaacag atattctaaa ttataaaaat 660  
ggtcatatag ttgatcaagt tatgaaatta acgaatggaa aaggcgttga cgcgtaatt 720  
atggcaggcg gtggttctga aacattatcc caagcagtat ctatggtaa accaggagga 780  
ataatttcta atataaatta tcatggaagt ggagatgctt tactaatacc acgtgtagaa 840  
tggggatgtg gaatggctca caagactata aaaggaggtc tttgtcctgg gggacgttg 900  
agagcagaaa tgttaagaga tatggtagta tataatcgtg ttgatctaag taaattagtt 960  
acacatgtat atcatggatt tgatcacata gaagaagcac tgttattaat gaaagacaag 1020  
ccaaaagact taattaaagc agtagttata ttataa 1056

<210> 42

<211> 392

5 <212> PRT

<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 42

ES 2 702 621 T3

Ala Glu Asn Ile Ala Glu Arg Trp Asn Ile Ser Arg Glu Glu Gln Asp  
 165 170 175

Glu Phe Ala Leu Ala Ser Gln Lys Lys Ala Glu Glu Ala Ile Lys Ser  
 180 185 190

Gly Gln Phe Lys Asp Glu Ile Val Pro Val Val Ile Lys Gly Arg Lys  
 195 200 205

Gly Glu Thr Val Val Asp Thr Asp Glu His Pro Arg Phe Gly Ser Thr  
 210 215 220

Ile Glu Gly Leu Ala Lys Leu Lys Pro Ala Phe Lys Lys Asp Gly Thr  
 225 230 235 240

Val Thr Ala Gly Asn Ala Ser Gly Leu Asn Asp Cys Ala Ala Val Leu  
 245 250 255

Val Ile Met Ser Ala Glu Lys Ala Lys Glu Leu Gly Val Lys Pro Leu  
 260 265 270

Ala Lys Ile Val Ser Tyr Gly Ser Ala Gly Val Asp Pro Ala Ile Met  
 275 280 285

Gly Tyr Gly Pro Phe Tyr Ala Thr Lys Ala Ala Ile Glu Lys Ala Gly  
 290 295 300

Trp Thr Val Asp Glu Leu Asp Leu Ile Glu Ser Asn Glu Ala Phe Ala  
 305 310 315 320

Ala Gln Ser Leu Ala Val Ala Lys Asp Leu Lys Phe Asp Met Asn Lys  
 325 330 335

Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Leu Gly His Pro Ile Gly Ala  
 340 345 350

Ser Gly Ala Arg Ile Leu Val Thr Leu Val His Ala Met Gln Lys Arg  
 355 360 365

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

Thr Ala Ile Leu Leu Glu Lys Cys  
 385 390

ES 2 702 621 T3

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

<210> 43

<211> 217

<212> PRT

5 <213> Clostridium beijerinckii

ES 2 702 621 T3

<400> 43

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

Gly Met Thr Ile Met Val Gly Gly Phe Leu Asp Cys Gly Thr Pro Glu  
20 25 30

Asn Ile Ile Asp Met Leu Val Asp Leu Asn Ile Lys Asn Leu Thr Ile  
35 40 45

Ile Ser Asn Asp Thr Ala Phe Pro Asn Lys Gly Ile Gly Lys Leu Ile  
50 55 60

Val Asn Gly Gln Val Ser Lys Val Ile Ala Ser His Ile Gly Thr Asn  
65 70 75 80

Pro Glu Thr Gly Lys Lys Met Ser Ser Gly Glu Leu Lys Val Glu Leu  
85 90 95

Ser Pro Gln Gly Thr Leu Ile Glu Arg Ile Arg Ala Ala Gly Ser Gly  
100 105 110

Leu Gly Gly Val Leu Thr Pro Thr Gly Leu Gly Thr Ile Val Glu Glu  
115 120 125

Gly Lys Lys Lys Val Thr Ile Asp Gly Lys Glu Tyr Leu Leu Glu Leu  
130 135 140

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

Phe Gly Asn Thr Phe Tyr Arg Ala Ala Thr Lys Asn Phe Asn Pro Tyr  
165 170 175

Met Ala Met Ala Ala Lys Thr Val Ile Val Glu Ala Glu Asn Leu Val  
180 185 190

Lys Cys Glu Asp Leu Lys Arg Asp Ala Ile Met Thr Pro Gly Val Leu  
195 200 205

Val Asp Tyr Ile Val Lys Glu Ala Ala  
210 215

<210> 44

<211> 221

5 <212> PRT

<213> clostridium beijerinckii

<400> 44

Leu Ile Val Asp Lys Val Leu Ala Lys Glu Ile Ile Ala Lys Arg Val  
1 5 10 15

Ala Lys Glu Leu Lys Lys Asp Gln Leu Val Asn Leu Gly Ile Gly Leu



ES 2 702 621 T3

Glu Pro Leu Glu Leu Asp Arg Ala Tyr Val Arg Phe Glu Met Met Ala  
 50 55 60

Met Pro Asp Thr Thr Gly Leu Gly Ser Tyr Thr Glu Cys Gly Gln Ala  
 65 70 75 80

Ile Pro Val Lys Tyr Asn Gly Val Lys Gly Asp Tyr Leu His Met Met  
 85 90 95

Tyr Leu Asp Asn Glu Pro Ala Ile Ala Val Gly Arg Glu Ser Ser Ala  
 100 105 110

Tyr Pro Lys Lys Leu Gly Tyr Pro Lys Leu Phe Val Asp Ser Asp Thr  
 115 120 125

Leu Val Gly Thr Leu Lys Tyr Gly Thr Leu Pro Val Ala Thr Ala Thr  
 130 135 140

Met Gly Tyr Lys His Glu Pro Leu Asp Leu Lys Glu Ala Tyr Ala Gln  
 145 150 155 160

Ile Ala Arg Pro Asn Phe Met Leu Lys Ile Ile Gln Gly Tyr Asp Gly  
 165 170 175

Lys Pro Arg Ile Cys Glu Leu Ile Cys Ala Glu Asn Thr Asp Ile Thr  
 180 185 190

Ile His Gly Ala Trp Thr Gly Ser Ala Arg Leu Gln Leu Phe Ser His  
 195 200 205

Ala Leu Ala Pro Leu Ala Asp Leu Pro Val Leu Glu Ile Val Ser Ala  
 210 215 220

Ser His Ile Leu Thr Asp Leu Thr Leu Gly Thr Pro Lys Val Val His  
 225 230 235 240

Asp Tyr Leu Ser Val Lys  
 245

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

Pro Ala Phe Pro Arg Gly Pro Tyr Arg Phe His Asn Arg Glu Tyr Leu  
 20 25 30

Asn Ile Ile Tyr Arg Thr Asp Leu Asp Ala Leu Arg Lys Ile Val Pro  
 35 40 45

<210> 46

<211> 6832

<212> ADN

<213> plásmido sintético

<400> 46

tгааагааг атаггаааа gтсtатаааg gтсtсtсаgаg gтсtсагас гаагаааgtg	60
gаgааgtсat аgаggtаgас ааgttатасс gтаасааас gтсtggтаас ttсgtаааgg	120
сатататagt gсааттаата агtатgttag аtаtgattgg сggааааааа сttаааатсg	180
ttаасатат сtгагатаат gтссасtтаа gтаасаатас аатгагагсt асаасааgаg	240

5

ES 2 702 621 T3

aaatagcaaa agctacagga acaagtctac aaacagtaat aacaacactt aaaatccttag 300  
 aagaaggaaa tattataaaa agaaaaactg gagtattaat gttaaaccct gaactactaa 360  
 tgagaggcga cgaccaaaaa caaaaatacc tcttactcga atttggaac tttgagcaag 420  
 aggcaaatga aatagattga cctccaata acaccacgta gttattggga ggtcaatcta 480  
 tgaatgcga ttaagggccg gccagtggc aagttgaaaa attcacaaaa atgtggtata 540  
 atatccttgt tcattagagc gataaacttg aatttgagag ggaacttaga tggattttga 600  
 aaaaattgat aaaaatagtt ggaacagaaa agagtatttt gaccactact ttgcaagtgt 660  
 accttgtacc tacagcatga ccgttaaagt ggatatacaca caaataaagg aaaagggaaat 720  
 gaaactatat cctgcaatgc tttattatat tgcaatgatt gtaaaccgcc attcagagtt 780  
 taggacggca atcaatcaag atgggtgaatt ggggatatat gatgagatga taccaagcta 840  
 tacaatattt cacaatgata ctgaaacatt ttccagcctt tggactgagt gtaagtctga 900  
 ctttaaatca tttttagcag attatgaaag tgatacgsaa cggtatggaa acaatcatag 960  
 aatggaagga aagccaaatg ctccggaaaa catttttaat gtatctatga taccgtggtc 1020  
 aaccttcgat ggctttaatc tgaatttgca gaaaggatat gattatttga ttcctatttt 1080  
 tactatgggg aaatattata aagaagataa caaaattata cttcctttgg caattcaagt 1140  
 tcatcacgca gtatgtgacg gatttcacat ttgccgtttt gtaaacgaaat tgcaggaatt 1200  
 gataaatagt taacttcagg tttgtctgta actaaaaaca agtatttaag caaaaacatc 1260  
 gtagaaaatac ggtgtttttt gttaccctaa gtttaaactc ctttttgata atctcatgac 1320  
 caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1380  
 aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1440  
 accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt tccgaaggt 1500  
 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg 1560  
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc 1620  
 agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1680  
 accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga 1740  
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 1800  
 tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 1860  
 cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 1920  
 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 1980  
 cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt 2040  
 ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2100  
 tacgctcgc gcgagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 2160  
 gcgccaata gcgagggccc cctgcaggat aaaaaaattg tagataaatt ttataaata 2220  
 gttttatcta caattttttt atcaggaaac agctatgacc gcggccgcag atagtcataa 2280

ES 2 702 621 T3

tagttccaga atagttcaat ttagaaatta gactaaactt caaaatgttt gttaaata 2340  
taccaaacta gtatagatat tttttaaata ctggacttaa acagtagtaa tttgcctaaa 2400  
aaatTTTTTc aatTTTTTtT aaaaaatcct tttcaagttg tacattgtta tgtaaatatg 2460  
taattgaaga agttatgtag taatattgta aacgtttcctt gattTTTTtT catccatgta 2520  
gtgcttaaaa aaccaaaata tgtcacatgc aattgtatat ttcaaataac aatatttatt 2580  
ttctcgtaa attcacaat aatttattaa taatatcaat aaccaagatt atacttaaat 2640  
ggatgtttat ttttaacac ttttatagta aatatattta ttttatgtag taaaaaggtt 2700  
ataattataa ttgtatttat tacaattaat taaaataaaa aatagggttt taggtaaaat 2760  
taagttattt taagaagtaa ttacaataaa aattgaagtt atttctttaa ggaggggaatt 2820  
attcatatga aagaagttgt aatagctagt gcagtaagaa cagcgattgg atcttatgga 2880  
aagtctctta aggatgtacc agcagtagat ttaggagcta cagctataaa ggaagcagtt 2940  
aaaaagcag gaataaaacc agaggatgtt aatgaagtca ttttaggaaa tgttcttcaa 3000  
gcaggtttag gacagaatcc agcaagacag gcatctttta aagcaggatt accagttgaa 3060  
attccagcta tgactattaa taaggtttgt ggttcaggac ttagaacagt tagcttagca 3120  
gcacaaatta taaaagcagg agatgctgac gtaataatag cagggtgtat ggaaaatag 3180  
tctagagctc cttacttagc gaataacgct agatggggat atagaatggg aaacgctaaa 3240  
tttgttgatg aaatgatcac tgacggattg tgggatgcat ttaatgatta ccacatggga 3300  
ataacagcag aaaacatagc tgagagatgg aacatttcaa gagaagaaca agatgagttt 3360  
gctcttgcat cacaaaaaaa agctgaagaa gctataaaat cagggtcaatt taaagatgaa 3420  
atagttcctg tagtaattaa aggcagaaaag ggagaaactg tagttgatac agatgagcac 3480  
cctagatttg gatcaactat agaaggactt gcaaaattaa aacctgcctt caaaaaagat 3540  
ggaacagtta cagctggtaa tgcacagga ttaaagtact gtgcagcagt acttgtaatc 3600  
atgagtgcag aaaaagctaa agagcttggg gtaaaaccac ttgctaagat agtttcttat 3660  
ggttcagcag gagttgacct agcaataatg ggatatggac ctttctatgc aacaaaagca 3720  
gctattgaaa aagcaggttg gacagttgat gaattagatt taatagaatc aatgaagct 3780  
tttgagctc aaagtttagc agtagcaaaa gatttaaaat ttgatatgaa taaagtaaat 3840  
gtaaatggag gagctattgc ctttggcat ccaattggag catcaggtgc aagaatactc 3900  
gttactcttg tacacgcaat gcaaaaaaga gatgcaaaaa aaggcttagc aactttatgt 3960  
ataggtggcg gacaaggaac agcaatattg ctagaaaagt gctaggaatt cgagctcgg 4020  
accagggaga tattaatatg aataaattag taaaattaa agatttaaag cgcattttca 4080  
aagatggcat gacaattatg gttgggggtt ttttagattg tggaaactcct gaaaatatta 4140  
tagatatgct agttgattta aatataaaaa atctgactat tataagcaat gatacagctt 4200  
ttcctaataa aggaatagga aaacttattg taaatgggtca agtttctaaa gtaattgctt 4260  
cacatattgg aactaatcct gaaactggaa aaaaaatgag ctctggagaa cttaaagttg 4320

ES 2 702 621 T3

agctttcccc acaaggaaca ctgattgaaa gaattcgtgc agctggatct ggactcggag 4380  
 gtgtattaac tccaactgga cttggaacta tcgttgaaga aggtaagaaa aaagttacta 4440  
 tcgatggcaa agaatatcta ttagaacttc ctttatctgc tgatgtttca ttaataaaag 4500  
 gtagcattgt agatgaattt ggaaatacct tctatagggc tgctactaaa aatttcaatc 4560  
 catatatggc aatggctgca aaaacagtta tagttgaagc agaaaattta gttaaatgtg 4620  
 aagatttaaa aagagatgcc ataatgactc ctggcgattt agtagattat atcgttaagg 4680  
 aggcggctta attgattgta gataaaagtt tagcaaaaga gataattgcc aaaagagttg 4740  
 caaaagaact aaaaaaagac caactcgtaa accttggaaat aggacttcca actttagtag 4800  
 caaattatgt accaaaagaa atgaacatta cttttgaatc agaaaatggc atggttggtta 4860  
 tggcacaaaat ggcatcatca ggtgaaaatg acccagatat aataaatgct ggcggggaat 4920  
 atgtaacatt attacctcaa ggttcatttt ttgatagttc aatgtctttc gcactaatac 4980  
 gaggaggaca tgttgatgtt gctgttcttg gtgctctaga agttgatgaa aaaggtaatt 5040  
 tagctaactg gattgttcca aataaaattg tcccaggat ggggtggcgt atggatttag 5100  
 caataggcgc aaaaaaata atagtggcaa tgcaacatac aggaaaaagt aaacctaaaa 5160  
 tcgtaaaaa atgtactctc ccacttactg ctaaggctca agtggattta attgtcacag 5220  
 aactttgtgt aattgatgta acaaatgacg gcttactttt aaaagaaatt cataaagata 5280  
 caactattga tgaaatataa tttttaacag atgcagattt aattattcca gataacttaa 5340  
 agattatgga tatatgaatc attctatttt aaatatataa ctttaaaaat cttatgtatt 5400  
 aaaaactaag aaaagaggtt gattgtttta tgtagaaag tgaagtatct aaacaaatta 5460  
 caactccact tgctgctcca gcgtttccta gaggaccata taggtttcac aatagagaat 5520  
 atctaaacal tatttatcga actgatttag atgctcttcg aaaaatagta ccagagccac 5580  
 ttgaattaga tagagcatat gttagatttg aatgatggc tatgcctgat acaaccggac 5640  
 taggctcata tacagaatgt ggtcaagcta ttccagtaaa atataatggt gtttaagggtg 5700  
 actacttgca tatgatgtat ctagataatg aacctgctat tgctgttggga agagaaagta 5760  
 gcgcttatcc aaaaaagctt ggctatccaa agctatttgt tgattcagat actttagttg 5820  
 ggacacttaa atatggtaca ttaccagtag ctactgcaac aatgggatat aagcacgagc 5880  
 ctctagatct taagaagcc tatgctcaaa ttgcaagacc caatttatg ctaaaaatca 5940  
 ttcaaggtta cgatggtaag ccaagaattt gtgaactaat atgtgcagaa aatactgata 6000  
 taactattca cggtgcttgg actggaagtg cacgtctaca attatttagc catgcactag 6060  
 ctctcttgc tgatttacct gtattagaga ttgtatcagc atctcatatc ctcacagatt 6120  
 taactcttgg aacacctaag gttgtacatg attatctttc agtaaaataa aagcaatata 6180  
 gaggatcctc tagagtcgac gtcacgcgtc catggagatc tcgaggcctg cagacatgca 6240  
 agcttggcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa 6300  
 cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccg 6360

ES 2 702 621 T3

accgatcgcc cttccaaca gttgcgagc ctgaatggcg aatggcgcta gcataaaaat 6420  
aagaagcctg catttgcagg cttcttattt ttatggcgcg ccgcattcac ttcttttcta 6480  
tataaatatg agcgaagcga ataagcgtcg gaaaagcagc aaaaagtttc ctttttgctg 6540  
ttggagcatg ggggttcagg ggggtgcagta tctgacgtca atgccgagcg aaagcgagcc 6600  
gaagggtagc atttacgtta gataaccccc tgatatgctc cgacgcttta tatagaaaag 6660  
aagattcaac taggtaaaaat cttaatatag gttgagatga taaggtttat aaggaatttg 6720  
tttgttctaa tttttcactc attttgttct aatttctttt aacaaatgtt cttttttttt 6780  
tagaacagtt atgatatagt tagaatagtt taaaataagg agtgagaaaa ag 6832

<210> 47

<211> 2133

<212> ADN

5 <213> clostridium beijerinckii

<400> 47

atgaataaat tagtaaaatt aacagattta aagcgcattt tcaaagatgg catgacaatt 60  
atggttgggg gttttttaga ttgtggaact cctgaaaata ttatagatat gctagttagt 120  
ttaaatataa aaaatctgac tattataagc aatgatacag cttttcctaa taaaggaata 180  
ggaaaactta ttgtaaatgg tcaagtttct aaagtaattg cttcacatat tggaactaat 240  
cctgaaactg gaaaaaaaaat gagctctgga gaacttaag ttgagctttc cccacaagga 300  
acactgattg aaagaattcg tgcagctgga tctggactcg gaggtgtatt aactccaact 360  
ggacttgga ctatcgttga agaaggtgag aaaaaagtta ctatcgatgg caaagaatat 420  
ctattagaac ttctttatc tgctgatgtt tcattaataa aaggtagcat tgtagatgaa 480  
tttggaata cttctatag ggctgctact aaaaatttca atccatataat ggcaatggct 540  
gcaaaaacag ttatagttga agcagaaaat ttagttaaat gtgaagattt aaaaagagat 600  
gccataatga ctctggcgt attagtagat tataatcgta aggaggcggc ttaattgatt 660  
gtagataaag ttttagcaaa agagataatt gccaaaagag ttgcaaaaga actaaaaaaaa 720  
gaccaactcg taaaccttg aataggactt ccaactttag tagcaatta tgtaccaaaa 780  
gaaatgaaca ttacttttga atcagaaaat ggcatggttg gtatggcaca aatggcatca 840  
tcagggtgaaa atgaccaga tataataaat gctggcgggg aatatgtaac attattacct 900  
caaggttcat tttttgatag ttcaatgtct ttcgactaa tacgaggagg acatgttagt 960  
gttgctgttc ttggtgctct agaagttgat gaaaaaggta atttagctaa ctggattggt 1020  
ccaaataaaa ttgtcccagg tatgggtggc gctatggatt tagcaatagg cgcaaaaaaa 1080  
ataatagtg caatgaaca tacaggaaaa agtaaaccta aaatcgtaa aaaatgtact 1140  
ctcccactta ctgctaaggc tcaagtggat ttaattgtca cagaactttg tgtaattgat 1200  
gtaacaaatg acggcttact tttaaaagaa attcataaag atacaactat tgatgaaatt 1260  
aaatttttaa cagatgcaga ttttaattatt ccagataact taaagattat ggatatatga 1320  
atcattctat tttaaatata taactttaaa aatcttatgt attaaaaact aagaaaagag 1380

ES 2 702 621 T3

gttgattggt ttatgtaga aagtgaagta tctaaacaaa ttacaactcc acttgctgct 1440  
ccagcgtttc ctagaggacc atataggttt cacaatagag aatatctaaa cattatttat 1500  
cgaactgatt tagatgctct tcgaaaaata gtaccagagc cacttgaatt agatagagca 1560  
tatgtagat ttgaaatgat ggctatgcct gatacaaccg gactaggctc atatacagaa 1620  
tgtggtcaag ctattccagt aaaatataat ggtgttaagg gtgactactt gcatatgatg 1680  
tatctagata atgaacctgc tattgctggt ggaagagaaa gtagcgctta tccaaaaaag 1740  
cttggctatc caaagctatt tgttgattca gatactttag ttgggacact taaatatggt 1800  
acattaccag tagctactgc aacaatggga tataagcacg agcctctaga tcttaaagaa 1860  
gcctatgctc aaattgcaag acccaatfff atgctaaaaa tcattcaagg ttacgatggt 1920  
aagccaagaa tttgtgaact aatatgtgca gaaaatactg atataactat tcacggtgct 1980  
tggactggaa gtgcacgtct acaattatff agccatgcac tagctcctct tgctgattta 2040  
cctgtattag agattgtatc agcatctcat atcctcacag atttaactct tggaacacct 2100  
aaggtgtac atgattatct ttcagtaaaa taa 2133

<210> 48

<211> 7922

5 <212> ADN

<213> plásmido sintético

<400> 48

atgaaagaaa gatatggaac agtctataaa ggctctcaga ggctcataga cgaagaaagt 60  
ggagaagtca tagaggtaga caagttatac cgtaaacaaa cgctcggtaa cttcgtaaag 120  
gcatatatag tgcaattaat aagtatgtta gatatgattg gcggaaaaaa acttaaaatc 180  
gttaactata tcctagataa tgtccactta agtaacaata caatgatagc tacaacaaga 240  
gaaatagcaa aagctacagg aacaagtcta caaacagtaa taacaacact taaaatctta 300  
gaagaaggaa atattataaa aagaaaaact ggagtattaa tgtaaacc c tgaactacta 360  
atgagaggcg acgacaaaa acaaaaatac ctcttactcg aatttgggaa ctttgagcaa 420  
gaggcaaatg aaatagattg acctcccaat aacaccacgt agttattggg aggtcaatct 480  
atgaaatgcg attaagggcc ggccagtggg caagttgaaa aattcacaaa aatgtggtat 540  
aatatctttg ttcattagag cgataaactt gaatttgaga gggaacttag atggtatttg 600  
aaaaattga taaaatagt tggaacagaa aagagtatff tgaccactac tttgcaagtg 660  
taccttgtag ctacagcatg accgttaaag tggatatcac acaataaag gaaaagggaa 720  
tgaaactata tcctgcaatg ctttattata ttgcaatgat tgtaaaccgc cattcagagt 780  
ttaggacggc aatcaatcaa gatggtgaat tgggatata tgatgagatg ataccaagct 840  
atacaatatt tcacaatgat actgaaacat tttccagcct ttggactgag tgtaagtctg 900  
actttaaadc atttttagca gattatgaaa gtgatacgca acggtatgga aacaatcata 960  
gaatggaagg aaagccaaat gctccggaag acatttttaa tgtatctatg ataccgtggt 1020

ES 2 702 621 T3

caaccttcga tggctttaat ctgaatttgc agaaaggata tgattatttg attcctattt 1080  
ttactatggg gaaatattat aaagaagata acaaaattat acttcctttg gcaattcaag 1140  
ttcatcacgc agtatgtgac ggatttcaca tttgccgttt tgtaaacgaa ttgcaggaat 1200  
tgataaatag ttaacttcag gtttgctgtt aactaaaaac aagtatttaa gcaaaaacat 1260  
cgtagaaaata cgggtgtttt tgttacccta agtttaaact cttttttgat aatctcatga 1320  
ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca 1380  
aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac 1440  
caccgctacc agcgggtggt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg 1500  
taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag 1560  
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac 1620  
cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt 1680  
taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cggggggttc gtgcacacag cccagcttgg 1740  
agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgcacgc 1800  
ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcg cagggtcggg acaggagagc 1860  
gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc 1920  
acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa 1980  
acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt 2040  
tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg 2100  
ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcgggag 2160  
agcgcaccaat acgcagggcc ccctgcagga taaaaaatt gtagataaat ttataaaat 2220  
agttttatct acaatTTTTT tatcaggaaa cagctatgac cgcggccgca gatagtcata 2280  
atagttccag aatagttcaa tttagaaatt agactaaact tcaaaatggt tgtaaatat 2340  
ataccaaact agtatagata ttttttaaact actggactta aacagtagta atttgcctaa 2400  
aaaatTTTTT caatTTTTT taaaaatcc ttttcaagtt gtacattggt atggtaatat 2460  
gtaattgaag aagttatgta gtaatatgtt aaacgtttct tgatTTTTT acatccatgt 2520  
agtgtttaa aaacaaaat atgtcacatg caattgtata tttcaaata caatatttat 2580  
tttctcgtta aattcacaaa taatttatta ataatatcaa taaccaagat tatacttaaa 2640  
tggatgttta ttttttaaca cttttatagt aaatataatt attttatgta gtaaaaagg 2700  
tataattata attgtattta ttacaattaa ttaaaataaa aaataggggt ttaggtaaaa 2760  
ttaagttatt ttaagaagta attacaataa aaattgaagt tatttcttta aggagggat 2820  
tattcatatg aaagaagtg taatagctag tgcagtaaga acagcgattg gatcttatgg 2880  
aaagtctctt aaggatgtac cagcagtaga tttaggagct acagctataa aggaagcagt 2940  
taaaaaagca ggaataaaac cagaggatgt taatgaagtc attttaggaa atgttcttca 3000  
agcaggttta ggacagaatc cagcaagaca ggcactttt aaagcaggat taccagttga 3060

ES 2 702 621 T3

aattccagct atgactatta ataaggtttg tggttcagga cttagaacag ttagcttagc 3120  
agcacaatt ataaaagcag gagatgctga cgtaataata gcaggtggta tggaaaatat 3180  
gtctagagct ccttacttag cgaataacgc tagatgggga tatagaatgg gaaacgctaa 3240  
at ttgttgat gaaatgatca ctgacggatt gtgggatgca tttaatgatt accacatggg 3300  
aataacagca gaaaacatag ctgagagatg gaacatttca agagaagaac aagatgagtt 3360  
tgctcttgca tcacaaaaaa aagctgaaga agctataaaa tcaggtcaat ttaaagatga 3420  
aatagttcct gtagtaatta aaggcagaaa gggagaaact gtagttgata cagatgagca 3480  
ccctagattt ggatcaacta tagaaggact tgcaaaatta aaacctgcct tcaaaaaaga 3540  
tggaacagtt acagctggta atgcatcagg attaaatgac tgtgcagcag tacttgtaat 3600  
catgagtgca gaaaaagcta aagagcttgg agtaaaacca cttgctaaga tagtttctta 3660  
tggttcagca ggagttgacc cagcaataat gggatatgga cttttctatg caacaaaagc 3720  
agctattgaa aaagcaggtt ggacagttga tgaattagat ttaatagaat caaatgaagc 3780  
ttttgcagct caaagtttag cagtagcaaa agatttaaaa tttgatatga ataaagtaaa 3840  
tgtaaatgga ggagctattg cccttggca tccaattgga gcatcaggtg caagaatact 3900  
cgttactctt gtacacgcaa tgcaaaaaag agatgcaaaa aaaggcttag caactttatg 3960  
tataggtggc ggacaaggaa cagcaatatt gctagaaaag tgctaggaat tcgagctcgg 4020  
taccagggag atattaaaat gaataaatta gtaaaattaa cagatttaa gcgcattttc 4080  
aaagatggca tgacaattat ggttgggggt tttttagatt gtggaactcc tgaaaatatt 4140  
atagatatgc tagttgattt aaatataaaa aatctgacta ttataagcaa tgatacagct 4200  
tttcctaata aaggaatagc aaaacttatt gtaaatggc aagtttctaa agtaattgct 4260  
tcacatattg gaactaatcc tgaaactgga aaaaaaatga gctctggaga acttaaagtt 4320  
gagctttccc cacaaggaac actgattgaa agaattcgtg cagctggatc tggactcggc 4380  
ggtgtattaa ctccaactgg acttggaaact atcgttgaag aaggtaagaa aaaagttact 4440  
atcgatggca aagaatatct attagaactt cttttatctg ctgatgtttc attaataaaa 4500  
ggtagcattg tagatgaatt tggaaatacc ttctataggg ctgctactaa aaatttcaat 4560  
ccatatatgg caatggctgc aaaaacagtt atagttgaag cagaaaattt agttaaattg 4620  
gaagatttaa aaagagatgc cataatgact cctggcgtat tagtagatta tatcgttaag 4680  
gaggcggctt aattgattgt agataaagtt ttagcaaaaag agataattgc caaaagagtt 4740  
gcaaaagaac taaaaaaga ccaactcgta aaccttgaa taggacttcc aactttagta 4800  
gcaaattatg taccaaaaaga aatgaacatt acttttgaat cagaaaatgg catggttggt 4860  
atggcacaaa tggcatcatc aggtgaaaat gaccagata taataaatgc tggcggggaa 4920  
tatgtaacat tattacctca aggttcattt tttgatagtt caatgtcttt cgactaata 4980  
cgaggaggac atgttgatgt tgctgttctt ggtgctctag aagttgatga aaaaggtaat 5040  
ttagctaact ggattgttcc aaataaaatt gtcccaggta tgggtggcgc tatggattta 5100

ES 2 702 621 T3

gcaataggcg caaaaaaat aatagtggca atgcaacata caggaaaaag taaacctaaa 5160  
atcgttaaaa aatgtactct cccacttact gctaaggctc aagtggattt aattgtcaca 5220  
gaactttgtg taattgatgt aacaaatgac ggcttacttt taaaagaaat tcataaagat 5280  
acaactattg atgaaattaa atttttaaca gatgcagatt taattattcc agataactta 5340  
aagattatgg atatatgaat cattctatct taaatatata actttaaaaa tcttatgtat 5400  
taaaaactaa gaaaagaggt tgattgtttt atgtagaaa gtgaagtatc taaacaaatt 5460  
acaactccac ttgctgctcc agcgtttctt agaggaccat ataggtttca caatagagaa 5520  
tatctaaaca ttatttatcg aactgattta gatgctcttc gaaaaatagt accagagcca 5580  
cttgaattag atagagcata tgtagattt gaaatgatgg ctatgcctga tacaaccgga 5640  
ctaggctcat atacagaatg tggcaagct attccagtaa aatataatgg tgtaagggt 5700  
gactacttgc atatgatgta tctagataat gaacctgcta ttgctgttg aagagaaagt 5760  
agcgcttacc caaaaaagct tggctatcca aagctatctg ttgattcaga tactttagtt 5820  
gggacactta aatatggtac attaccagta gctactgcaa caatgggata taagcacgag 5880  
cctctagatc ttaaagaagc ctatgctcaa attgcaagac ccaattttat gctaaaaatc 5940  
attcaagggt acgatggtaa gccagaatt tgtgaactaa tatgtgcaga aaatactgat 6000  
ataactattc acggtgcttg gactggaagt gcacgtctac aattatttag ccatgcacta 6060  
gctcctcttg ctgatttacc tgtattagag attgtatcag catctcatat cctcacagat 6120  
ttaactcttg gaacacctaa ggtgtacat gattatcttt cagtaaaata aaagcaatat 6180  
agaggatcct ctagagtcga cttaggaggt tctattatga aaggttttgc aatgtaggt 6240  
attaacaaat taggatggat tgaaaagaaa aaccagtg caggctctta tgatgagatt 6300  
gtacatcctc tagctgtatc cccatgtaca tcagatatac atacggtttt tgaaggagca 6360  
cttggaataa gggaaaatat gatcttaggc catgaagctg taggtgaaat agccgaagtt 6420  
ggcagcgaag ttaaagattt taaagtggc gatagagtta tcgtaccatg cacaacacct 6480  
gactggagat ctttagaagt ccaagctggt tttcagcagc attcaaacgg tatgcttgca 6540  
ggatggaagt tttccaattt taaagatggt gtatttgagc attactttca tgtaaacgat 6600  
gcagatatga atcttgccat actcccagat gaaatacctt tagaaagtgc agttatgatg 6660  
acagacatga tgactactgg ttttcatgga gcagaacttg cagacataaa aatgggctcc 6720  
agcgttgtag taattggtat aggagctggt ggattaatgg gaatagccgg ttccaaactt 6780  
cgaggagcag gcagaattat cgggtgtgga agcagacctg tttgtgttga aacagctaaa 6840  
ttttatggag caactgatat tgtaaattat aaaaatggtg atatagttga acaaatcatg 6900  
gacttaactc atggtaaagg tgtagaccgt gtaatcatgg caggcgggtg tgctgaaaca 6960  
ctagcacaag cagtaactat ggttaaactt ggcggcgtaa tttctaact caactacat 7020  
ggaagcggtg atactttacc aatacctcgt gttcaatggg gctgcggcat ggctcacaaa 7080  
actataagag gaggattatg ccccgcgga cgtcttagaa tggaatgct aagagatctt 7140

ES 2 702 621 T3

gttctatata aacgtgttga tttgagtaaa cttgttactc atgtatttga tggcgcagaa 7200  
aatattgaaa aggccctttt gcttatgaaa aataagccaa aagatttaat taaatcagta 7260  
gttacattct aaaaattcat ataaaaaac tgtcgcatta aaaaaatgtc tcgaggcctg 7320  
cagacatgca agcttggcac tggccgctgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg 7380  
cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga 7440  
agaggcccgc accgatcgcc cttccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcta 7500  
gcataaaaat aagaagcctg catttgcagg cttcttattt ttatggcgcg ccgcattcac 7560  
ttcttttcta tataaatatg agcgaagcga ataagcgtcg gaaaagcagc aaaaagtttc 7620  
ctttttgctg ttggagcatg ggggttcagg ggggtgcagta tctgacgtca atgccgagcg 7680  
aaagcgagcc gaagggtagc atttacgtta gataaccccc tgatatgctc cgacgcttta 7740  
tatagaaaag aagattcaac taggtaaaat cttaatatag gttgagatga taaggtttat 7800  
aaggaatttg tttgttctaa tttttcactc attttgttct aatttctttt aacaaatgtt 7860  
cttttttttt tagaacagtt atgatatagt tagaatagtt taaaataagg agtgagaaaa 7920  
ag 7922

<210> 49  
<211> 4709  
<212> ADN

5 <213> plásmido sintético

<400> 49  
gtttgccacc tgacgtctaa gaaaaggaat attcagcaat ttgcccgctgc cgaagaaagg 60  
cccacccgtg aaggtagacc agtgagttga ttgctacgta attagttagt tagcccttag 120  
tgactcgtaa tacgactcac tatagggtc gaggcggccg cgcaacgcaa ttaatgtgag 180  
ttagctcact cattaggcac cccaggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg 240  
tgaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacaca tatgtttccg tgcaatgcct 300  
atatcgaata tggtgataaa aatatgaaca gctttatcga agatgtggaa cagatctaca 360  
acttcattaa aaagaacatt gatgtggaag aaaagatgca tttcattgaa acctataaac 420  
agaaaagcaa catgaagaaa gagattagct ttagcgaaga atactataaa cagaagatta 480  
tgaacggcaa aatggcgctt gtgtacaccc cgccggaaat ggccggccttt atggttaaaa 540  
atctgatcaa cgtaacgat gttattggca atccgtttat taaaatcatt gaccgagct 600  
gccgtagcgg caatctgatt tgcaaatggt ttctgtatct gaatcgcatc tttattaaga 660  
acattgaggt gattaacagc aaaaataacc tgaatctgaa actggaagac atcagctacc 720  
acatcgctcg caacaatctg tttggcttcg atattgacga aaccgcatc aaagtctga 780  
aaattgatct gtttctgatc agcaaccaat ttagcgagaa aaatttccag gttaaagact 840  
ttctggtgga aaatattgat cgcaaatatg acgtgttcat tggaatccg ccgtatatcg 900  
gtcacaaaag cgtggacagc agctacagct acgtgctgcg caaatctac ggcagcatct 960  
accgcgacaa aggcgatatc agctattggt tctttcagaa gagcctgaaa tgtctgaagg 1020

ES 2 702 621 T3

aaggtggcaa actggtgttt gtgaccagcc gctacttctg cgagagctgc agcggtaaag 1080  
aactgcgtaa attcctgacg gaaaacacga gcatttaca gatcattgat ttttacggca 1140  
tccgcccggt caaacgcgtg ggtatcgatc cgatgattat ttttctgggt cgtacgaaga 1200  
actggaacaa taacattgaa attattcgcc cgaacaagat tgaaaagaac gaaaagaaca 1260  
aattcctgga tagcctgttc ctggacaaaa gcgaaaagtg taaaaagttt agcattagcc 1320  
agaaaagcat taataacgat ggctggggtt tcgtggacga agtggagaaa aacattatcg 1380  
acaaaatcaa agagaaaagc aagttcattc tgaaagatat ttgccatagc tgtcaaggca 1440  
ttatcaccgg ttgtgatcgc gcctttattg tggaccgtga tatcatcaat agccgtaaga 1500  
tcgaactgcg tctgattaaa ccgtggatta aaagcagcca tatccgtaag aatgaagtta 1560  
ttaagggcga aaaattcatc atctatagca acctgattga gaatgaaacc gagtgccga 1620  
atgcgattaa atatatcgaa cagtacaaga aacgtctgat ggagcggccg gaatgcaaaa 1680  
agggcacgcg taagtggat gaactgcaat ggggccgtaa accggaaatc ttcgaagaaa 1740  
agaaaattgt tttcccgtat aaaagctgtg acaatcgttt tgcaactggat aagggtagct 1800  
attttagcgc agacatttat agcctggttc tgaagaaaaa tgtgccgttc acctatgaga 1860  
tcctgctgaa taccctgaat agcccgtgt acgagtttta cttaagacc ttcgcgaaaa 1920  
agctgggcga gaatctgtac gactactatc cgaacaacct gatgaagctg tgcacccga 1980  
gcatcgattt cggcggtgag aacaatattg agaaaaagct gtatgatttc tttggtctga 2040  
cggataaaga aattgagatt gtggagaaga tcaaagataa ctgctaagaa ttcgatatca 2100  
cccgggaact agtctgcagc ctttagtgga gggttaattg gagtcactaa gggtagtga 2160  
gttagattag cagaaagtca aaagcctccg accggaggct tttgactaaa acttcccttg 2220  
gggttatcat tyyyyctcac tcaaaggcgy taatcagata aaaaaaatcc ttagctttcg 2280  
ctaaggatga tttctgctag agatggaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga 2340  
ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt 2400  
gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggttaagcc ctcccgtatc 2460  
gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct 2520  
gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata 2580  
cttagattg atttaaaact tcatTTTTaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt 2640  
gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc 2700  
ttaataagat gatcttcttg agatcgtttt ggtctgcgcg taatctcttg ctctgaaaac 2760  
gaaaaaaccg ccttgacagg cggtttttcg aaggttctct gagctaccaa ctctttgaac 2820  
cgaggtaact ggcttgagg agcgcagtca caaaacttg tcctttcagt ttagccttaa 2880  
ccggcgcgatg acttcaagac taactcctct aatcaatta ccagtggctg ctgccagtgg 2940  
tgcttttgca tgtctttccg ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 3000  
gtcggactga acggggggtt cgtgcataca gtccagcttg gagcgaactg cctaccgga 3060

ES 2 702 621 T3

actgagtgtc aggcgtggaa tgagacaaac gcggccataa cagcggaatg acaccggtaa 3120  
accgaaaggc aggaacagga gagcgcacga gggagccgcc aggggaaacg cctggtatct 3180  
ttatagtcct gtcgggtttc gccaccactg atttgagcgt cagatttcgt gatgcttgtc 3240  
aggggggscg agcctatgga aaaacggcct tgccgcggcc ctctcacttc cctgttaagt 3300  
atcttcctgg catcttcag gaaatctccg ccccgctcgt aagccatttc cgctcgccgc 3360  
agtcgaacga ccgagcgtag cgagtcagt agcgaggaag cggaaatata cctgtatcac 3420  
atattctgct gacgcaccgg tgcagccttt tttctcctgc cacatgaagc acttcactga 3480  
cacctcatc agtgccaaca tagtaagcca gtatacactc cgctagcgt gaggtctgcc 3540  
tcgtgaagaa ggtgttgctg actcatacca ggcctgaatc gcccacatcat ccagccagaa 3600  
agtgaggag ccacggttga tgagagcttt gttgtagggtg gaccagttgg tgattttgaa 3660  
cttttgcttt gccacggaac ggtctgcgtt gtcgggaaga tgcgtgatct gatccttcaa 3720  
ctcagcaaaa gttcgattta ttcaacaaag ccacgttggtg tctcaaaatc tctgatgtta 3780  
cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg aacaataaaa ctgtctgctt acataaacag 3840  
taatacaagg ggtgtttact agaggttgat cgggcacgta agaggttcca actttcacca 3900  
taatgaata agatcactac cgggcgtatt ttttgagtta tcgagatfff caggagctaa 3960  
ggaagctaaa atggagaaaa aaatcacggg atataccacc gttgatataat cccaatggca 4020  
tcgtaaagaa cttttgagg catttcagtc agttgtctaa tgtacctata accagaccgt 4080  
tcagctggat attacggcct ttttaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc 4140  
ggcctttatt cacattcttg cccgcctgat gaacgctcac ccggagtffc gtatggccat 4200  
gaaagacggg gagctggtga tctgggatag tgttcacctc tgttacaccg ttttccatga 4260  
gcaaactgaa acgttttcgt ccctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct 4320  
ccacatatat tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg 4380  
gtttattgag aatatgtttt ttgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga 4440  
tttaaacgtg gccaatatgg acaacttctt cgccccggtt ttcacgatgg gcaaatatta 4500  
tacgcaaggc gacaaggtgc tgatgccgct ggcgatccag gttcatcatg ccgtttgtga 4560  
tggcttccat gtcggccgca tgcttaatga attacaacag tactgtgatg agtggcaggg 4620  
cggggcgtaa taatactagc tccggcaaaa aaacgggcaa ggtgtcacca ccctgccctt 4680  
tttctttaa accgaaaaga ttacttcgc 4709

<210> 50  
<211> 128  
<212> ADN  
<213> e.coli

5

<400> 50  
gcggccgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca 60  
ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 120  
aaacacat 128

10

<210> 51  
<211> 560  
<212> ADN  
<213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 702 621 T3

	<400> 51		
	ttataagaaa tcctaaggaa tatgatgtaa tgagtaaagc tataaatcct tatggagatg	60	
	gcaaggcagc ttatagaata acagaagcta ttttacaata ttttgattta gcaaaaggta	120	
	catatagtga gtttaaatca aattaaag ttataatfff caatfffcat tctfffataa	180	
	ggagattagc atacatfff tcataattat acagacaata tagtaatata tgatgttaaa	240	
	atatcaatat atggttaaaa atctgtatat tfffcccat ttaattatt tgtactataa	300	
	tattacactg agtgtattgt atatffaaaa aatatttggg acaattagtt agttaataa	360	
	attctaaatt gtaaattatc agaatcctta ttaaggaaat acatagattt aaggagaaat	420	
	cataaaaagg tgtaatataa actggctaaa attgagcaaa aattgagcaa ttaagactff	480	
	ttgattgtat cfffatatat atttaaggta tataatcctta tttatattgg gggacttga	540	
	tgaataaaca tattctagac	560	
	<210> 52		
	<211> 297		
5	<212> ADN		
	<213> Clostridium autoethanogenum		
	<400> 52		
	taatfffctg tgtcaataat tttgttata ttatffaat taaatfftc acatgtataa	60	
	ttaaaagtaa gatagatatt ctaatgtact tacttaggta gaaaacatg tatacaaaat	120	
	taaaaaacta ttataacaca tagtatcaat attgaaggta atactgttca atatcgatac	180	
	agataaaaaa atatataata cagaagaaaa aattataaat ttgtggata atataagta	240	
	tagtaattta agtttaaacc tcgtgaaaac gtaacaaat aataggaggt gtattat	297	
	<210> 53		
10	<211> 599		
	<212> ADN		
	<213> Clostridium autoethanogenum		
	<400> 53		
	tttaaaatta tattttgtat taaatcctaat agtacgatgt aagttatfff atactattgc	540	
15	tagtttaata aaaagattta attatatact tgaaaaggag aggaatfff atgctgtaa	599	
	atagtataac tttaaaaaac tgtcttaaaa agttgttata taaaaaatgt tgacaattaa	60	
	acagctatff agtgcaaac aaccataaaa atftaaaaa taccataaat tacttgaaaa	120	
	atagttgata ataatgtaga gttataaaca aagggtgaaa gcattacttg tattcfff	180	
	tatatattat tataaattaa aatgaagctg tattagaaaa aatacacacc tgtaatataa	240	
	aatfftaaat taatffftaa tfffcccaa atgtatffta catgtfftaga atfftgatgt	300	
	atattaaat agtagaatac ataagatact taatftaatt aaagatagtt aagtactfff	360	
	caatgtgctt tfftagatgt ttaatacaaa tctftaattg taaaagaaat gctgtactat	420	
	ttactgtact agtgacggga ttaactgta ttaattataa ataaaaata agtacagttg	480	
	<210> 54		
	<211> 34		
20	<212> ADN		
	<213> clostridium autoethanogenum		
	<400> 54		
	tattgtcga cttaggaggt tctattatga aagg	34	
	<210> 55		
	<211> 30		

ES 2 702 621 T3

<212> ADN  
 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 55  
 aaaactcgag acatTTTT aatgCGacag 30

5 <210> 56  
 <211> 560  
 <212> ADN  
 <213> clostridium ljungdahlii

<400> 56  
 agatagTcat aatagTtcca gaatagTtta atTTtagcatt tggattaaat tcccatatgt 60  
 ttgttaaata tataccaaac tagtatagat atTTTTaaaa tactgtactt aaacagtagt 120  
 aatttacgta aaaaaTTTT ttgattTTTT taaaaagtc cttttcaagt tgtacattat 180  
 tatggtaata tgtaattgaa gaagttgtgt agtaatattg taaacgtttc ttaatttatt 240  
 tTcatccatg tagtgcttaa aaaacaaaa tatgtcacac gcaattgcat atttcaaaca 300  
 ataatatTTa tttctcgtt aaattcacia ataatttatt aataatatca ataaccaaga 360  
 ttatacttaa atggatgttt atTTTTtaac atTTTTtata gtaaataat ttattttatg 420  
 tagtaaaaag gttataatta taattgtatt tattacaatt aattaaaata aaaaaatagg 480  
 gttttaggta aaattaagtt atTTtaagaa gtaattacaa caaaaattga agttatttct 540  
 10 ttaaggaggg aattattaaa 560

<210> 57  
 <211> 557  
 <212> ADN  
 <213> clostridium ragsdalei

15 <400> 57  
 agatagTcat aatagTtcca gaatagTtta atTTtgaaat tggagtaaac ttccaaatgt 60  
 ttgttaaata tataccaaac tagtatagat atTTTTtaaa tactagactt aaacagtaga 120  
 aatttgccTa aaaaTTTTtt tagTTTTtta aaaaaatcct tttcaagttg tacgttatta 180  
 tggtaaatatg taattgaaga agttatgtaa taatattgta aacgtttcct aattTTTTta 240  
 catccatgta atgcttaaaa gacaaaaata tgtcacatgt aattgtatat tTcacataat 300  
 aatatttatt tTcttattaa atTcacaat aatttattaa taatatcaat aaccaagatt 360  
 atacttaaat ggatgtttat ttttaacat tttttatggt aaatatattt atTTtatgta 420  
 gtaaaaaggT tataattata attgtattta ttacaattaa tTaaaataaa aaatagggtt 480  
 ttaggtaaaa ttaagttatt ttaagaagta attacaacaa aaattgaagt tatttcttta 540  
 aggagggaaT tattaata 557

20 <210> 58  
 <211> 536  
 <212> ADN  
 <213> Clostridium ljungdahlii

ES 2 702 621 T3

	<400> 58								
	ttataagaaa	tcctaaggaa	tatgatgtaa	tgagtaaagc	tataaatcct	tatggagatg		60	
	gcaaggcagc	ttatagaata	acagaagcta	ttttacaata	ttttgattta	gcaaaaggta		120	
	catatagtga	gtttaaataca	aattaaaaag	ttataatfff	caatfffcat	tctfftttaa		180	
	ggagattagc	atacatttta	tcataattat	acagacaata	tagtaatata	tgatgttaa		240	
	atatcaatat	atggttaaaa	atctgtatat	ttttcccat	tttaattatt	tgtactataa		300	
	tattacactg	agtgtattgt	atatttaaaa	aatatttgg	acaattagtt	agttaaataa		360	
	attctaaatt	gtaaattatc	agaatcctta	ttaaggaaat	acatagattt	aaggagaaat		420	
	cataaaaagg	tgtaataata	actggctaaa	attgagcaaa	aattgagcaa	ttaagacttt		480	
	ttgattgtat	ctfftttat	atttaaggta	tataatcctta	tttatattgg	gggaac		536	
	<210> 59								
	<211> 549								
5	<212> ADN								
	<213> clostridium ragsdalei								
	<400> 59								
	ttataagaaa	tcctaaggaa	tatgatgtaa	tgagtaaagc	tataaatcct	tatggagatg		60	
	gcaaggcagc	ttatagaata	acagaagcta	ttttacaata	ttttgattta	gcaaaaggta		120	
	catatagtga	gtttaaataca	aattaaaaag	ttataatfff	gaatfffcat	tctfftttaa		180	
	ggagattagc	atacatttta	tcataattat	acagacaata	tagtaatata	tgatgttaa		240	
	atatcaatat	atggttaaaa	aactgtatat	ttttcccat	tttaattatt	tgtactataa		300	
	tattacactg	agtgtattgt	atatttaaaa	aatatttgg	acaattagtt	agttaaataa		360	
	attctaaatt	ataaattatc	agaaacctta	ttaaggaaat	acatagattt	agggagaaat		420	
	aataaaaagg	tgtaataata	actggctaaa	gttgagtaat	taagactfff	aggttgtatc		480	
	tttttatata	ttaagggtat	ataatcctag	ttatataggg	ggaacttgat	gaataaacat		540	
	attctagac							549	
	<210> 60								
10	<211> 298								
	<212> ADN								
	<213> Clostridium ljungdahlii								
	<400> 60								
	taatfftttg	tgcaataat	ttttgttata	ttatfftaat	taaatffttc	acatgtataa		60	
	ttaaagtaa	gatagatatt	ctaagtact	tacttaggta	gaaaacatg	tatacaaat		120	
	taaaaaacta	ttataacaca	tagtatcaat	attgaaggta	atactgttca	atatcgatac		180	
	agataaaaaa	aatatataat	acagaagaaa	aaattataaa	tttgtggtat	aatataaagt		240	
	atagtaattt	aagtttaaac	ctcgtgaaaa	cgctaacaaa	taataggagg	tgtattat		298	
15	<210> 61								
	<211> 300								
	<212> ADN								
	<213> clostridium ragsdalei								

ES 2 702 621 T3

	<400> 61		
	taatttttta tatcaataat ttttattata ttattttaat taaatttttc acatgtataa	60	
	ttaaaagtaa gatagagata gttaggatat tttagtgcatt ttatttagat aaaaaatag	120	
	tatacaagat tagaaaaaa ttataacaca taatagttgc attgaaggta atactgttca	180	
	ataticgatac agataaaaaa atttataata cagaagaaaa aatataaat ttgtggata	240	
	atataaaata taataattta gatttacacc ccgtgaaaac gctaacaaat aatagggag	300	
	<210> 62		
	<211> 590		
5	<212> ADN		
	<213> Clostridium ljungdahlii		
	<400> 62		
	atagtataac tttaaaaaac tgtcttaaaa agttgttata taaaaaatgt tgacaattaa	60	
	acagctattt agtgcaaac aaccataaaa atttaaaaa taccataaat tacttgaaa	120	
	atagttgata ataagttaga gttataaaca aaggtgaaaa gcattacttg tattctttt	180	
	tatatattat tataaattaa aatgaagctg tattagaaaa aatacacacc tgtaataaa	240	
	aattttaaat taatttttaa tttttcaaa atgtatttta catgtttaga attttgatgt	300	
	atattaaaaat agtagaatac ataagatact taatttaatt aaagatagtt aagtactttt	360	
	caatgtgctt ttttagatgt ttaatacaaa tctttaattg taaaagaaat gctgtactat	420	
	ttactgtact agtgacggga ttaaactgta ttaattataa ataaaaata agtacagttg	480	
	tttaaaatta tattttgtat taaatctaag agtacgatgt aagttatttt atactattgc	540	
	tagtttaata aaaagattta attatatact tgaaaaggag aggaattttt	590	
	<210> 63		
10	<211> 600		
	<212> ADN		
	<213> Clostridium ragsdalei		
	<400> 63		
	atagaataac ttaaaaaaac tgtcttaaaa agctgttata taaaaaatg ttaacaatta	60	
	aacagctatt tagtgcaaaa caaccataaa aatttaaaaa ataccataaa ttacttgaaa	120	
	aatagtagag aataatgtag agttataaac gaaggtgaaa agcattactt gtattccttt	180	
	ttacagacta ttataaatta agataaagct gtattaggaa aatgacacac ctgtaataa	240	
15	aggtttttaa ttaattttta attttcccaa aatgtatttt acatgttttag aattttgatg	300	
	tatattaaaa tagtagaata cataagatac ttaatttaatt aaagatagtt aagtactttt	360	
	caatgtactt ttttagatat ttaatacaag tttttaattg taaaaaatg ctgtgctatt	420	
	tactgtacta atgtagtac tatatctgta ttaattgtat gtaaaaagta agtatagtta	480	
	tttaagatta tgttttgtat taaatctaaa tagtacaatg taggttatgt tatactattg	540	
	ctagtttaatt aaaaagattt aattatatac ttgaaaagga gaggaatttt tatgctgaaa	600	
	<210> 64		
	<211> 25		
20	<212> ADN		
	<213> cebador sintético		
	<400> 64		
	ttgatgaat gatcactgac ggatt	25	
	<210> 65		
	<211> 25		

	<212> ADN	
	<213> cebador sintético	
	<400> 65	
	gaaatgttcc atctctcagc tatgt	25
5	<210> 66	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> cebador sintético	
	<400> 66	
10	ctaatacgag gaggacatgt tgatg	25
	<210> 67	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> cebador sintético	
15	<400> 67	
	cacccatacc tgggacaatt ttatt	25
	<210> 68	
	<211> 25	
	<212> ADN	
20	<213> cebador sintético	
	<400> 68	
	gggctgctac taaaaatttc aatcc	25
	<210> 69	
	<211> 25	
25	<212> ADN	
	<213> cebador sintético	
	<400> 69	
	caggagtcac tatggcatct ctttt	25
	<210> 70	
30	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> cebador sintético	
	<400> 70	
	tagtaccaga gccactgaa ttaga	25
35	<210> 71	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> cebador sintético	
	<400> 71	
40	ggaatagctt gaccacattc tgtat	25
	<210> 72	
	<211> 1647	
	<212> ADN	
	<213> Lactococcus lactis	

ES 2 702 621 T3

<400> 72  
atgtatacag taggagatta cctattagac cgattacacg agttaggaat tgaagaaatt 60  
tttgagatcc ctggagacta taacttaca tttttagatc aaattatttc ccacaaggat 120  
atgaaatggg tcggaatgc taatgaatta aatgcttcat atatggctga tggctatgct 180  
cgtactaaaa aagctgccgc atttcttaca acctttggag taggtgaatt gagtgcagtt 240  
aatggattag caggaagtta cgccgaaaat ttaccagtag tagaaatagt gggatcacct 300  
acatcaaaag ttcaaatga aggaaaattt gttcatcata cgctggctga cggtgathtt 360  
aaacacttta tgaaaatgca cgaacctgtt acagcagctc gaactttact gacagcagaa 420  
aatgcaaccg ttgaaattga ccgagtactt tctgcactat taaaagaaag aaaacctgtc 480  
tatatcaact taccagttga tgttgctgct gcaaaagcag agaaaccctc actccctttg 540  
aaaaaggaaa actcaacttc aaatacaagt gaccaagaaa ttttgaaca aattcaagaa 600  
agcttgaaaa atgccaaaa accaatcgtg attacaggac atgaaataat tagttttggc 660  
ttagaaaaaa cagtcactca atttatttca aagacaaaac tacctattac gacattaac 720  
tttggtaaaa gttcagttga tgaagccctc cttcatttt taggaatcta taatgttaca 780  
ctctcagagc ctaatcttaa agaattcgtg gaatcagccg acttcatctt gatgcttggg 840  
gttaactca cagactcttc aacaggagcc ttactcatc atttaaatga aaataaaatg 900  
atctactga atatagatga aggaaaaata tttaacgaaa gaatccaaa ttttgathtt 960  
gaatccctca tctcctctct cttagaccta agcgaatag aatacaaagg aaaatatatc 1020  
gataaaaagc aagaagactt tgttccatca aatgcgcttt tatcacaaga ccgcctatgg 1080  
caagcagttg aaaacctaac tcaaagcaat gaaacaatcg ttgctgaaca agggacatca 1140  
ttctttggcg cttcatcaat tttcttaaaa tcaaagagtc attttattgg tcaaccctta 1200  
tggggatcaa ttggatatac attcccagca gcattaggaa gccaaattgc agataaagaa 1260  
agcagacacc ttttatttat tggtgatggt tcacttcaac ttacagtga agaattagga 1320  
ttagcaatca gagaaaaat taatccaatt tgctttatta tcaataatga tggttataca 1380  
gtcgaagag aaattcatgg accaaatcaa agctacaatg atattccaat gtggaattac 1440  
tcaaaattac cagaatcgtt tggagcaaca gaagatcgag tagtctcaa aatcgttaga 1500  
actgaaaatg aatttgtgct tgtcatgaaa gaagctcaag cagatccaaa tagaatgtac 1560  
tggattgagt taattttggc aaaagaaggt gcaccaaaag tactgaaaa aatgggcaaa 1620  
ctatttgctg aacaaaataa atcataa 1647

5 <210> 73  
<211> 548  
<212> PRT  
<213> Lactococcus lactis

ES 2 702 621 T3

<400> 73

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

ES 2 702 621 T3

Glu Ile Leu Asn Lys Ile Gln Glu Ser Leu Lys Asn Ala Lys Lys Pro  
 195 200 205  
 Ile Val Ile Thr Gly His Glu Ile Ile Ser Phe Gly Leu Glu Lys Thr  
 210 215 220  
 Val Thr Gln Phe Ile Ser Lys Thr Lys Leu Pro Ile Thr Thr Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Phe Gly Lys Ser Ser Val Asp Glu Ala Leu Pro Ser Phe Leu Gly Ile  
 245 250 255  
 Tyr Asn Gly Thr Leu Ser Glu Pro Asn Leu Lys Glu Phe Val Glu Ser  
 260 265 270  
 Ala Asp Phe Ile Leu Met Leu Gly Val Lys Leu Thr Asp Ser Ser Thr  
 275 280 285  
 Gly Ala Phe Thr His His Leu Asn Glu Asn Lys Met Ile Ser Leu Asn  
 290 295 300  
 Ile Asp Glu Gly Lys Ile Phe Asn Glu Arg Ile Gln Asn Phe Asp Phe  
 305 310 315 320  
 Glu Ser Leu Ile Ser Ser Leu Leu Asp Leu Ser Glu Ile Glu Tyr Lys  
 325 330 335  
 Gly Lys Tyr Ile Asp Lys Lys Gln Glu Asp Phe Val Pro Ser Asn Ala  
 340 345 350  
 Leu Leu Ser Gln Asp Arg Leu Trp Gln Ala Val Glu Asn Leu Thr Gln  
 355 360 365  
 Ser Asn Glu Thr Ile Val Ala Glu Gln Gly Thr Ser Phe Phe Gly Ala  
 370 375 380  
 Ser Ser Ile Phe Leu Lys Ser Lys Ser His Phe Ile Gly Gln Pro Leu  
 385 390 395 400  
 Trp Gly Ser Ile Gly Tyr Thr Phe Pro Ala Ala Leu Gly Ser Gln Ile  
 405 410 415  
 Ala Asp Lys Glu Ser Arg His Leu Leu Phe Ile Gly Asp Gly Ser Leu  
 420 425 430  
 Gln Leu Thr Val Gln Glu Leu Gly Leu Ala Ile Arg Glu Lys Ile Asn  
 435 440 445  
 Pro Ile Cys Phe Ile Ile Asn Asn Asp Gly Tyr Thr Val Glu Arg Glu  
 450 455 460

ES 2 702 621 T3

Ile His Gly Pro Asn Gln Ser Tyr Asn Asp Ile Pro Met Trp Asn Tyr  
465 470 475 480

Ser Lys Leu Pro Glu Ser Phe Gly Ala Thr Glu Asp Arg Val Val Ser  
485 490 495

Lys Ile Val Arg Thr Glu Asn Glu Phe Val Ser Val Met Lys Glu Ala  
500 505 510

Gln Ala Asp Pro Asn Arg Met Tyr Trp Ile Glu Leu Ile Leu Ala Lys  
515 520 525

Glu Gly Ala Pro Lys Val Leu Lys Lys Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu  
530 535 540

Gln Asn Lys Ser  
545

<210> 74

<211> 2094

<212> ADN

5 <213> *Sacchromyces cerevisiae*

<400> 74

atgtctattc cagaaactca aaaagccatt atcttctacg aatccaacgg caagttggag	60
cataaggata tcccagttcc aaagccaaag cccaacgaat tgtaatacaa cgtaagtac	120
tctggtgtct gccacaccga tttgcacgct tggcatggtg actggccatt gccaactaag	180
ttaccattag ttggtggtca cgaaggtgcc ggtgtcgttg tcggcatggg tgaaaacggt	240
aagggtctga agatcggatga ctacgccggt atcaaatggt tgaacggttc ttgtatggcc	300
tgtgaatact gtgaattggg taacgaatcc aactgtcctc acgctgactt gtctggttac	360
accacgacg gttctttcca agaatacgtc accgctgacg ctggtcaagc cgctcacatt	420
cctcaaggta ctgacttggc tgaagtcgcg ccaatcttgt gtgctggtat caccgtatac	480
aaggctttga agtctgcca cttgagagca ggccactggg cggccatttc tgggtctgct	540
ggtggtctag gttctttggc tgttcaatat gctaaggcga tgggttacag agtcttaggt	600
attgatgggtg gtccaggaaa ggaagaattg tttacctcgc tcggtggtga agtattcatc	660
gacttcacca aagagaagga cattgttagc gcagtcgta aggctaccaa cggcggtgcc	720
cacggtatca tcaatgtttc cgtttccgaa gccgctatcg aagcttctac cagatactgt	780
agggcgaacg gtactgttgt cttggttggg ttgccagccg gtgcaaagtg ctctctgat	840
gtcttcaacc acgttgtcaa gtctatctcc attgtcggct cttacgtggg gaacagagct	900
gataccagag aagccttaga tttctttgcc agaggctctag tcaagtctcc aataaaggta	960
gttggcttat ccagtttacc agaaatttac gaaaagatgg agaaggcca aattgctggt	1020
agatacgttg ttgacacttc taaataaatg tctattccag aaactcaaaa agccattatc	1080
ttctacgaat ccaacggcaa gttggagcat aaggatatcc cagttccaaa gccaaagccc	1140

ES 2 702 621 T3

aacgaattgt taatcaacgt caagtactct ggtgtctgcc acaccgattt gcacgcttgg 1200  
 catggtgact ggccattgcc aactaagtta ccattagttg gtggtcacga aggtgccggt 1260  
 gtcgttgtcg gcatgggtga aaacgttaag ggctggaaga tcggtgacta cgccggtatc 1320  
 aatggttga acggttcttg tatggcctgt gaatactgtg aattgggtaa cgaatccaac 1380  
 tgtcctcacg ctgacttgtc tggttacacc cacgacggtt ctttccaaga atacgctacc 1440  
 gctgacgctg ttcaagccgc tcacattcct caaggctactg acttggctga agtcgcgcca 1500  
 atcttgtgtg ctggtatcac cgtatacaag gctttgaagt ctgccaaactt gagagcaggc 1560  
 cactgggagg ccatttcttg tgctgctggt ggtctagggt ctttggctgt tcaatatgct 1620  
 aaggcgatgg gttacagagt cttaggtatt gatggtggtc caggaaagga agaattgttt 1680  
 acctcgctcg gtggtgaagt attcatcgac ttcaccaaag agaaggacat tgttagcgca 1740  
 gtcgtaagg ctaccaacgg cggtgccac ggtatcatca atgtttccgt ttccgaagcc 1800  
 gctatcgaag ctctaccag atactgtagg gcgaacggta ctggtgtctt ggttggtttg 1860  
 ccagccggtg caaagtgctc ctctgatgtc ttcaaccacg ttgtcaagtc tatctccatt 1920  
 gtcggctctt acgtggggaa cagagctgat accagagaag ccttagattt ctttgccaga 1980  
 ggtctagtca agtctcaat aaaggtagtt ggcttatcca gtttaccaga aatttacgaa 2040  
 aagatggaga agggccaaat tgctggtaga tacgttgttg acacttctaa ataa 2094

<210> 75

<211> 348

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 75

Met Ser Ile Pro Glu Thr Gln Lys Ala Ile Ile Phe Tyr Glu Ser Asn  
 1 5 10 15

Gly Lys Leu Glu His Lys Asp Ile Pro Val Pro Lys Pro Lys Pro Asn  
 20 25 30

Glu Leu Leu Ile Asn Val Lys Tyr Ser Gly Val Cys His Thr Asp Leu  
 35 40 45

His Ala Trp His Gly Asp Trp Pro Leu Pro Thr Lys Leu Pro Leu Val  
 50 55 60

Gly Gly His Glu Gly Ala Gly Val Val Val Gly Met Gly Glu Asn Val  
 65 70 75 80

Lys Gly Trp Lys Ile Gly Asp Tyr Ala Gly Ile Lys Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95

Ser Cys Met Ala Cys Glu Tyr Cys Glu Leu Gly Asn Glu Ser Asn Cys  
 100 105 110

ES 2 702 621 T3

Pro His Ala Asp Leu Ser Gly Tyr Thr His Asp Gly Ser Phe Gln Glu  
 115 120 125

Tyr Ala Thr Ala Asp Ala Val Gln Ala Ala His Ile Pro Gln Gly Thr  
 130 135 140

Asp Leu Ala Glu Val Ala Pro Ile Leu Cys Ala Gly Ile Thr Val Tyr  
 145 150 155 160

Lys Ala Leu Lys Ser Ala Asn Leu Arg Ala Gly His Trp Ala Ala Ile  
 165 170 175

Ser Gly Ala Ala Gly Gly Leu Gly Ser Leu Ala Val Gln Tyr Ala Lys  
 180 185 190

Ala Met Gly Tyr Arg Val Leu Gly Ile Asp Gly Gly Pro Gly Lys Glu  
 195 200 205

Glu Leu Phe Thr Ser Leu Gly Gly Glu Val Phe Ile Asp Phe Thr Lys  
 210 215 220

Glu Lys Asp Ile Val Ser Ala Val Val Lys Ala Thr Asn Gly Gly Ala  
 225 230 235 240

His Gly Ile Ile Asn Val Ser Val Ser Glu Ala Ala Ile Glu Ala Ser  
 245 250 255

Thr Arg Tyr Cys Arg Ala Asn Gly Thr Val Val Leu Val Gly Leu Pro  
 260 265 270

Ala Gly Ala Lys Cys Ser Ser Asp Val Phe Asn His Val Val Lys Ser  
 275 280 285

Ile Ser Ile Val Gly Ser Tyr Val Gly Asn Arg Ala Asp Thr Arg Glu  
 290 295 300

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

Val Gly Leu Ser Ser Leu Pro Glu Ile Tyr Glu Lys Met Glu Lys Gly  
 325 330 335

Gln Ile Ala Gly Arg Tyr Val Val Asp Thr Ser Lys  
 340 345

<210> 76  
 <211> 1650  
 <212> ADN  
 <213> Lactococcus lactis

5

<400> 76  
 catatgtata cagtaggaga ttacctatta gaccgattac acgagttagg aattgaagaa

60

ES 2 702 621 T3

atttttggag tccctggaga ctataactta caatthtttag atcaaattat ttcccacaag 120  
 gatatgaaat gggtcggaaa tgctaataaa ttaaattgctt catatatggc tgatggctat 180  
 gctcgtacta aaaaagctgc cgcattttctt acaacctttg gagtaggtga attgagtgca 240  
 gttaatggat tagcaggaag ttacgccgaa aatttaccag tagtagaaat agtgggatca 300  
 cctacatcaa aagttcaaaa tgaaggaaaa tttgtttcatc atacgctggc tgacggtgat 360  
 tttaaacact ttatgaaaat gcacgaacct gttacagcag ctggaacttt actgacagca 420  
 gaaaatgcaa ccgttgaaat tgaccgagta ctttctgcac tattaaaaga aagaaaacct 480  
 gtctatatca acttaccagt tgatggttctt gctgcaaaag cagagaaacc ctactccct 540  
 ttgaaaaagg aaaactcaac ttcaaataca agtgaccaag aaatthttgaa caaaattcaa 600  
 gaaagcttga aaaatgccaa aaaaccaatc gtgattacag gacatgaaat aattagthttt 660  
 ggcttagaaa aacagtcac tcaatthatt tcaaagacaa aactacctat tacgacatta 720  
 aactthtgta aaagttcagt tgatgaagcc ctcccttcat thtttagaat ctataatggt 780  
 aactctcag agcctaattc taaagaattc gtggaatcag ccgacttcat cttgatgctt 840  
 ggagthaaac tcacagactc ttcaacagga gccttctactc atcatthaaa tgaaaataaa 900  
 atgattthac tgaatataga tgaaggaaaa atatthaacg aaagaatcca aaatthttgat 960  
 thttgaaatccc tcatctctc tctcttagac ctaagcgaaa tagaatacaa aggaaaatat 1020  
 atcgataaaa agcaagaaga cthttgttcca tcaaatgctc thttatcaca agaccgcta 1080  
 tggcaagcag ttgaaaacct aactcaaagc aatgaaacaa tcgthtgctga acaagggaca 1140  
 tcattctthtg gcgcttcatc aatthttctta aatcaaaga gtcattthttat tggthcaacc 1200  
 ttatggggat caatthgata tacattccca gcagcattag gaagccaaat tgcagataaa 1260  
 gaaagcagac acctthttatt tattggtgat gthttacttc aacttacagt gcaagaatta 1320  
 ggattagcaa tcagagaaaa aattaatcca atthtgctta ttatcaataa tgatgthttat 1380  
 acagthcgaag gagaaattca tggaccaaat caaagctaca atgatattcc aatgthggaat 1440  
 tactcaaat taccagaatc gthttggagca acagaagatc gagtagthctc aaaaatcgth 1500  
 agaactgaaa atgaatthgt gtctgtcatg aaagaagctc aagcagatcc aatagaatg 1560  
 tactggattg agthaatthtt ggcaaaagaa gthtgaccaaa aagthactgaa aaaaatggg 1620  
 aaactatthtg ctgaacaaaa taaatcataa 1650

<210> 77

<211> 1047

5 <212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 77

atgtctattc cagaaactca aaaagccatt atcttctacg aatccaacgg caagthggag 60  
 cataaggata tccagthtcc aaagccaaag cccaacgaat thttaatcaa cgtcaagthac 120  
 tctgthgtct gccacaccga thttgcagct thggcatgthg actgthccatt gccaaactaag 180  
 thaccattag thggthgthca cgaagthgthc gthgtctgthg thggcatgthg thgaaacgth 240

ES 2 702 621 T3

aagggtctgga agatcgggtga ctacgccggt atcaaatggt tgaacgggtc ttgtatggcc 300  
 tgtgaatact gtgaattggg taacgaatcc aactgtcctc acgctgactt gtctggttac 360  
 acccacgacg gttctttcca agaatacgtc accgctgacg ctggttcaagc cgctcacatt 420  
 cctcaaggta ctgacttggc tgaagtcgcy ccaatcttgt gtgctggat caccgtatac 480  
 aaggctttga agtctgccaa cttgagagca ggccactggg cggccatttc tgggtgctgct 540  
 ggtggtctag gttctttggc tgttcaatat gctaaggcga tgggttacag agtcttaggt 600  
 attgatggty gtccaggaaa ggaagaattg tttacctcgc tcggtggtga agtattcatc 660  
 gacttcacca aagagaagga cattgttagc gcagtcgta aggctaccaa cggcggtgcc 720  
 cacggtatca tcaatgtttc cgtttccgaa gccgctatcg aagcttctac cagatactgt 780  
 agggcgaacg gtactgttgt cttggttggg ttgccagccg gtgcaaagt ctcctctgat 840  
 gtcttcaacc acgttgtaa gtctatctcc attgtcggct cttacgtggg gaacagagct 900  
 gataccagag aagccttaga tttctttgcc agaggcttag tcaagtctcc aataaaggta 960  
 gttggcttat ccagtttacc agaaatttac gaaaagatgg agaagggcca aattgctggt 1020  
 agatacgttg ttgacacttc taaataa 1047

<210> 78

<211> 2744

5 <212> ADN

<213> Ácido nucleico sintético

<400> 78

catatgtata cagtaggaga ttacctatta gaccgattac acgagttagg aattgaagaa 60  
 atttttggag tccctggaga ctataactta caatthtttag atcaaattat ttcccacaag 120  
 gatatgaaat gggctcgaaa tgctaataaa ttaaatgctt catatatggc tgatggctat 180  
 gctcgtacta aaaaagctgc cgcatthctt acaacctttg gagtaggtga attgagtgca 240  
 gttaatggat tagcaggaag ttacgccgaa aatthaccag tagtagaaat agtgggatca 300  
 cctacatcaa aagttcaaaa tgaaggaaaa tttgttcatc atacgctggc tgacgggtgat 360  
 tttaaacact ttatgaaaat gcacgaacct gttacagcag ctcgaactth actgacagca 420  
 gaaaatgcaa ccgttgaaat tgaccgagta cthttctgcac tattaaaaga aagaaaacct 480  
 gtctatatca actthaccagt tgatgthgct gctgcaaaaag cagagaaacc ctcactccct 540  
 ttgaaaaagg aaaactcaac thcaaatata agtgaccaag aaatthtgaa caaaattcaa 600  
 gaaagcttga aaaatgcaa aaaaccaatc gtgattacag gacatgaaat aattagthtt 660  
 ggcttagaaa aaacagtcac tcaatthatt tcaagacaa aactacctat tacgacatta 720  
 aactthgta aaagthcagt tgatgaagcc thcccttcat thtttagaat ctataatggt 780  
 aactctcag agcctaatct taaagaatth gtggaatcag ccgacttcat cttgatgctt 840  
 ggagthaaac tcacagactc thcaacagga gcctthctc atcattthaa tgaaaataaa 900  
 atgattthc tgaatataga tgaaggaaaa atatthaacg aaagaatcca aaatthtgat 960

ES 2 702 621 T3

ttggaatccc tcatctcctc tctcttagac ctaagcgaaa tagaatacaa aggaaaatat 1020  
 atcgataaaa agcaagaaga ctttgttcca tcaaatgcmc tttatcaca agaccgccta 1080  
 tggcaagcag ttgaaaacct aactcaaagc aatgaaacaa tcgttgctga acaagggaca 1140  
 tcattctttg gcgcttcac c aatcttcta aatcaaaga gtcattttat tggcaaccc 1200  
 ttatggggat caattggata tacattccca gcagcattag gaagccaaat tgcagataaa 1260  
 gaaagcagac accttttatt tattgggtgat ggttcacttc aacttacagt gcaagaatta 1320  
 ggattagcaa tcagagaaaa aattaatcca atttgcttta ttatcaataa tgatggttat 1380  
 acagtcgaaa gagaaattca tggaccaaat caaagctaca atgatattcc aatgtggaat 1440  
 tactcaaaat taccagaatc gtttgagca acagaagatc gagtagtctc aaaaatcgtt 1500  
 agaactgaaa atgaatttgt gtctgtcatg aaagaagctc aagcagatcc aatagaatg 1560  
 tactggattg agttaatctt ggcaaaagaa ggtgcaccaa aagtactgaa aaaaatgggc 1620  
 aaactatctg ctgaacaaaa taaatcataa gaattcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680  
 aaaaaaaaaa aatgtctatt ccagaaactc aaaaagccat tatcttctac gaatccaacg 1740  
 gcaagttgga gcataaggat atcccagttc caaagccaaa gcccaacgaa ttgttaatca 1800  
 acgtcaagta ctctgggtgc tgccacaccg atttgcacgc ttggcatggt gactggccat 1860  
 tgccaactaa gttaccatta gttgggtggt acgaaggtgc cgggtgctgt gtcggcatgg 1920  
 gtgaaaacgt taagggtctg aagatcgggt actacgccg tatcaaatgg ttgaacggtt 1980  
 cttgtatggc ctgtgaatac tgtgaattgg gtaacgaatc caactgtcct cacgctgact 2040  
 tgtctgggta caccacgac ggttctttcc aagaatacgc taccgctgac gctgttcaag 2100  
 ccgctcacat tcctcaaggc actgacttgg ctgaagtcgc gccaatcttg tgtgctggta 2160  
 tcaccgtata caaggctttg aagtctgcca acttgagagc aggccactgg gcggccatct 2220  
 ctgggtgctg tgggtgctta ggttctttgg ctgttcaata tgctaaggcg atgggttaca 2280  
 gagtcttagg tattgatggt ggtccaggaa aggaagaatt gttacctcg ctcgggtggtg 2340  
 aagtattcat cgacttcacc aaagagaagg acattgttag cgcagtcggt aaggctacca 2400  
 acggcgggtc ccacggatc atcaatgttt ccgtttccga agccgctatc gaagcttcta 2460  
 ccagatactg tagggcgaac ggtactgttg tcttggttgg tttgccagcc ggtgcaaagt 2520  
 gctcctctga tgccttcaac cacgttgca agtctatctc cattgtcggc tcttacgtgg 2580  
 ggaacagagc tgataccaga gaagccttag atttctttgc cagaggtcta gtcaagtctc 2640  
 caataaaggc agttggctta tccagtttac cagaaattta cgaaaagatg gagaagggcc 2700  
 aaattgctgg tagatacgtt gttgacactt ctaaataagg tacc 2744

<210> 79

<211> 479

5 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 79

aatatgatat ttatgtccat tgtgaaaggg attatattca actattattc cagttacggt 60

ES 2 702 621 T3

	catagaaatt ttcctttcta aatatattta ttccatgtca agaactctgt ttatttcatt	120
	aaagaactat aagtacaaag tataaggcat ttgaaaaaat aggctagtat attgattgat	180
	tatttatattt aaaatgccta agtgaaatat atacatatta taacaataaa ataagtatta	240
	gtgtaggatt tttaaataga gtatctattt tcagattaaa tttttgatta tttgatttac	300
	attatataat attgagtaaa gtattgacta gcaaaatttt ttgatacttt aatttgtgaa	360
	atctcttatac aaaagttata tttttgaata atttttattg aaaaatacaa ctaaaaagga	420
	ttatagtata agtgtgtgta attttvtgtt aaatttaaag ggaggaaatg aacatgaaa	479
	<210> 80	
	<211> 28	
5	<212> ADN	
	<213> cebador sintético	
	<400> 80	
	gagcggccgc aatatgatat ttatgtcc	28
	<210> 81	
10	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> cebador sintético	
	<400> 81	
	ttccatagt ttcatgtca ttcctcc	28
15	<210> 82	
	<211> 3552	
	<212> ADN	
	<213> Ácido nucleico sintético	
	<400> 82	
	aaactccttt ttgataatct catgaccaa atccctaac gtgagttttc gttccactga	60
	gcgctagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta	120
	atctgtctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa	180
	gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact	240
	gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca	300
	tacctcgctc tgctaatect gttaccagt gctgctgcc gtggcgataa gtcgtgtctt	360
	accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg	420
	ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag	480
	cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggtg	540
	agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgctgtgtat	600
	ctttatagtc ctgtcggggt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg	660
	tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc	720
	ttttgtctggc cttttgtctca catgttcttt cctgcgttat ccctgattc tgtggataac	780
20	cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgcgca gccgaacgac cgagcgcagc	840

ES 2 702 621 T3

gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgcga gggccccctg caggataaaa 900  
aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat ttttttatca ggaaacagct 960  
atgaccgcgg cgcgaatatg atatttatgt ccattgtgaa agggattata ttcaactatt 1020  
attccagtta cgttcataga aattttcctt tctaaaatat tttattccat gtcaagaact 1080  
ctgtttattt cattaaagaa ctataagtac aaagtataag gcatttgaaa aaataggcta 1140  
gtatattgat tgattattta ttttaaatg cctaagtgaa atatatacat attataacaa 1200  
taaaataagt attagtgtag gatTTTTaaa tagagtatct attttcagat taaatttttg 1260  
attatttgat ttacattata taatattgag taaagtattg actagcaaaa ttttttgata 1320  
ctttaatttg tgaattttct tatcaaaagt tatatttttg aataattttt attgaaaaat 1380  
acaactaaaa aggattatag tataagtgtg tgtaattttg tgtaaattt aaagggagga 1440  
aatgaacatg aaacatatgg tgaccatgat tacgaattcg agctcggtag ccggggatcc 1500  
tctagagtcg acgtcacgcg tccatggaga tctcggaggc tgcagacatg caagcttggc 1560  
actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc aacttaatcg 1620  
ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 1680  
cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc tagcataaaa ataagaagcc 1740  
tgcatgtgca ggcttcttat ttttatggcg cgccgattc acttcttttc tatataaata 1800  
tgagcgaagc gaataagcgt cggaaaagca gcaaaaagtt tcctttttgc tgttgagca 1860  
tgggggttca gggggtgcag tatctgacgt caatgccgag cgaaagcgag ccgaagggta 1920  
gcatttacgt tagataacc cctgatatgc tccgacgctt tatatagaaa agaagattca 1980  
actaggtaaa atcttaatat aggttgagat gataaggttt ataaggaatt tgtttgttct 2040  
aatttttcac tcattttggt ctaatttctt ttaacaaatg ttcttttttt tttagaacag 2100  
ttatgatata gttagaatag tttaaaataa ggagtgagaa aaagatgaaa gaaagatag 2160  
gaacagtcta taaaggctct cagaggctca tagacgaaga aagtggagaa gtcatagagg 2220  
tagacaagtt ataccgtaaa caaacgtctg gtaacttctg aaaggcatat atagtgcaat 2280  
taataagtat gttagatag attggcggaa aaaaacttaa aatcgttaac tatatcctag 2340  
ataatgtcca cttagtaac aatacaatga tagctacaac aagagaaata gcaaaagcta 2400  
caggaacaag tctacaaaca gtaataacaa cacttaaaat cttagaagaa ggaaatatta 2460  
taaaaagaaa aactggagta ttaatgttaa accctgaact actaatgaga ggcgacgacc 2520  
aaaaacaaaa atacctctta ctcgaatttg ggaactttga gcaagaggca aatgaaatag 2580  
attgacctcc caataacacc acgtagtatt tgggaggctc atctatgaaa tgcgattaag 2640  
ggccggccga agcaaaccta agagtgtggt gatagtgcag tatcttaaaa ttttgataa 2700  
taggaattga agttaatta gatgctaaaa atttgtaatt aagaaggagt gattacatga 2760  
acaaaaatat aaaatattct caaaactttt taacgagtga aaaagtactc aaccaataa 2820  
taaaacaatt gaatttaaaa gaaaccgata ccgtttacga aattggaaca ggtaaagggc 2880

ES 2 702 621 T3

atttaacgac gaaactggct aaaataagta aacaggtaac gtctattgaa ttagacagtc 2940  
 atctattcaa cttatcgta gaaaaattaa aactgaatac tcgtgtcact ttaattcacc 3000  
 aagatattct acagtttcaa ttccctaaca aacagaggta taaaattggt gggagtattc 3060  
 cttaccattt aagcacacaa attattaataa aagtggtttt tgaaagccat gcgtctgaca 3120  
 tctatctgat tgtgaagaa ggattctaca agcgtacctt ggatattcac cgaacactag 3180  
 ggttgctctt gcacactcaa gtctcgattc agcaattgct taagctgcca gcggaatgct 3240  
 ttcacctaata accaaaagta aacagtgtct taataaaact taccggccat accacagatg 3300  
 ttccagataa atattggaag ctatatacgt actttgtttc aaaatgggtc aatcgagaat 3360  
 atcgtcaact gtttactaaa aatcagtttc atcaagcaat gaaacacgcc aaagtaaaca 3420  
 atttaagtac cgttacttat gagcaagtat tgtctatttt taatagttat ctattattta 3480  
 acgggaggaa ataattctat gagtcgcttt tgtaaatttg gaaagttaca cgttactaaa 3540  
 gggaaatgtgt tt 3552

<210> 83

<211> 6263

<212> ADN

5 <213> Ácido nucleico sintético

<400> 83

aaactccttt ttgataatct catgaccaa atccctaac gtgagttttc gttccactga 60  
 gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 120  
 atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa 180  
 gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
 gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
 tacctcgctc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 360  
 accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480  
 cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggta 540  
 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat 600  
 ctttatagtc ctgtcggggt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 660  
 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 720  
 ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac 780  
 cgtattaccg ctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc 840  
 gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacga gggccccctg caggataaaa 900  
 aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat tttttatca ggaaacagct 960  
 atgaccgagg ccgcaatag atatttatgt ccattgtgaa agggattata ttcaactatt 1020  
 attccagtta cgttcataga aattttcctt tctaaaatat tttattccat gtcaagaact 1080  
 ctgtttattt cattaaagaa ctataagtac aaagtataag gcatttgaaa aaataggcta 1140

ES 2 702 621 T3

gtatattgat	tgattattta	ttttaaaatg	cctaagtgaa	atatatacat	attataacaa	1200
taaaataagt	attagtgtag	gatttttaaa	tagagtatct	atnttcagat	taaatntttg	1260
attatnttgat	ttacattata	taatattgag	taaagtattg	actagcaaaa	ttntttgata	1320
ctttaatttg	tgaatnttct	tatcaaaaag	tatattnttg	aataatnttt	attgaaaaat	1380
acaactaaaa	aggattatag	tataagtgtg	tgtaatnttg	tgntaaatnt	aaagggagga	1440
aatgaacatg	aaacatatgt	atacagttgg	tgattattta	cttgatagat	tacatgaact	1500
tggaatagaa	gaaatntttg	gtgtaccagg	tgattacaat	cttcaattct	tagatcaaat	1560
aatatcacat	aaggatatga	aatgggttgg	taatgctaat	gaattaaatg	catcatatat	1620
ggcagacgga	tatgcaagaa	ctaaaaaggc	agcagcattt	cttactacat	ttggtgnttg	1680
tgaattaagt	gcagtaaagt	gatttagctgg	aagttagcga	gaaaacttac	cagntgntga	1740
aatagntgga	tctcctacta	gtaaagtaca	aaatgaaggt	aaatntgtac	atcacactct	1800
tgcatagntg	gattnttaagc	atnttatgaa	aatgcatgaa	cctgnttacag	ctgcaagaac	1860
actntcttaca	gctgaaaacg	ctactgtaga	aatntgataga	gntnttatctg	ctnttacttaa	1920
agaaagaaag	ccagtatata	ttaaccttcc	agtagatgta	gcagcagcaa	aagctgagaa	1980
accttcatta	ccacttaaaa	aggaaaattc	aacatcaaat	acatctgatc	aagagatatt	2040
aaataaaatt	caggaaagtc	ttaaaaatgc	aaagaaacct	atagtaataa	ctggacatga	2100
aataattagt	nttggttag	aaaagacagt	tacacagntt	ataagtaaaa	ctaagcttcc	2160
aattacaact	ttaaatnttg	gaaagagntc	agtagatgag	gcacttccat	cattcttagg	2220
aatntataat	ggaacattat	ctgaacctaa	tcttaaagaa	nttgtagaga	gtgctgattt	2280
tatattaatg	ttagntgtaa	aacttactga	tagtagtact	gntgcatntta	ctcatcatct	2340
taacgaaaaat	aagatgatat	cattaaatat	agacgaaggt	aaaatattca	atgaaagaat	2400
acagaactntt	gattnttgaat	cacttatatc	atcattactt	gattntatcag	agatagaata	2460
caaagggaaa	tatatagata	aaaagcaaga	agattnttgnt	ccatctaatg	ctctntctntc	2520
tcaagataga	ctnttgcaag	cagnttgagaa	tcttacacag	tctaatagaa	ctatagnttg	2580
tgagcaagga	acatcattntt	tcgntgcatc	aagtatattt	ttaaaatcta	aaagtcactt	2640
tattggacaa	cctctnttggg	gnttctattgg	atatactntt	ccagcagctt	taggaagtca	2700
aatagctgat	aaagaaagta	gacattntt	atnttattgnt	gacgnttcac	ntcagcttac	2760
agtacaagaa	ttaggattag	ctataagaga	gaagataaat	cctatnttgnt	tcataataaa	2820
caatgatgga	tatactgtag	aaagagaaat	tcacggacca	aatcagntcat	ataatgatat	2880
tccaatgntg	aattattntca	agnttacctga	atctnttcgnt	gctactgaag	atagagtagt	2940
nttctaaaatt	gnttagaacag	agaacgaatt	tgntatctgnt	atgaaagaag	ctcagntctga	3000
ccctaataga	atgnttntgga	nttgaatnt	ntttagcaaaa	gaagntgntc	ctaaagntact	3060
taagaaaatg	ggaaaattat	nttgagaaca	aaataagntca	taagaatntcc	cataataaag	3120
aaagaatntt	aaataaagga	ggaacaaaga	tgagntatacc	agaaacacaa	aaagcaatta	3180

ES 2 702 621 T3

tattttatga	gtcaaata	aaattagagc	ataaagatat	acctgtacca	aaaccaa	3240
caaacgaact	tcttataaat	gttaagtatt	ctggtgtttg	tcatactgat	cttcatgcat	3300
ggcatggtga	ttggcctcct	ccaactaaat	tacctcttgt	agggtgcat	gaagggtctg	3360
gtgtagttgt	aggtaggggt	gaaaatgta	aaggttgaa	aataggatg	tatgctggaa	3420
ttaaattggct	taatggatct	tgtatggcat	gcgagtattg	tgaattagga	aatgaaagta	3480
attgtccaca	tgctgactta	agtggttata	ctcatgatgg	atcttttcaa	gaatatgcta	3540
ctgcagatgc	agttcaggct	gcacacattc	cacagggaac	tgatcttgct	gaagtagctc	3600
ctatattatg	cgctggaatt	acagtataca	aagcattaa	aagtgcta	cttagagcag	3660
gacactgggc	agctataagt	ggtgctgcag	gtggtttagg	atcttttagca	gttcaatatg	3720
ctaaagctat	gggatataga	gtattaggaa	tagacggtgg	tccaggaaaa	gaagagtatt	3780
ttacatcatt	aggtaggtgaa	gtttttatag	atctcaciaa	ggaaaaagat	attgtttcag	3840
ctgtagtaaa	ggcaactaat	ggtaggtgcac	acggaattat	aatgtttca	gtatctgaag	3900
cagcaataga	agcaagtact	agatattgta	gagcaaacgg	aacagtagtt	ttagttggac	3960
ttccagctgg	tgcaaagtgt	tcactctgacg	tatttaacca	ttagtaaaag	agtatttcaa	4020
tagttggatc	ttacgtaggt	aatagagctg	atacaagaga	agcttttagat	ttctttgcaa	4080
gaggtttagt	taagagtcct	ataaaagtag	taggactttc	atcacttcct	gaaatttatg	4140
aaaagatgga	aaagggacaa	atagctggta	gatatgttgt	agatacaagt	aaataaggta	4200
cccggggatc	ctctagagtc	gacgtcacgc	gtccatggag	atctcgaggc	ctgcagacat	4260
gcaagcttgg	caactgacg	acatccccct	ttcgccagct	ggcgtaatag	cgaagaggcc	4320
caactaatc	gccttgacg	acatccccct	ttcgccagct	ggcgtaatag	cgaagaggcc	4380
cgaccgacg	gcccttccca	acagttgacg	agcctgaatg	gcgaatggcg	ctagcataaa	4440
aataagaagc	ctgcatttgc	aggcttctta	tttttatggc	gcgccgcatt	cacttctttt	4500
ctatataaat	atgagcgaag	cgaataagcg	tcggaaaagc	agcaaaaagt	ttcctttttg	4560
ctgttgagc	atgggggttc	agggggtgca	gtatctgacg	tcaatgccga	gcgaaagcga	4620
gccgaagggt	agcatttacg	ttagataacc	ccctgatatg	ctccgacgct	ttatatagaa	4680
aagaagattc	aactaggtaa	aatcttaata	taggttgaga	tgataagggt	tataaggaat	4740
ttgtttgttc	taatttttca	ctcattttgt	tctaatttct	tttaacaaat	gttctttttt	4800
ttttagaaca	gttatgatat	agttagaata	gtttaaaata	aggagtgaga	aaaagatgaa	4860
agaaagatat	ggaacagtct	ataaaggctc	tcagaggctc	atagacgaag	aaagtggaga	4920
agtcatagag	gtagacaagt	tataccgtaa	acaaacgtct	ggtaacttcg	taaaggcata	4980
tatagtgcaa	ttaataagta	tgttagatat	gattgpcgga	aaaaaactta	aaatcgtaa	5040
ctataticta	gataatgtcc	acttaagtaa	caatacaatg	atagctacaa	caagagaaat	5100
agcaaaagct	acaggaacaa	gtctacaaac	agtaataaca	acacttaaaa	tcttagaaga	5160
aggaaatatt	ataaaaagaa	aaactggagt	attaatgtta	aaccctgaac	tactaatgag	5220

ES 2 702 621 T3

aggcgacgac caaaaacaaa aatacctctt actcgaatth gggaaactttg agcaagaggc 5280  
 aaatgaaata gattgacctc ccaataacac cacgtagtta ttgggaggtc aatctatgaa 5340  
 atgcgattaa gggccggccg aagcaaaactt aagagtgtgt tgatagtgca gtatcttaaa 5400  
 attttgata ataggaattg aagttaaatt agatgctaaa aatttgtaat taagaaggag 5460  
 tgattacatg aacaaaaata taaaatattc tcaaaacttt ttaacgagtg aaaaagtact 5520  
 caaccaaata ataaaacaat tgaatttaaa agaaaccgat accgtttacg aaattggaac 5580  
 aggtaaaggg catttaacga cgaaactggc taaaataagt aaacaggtaa cgtctattga 5640  
 attagacagt catctattca acttatcgtc agaaaaatta aaactgaata ctcgtgtcac 5700  
 ttaattcac caagatattc tacagtttca attccctaac aaacagaggt ataaaattgt 5760  
 tgggagtatt cttaccatt taagcacaca aattattaaa aaagtggttt ttgaaagcca 5820  
 tgcgtctgac atctatctga ttgttgaaga aggattctac aagcgtacct tggatattca 5880  
 ccgaäacta gggttgctct tgcacactca agtctcgatt cagcaattgc ttaagctgcc 5940  
 agcggaatgc tttcatccta aaccaaaagt aaacagtgtc ttaataaac ttaccgcca 6000  
 taccacagat gttccagata aatattggaa gctatatacg tactttgttt caaaatgggt 6060  
 caatcgagaa tatcgtcaac tgtttactaa aaatcagttt catcaagcaa tgaaacacgc 6120  
 caaagtaaac aatttaagta ccgttactta tgagcaagta ttgtctatth ttaatagtta 6180  
 tctattatth aacgggagga aataattcta tgagtcgctt ttgtaaattt ggaaagttac 6240  
 acgttactaa agggaatgtg ttt 6263

<210> 84

<211> 4630

<212> ADN

5 <213> Ácido nucleico sintético

<400> 84

aaactcctth ttgataatct catgacaaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 60  
 gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctthttt tctgcgcgta 120  
 atctgctgct tgcaaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgtht gccggatcaa 180  
 gagctaccaa ctctthttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 240  
 gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 300  
 tacctcgtc tgctaactct gttaccagt gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 360  
 accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 420  
 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 480  
 cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggtg 540  
 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagctt cagggggaaa gccttggtat 600  
 ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgatttht gtgatgctcg 660  
 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctthtttacg gttcctggcc 720

ES 2 702 621 T3

ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcttat cccctgattc tgtggataac	780
cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgcgca gccgaacgac cgagcgcagc	840
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca gggccccctg caggataaaa	900
aaattgtaga taaattttat aaaatagttt tatctacaat ttttttatca ggaaacagct	960
atgaccgcgg ccgcaatatg atatttatgt ccattgtgaa agggattata ttcaactatt	1020
attccagtta cgttcataga aattttcctt tctaaaatat tttattccat gtcaagaact	1080
ctgtttattt cattaagaa ctataagtac aaagtataag gcatttgaaa aaataggcta	1140
gtatattgat tgattattta ttttaaatg cctaagttaa atatatacat attataacaa	1200
taaaataagt attagtgtag gatttttaaa tagagtatct attttcagat taaatttttg	1260
attatttgat ttacattata taatattgag taaagtattg actagcaaaa ttttttgata	1320
ctttaatttg tgaattttct tatcaaaagt tatatttttg aataattttt attgaaaaat	1380
acaactaaaa aggattatag tataagtgtg tgtaattttg tgttaaattt aaagggagga	1440
aatgaacatg aaacatatgt atacagttgg tgattattta cttgatagat tacatgaact	1500
tggaatagaa gaaatttttg gtgtaccagg tgattacaat cttcaattct tagatcaaat	1560
aatatcacat aaggatatga aatgggttgg taatgctaata gaattaaatg catcatatat	1620
ggcagacgga tatgcaagaa ctaaaaaggc agcagcattt cttactacat ttggtgttgg	1680
tgaattaagt gcagtaaagtg gattagctgg aagttacgca gaaaacttac cagttgttga	1740
aatagttgga tctcctacta gtaaagtaca aatgaaggt aaatttgtag atcacactct	1800
tgcagatggt gattttaagc attttatgaa aatgcatgaa cctgttacag ctgcaagaac	1860
acttcttaca gctgaaaacg ctactgtaga aattgataga gttttatctg ctttacttaa	1920
agaaagaaag ccagtatata ttaaccttcc agtagatgta gcagcagcaa aagctgagaa	1980
accttcatta ccacttaaaa aggaaaattc aacatcaaat acatctgac aagagatatt	2040
aaataaaatt caggaaagtc ttaaaaatgc aaagaaacct atagtaataa ctggacatga	2100
aataattagt tttggattag aaaagacagt tacacagttt ataagtaaaa ctaagcttcc	2160
aattacaact ttaaattttg gaaagagttc agtagatgag gcacttccat cattcttagg	2220
aatttataat ggaacattat ctgaacctaa tcttaaagaa tttgtagaga gtgctgattt	2280
tatattaatg ttaggtgtaa aacttactga tagtagtact ggtgcattta ctcatcatct	2340
taacgaaaat aagatgatat cattaatat agacgaaggt aaaatattca atgaaagaat	2400
acagaacttt gattttgaat cacttatatc atcattactt gatttatcag agatagaata	2460
caaaggaaaa tatatagata aaaagcaaga agattttggt ccatctaatag ctcttcttcc	2520
tcaagataga ctttggaag cagttgagaa tcttacacag tctaatgaaa ctatagtgc	2580
tgagcaagga acatcatttt tcggtgcac aagtatattt ttaaaatcta aaagtcactt	2640
tattggacaa cctctttggg gttctattgg atatactttt ccagcagctt taggaagtca	2700
aatagctgat aaagaaagta gacatttatt atttattggt gacggttcac ttcagcttac	2760

ES 2 702 621 T3

agtacaagaa ttaggattag ctataagaga gaagataaat cctattingtt tcataataaa 2820  
 caatgatgga tatactgtag aaagagaaat tcacggacca aatcagtcac ataatgatata 2880  
 tccaatgtgg aattattcaa agttacctga atctttcggg gctactgaag atagagtagt 2940  
 ttctaaaatt gttagaacag agaacgaatt tgtatctggt atgaaagaag ctcaggctga 3000  
 ccctaataga atgtattgga ttgaattaat tttagcaaaa gaagggtgctc cttaaagtact 3060  
 taagaaaatg ggaaaattat ttgcagaaca aaataagtca taagaatttg tttgttctaa 3120  
 tttttcactc attttgttct aatttctttt aacaatggtt cttttttttt tagaacagtt 3180  
 atgatatagt tagaatagtt taaaataagg agtgagaaaa agatgaaaga aagatatgga 3240  
 acagtctata aaggctctca gaggctcata gacgaagaaa gtggagaagt catagaggtta 3300  
 gacaagttat accgtaaaca aacgtctggt aacttcgtaa aggcataatag agtgcaatta 3360  
 ataagtatgt tagatatgat tggcggaaaa aaacttaaaa tcgttaacta taccctagat 3420  
 aatgtccact taagtaacaa tacaatgata gctacaacaa gagaaatagc aaaagctaca 3480  
 ggaacaagtc tacaacagc aataacaaca cttaaatct tagaagaagg aatattata 3540  
 aaaagaaaaa ctggagtatt aatgttaaac cctgaactac taatgagagg cgacgaccaa 3600  
 aaacaaaaat acctcttact cgaatttggg aactttgagc aagaggcaaa tgaaatagat 3660  
 tgacctcca ataaccac gtagttattg ggaggcaat ctatgaaatg cgattaaggg 3720  
 ccggccgaag caaacttaag agtgtgttga tagtgcagta tcttaaaatt ttgtataata 3780  
 ggaattgaag ttaaattaga tgctaaaaat ttgtaattaa gaaggagtga ttacatgaac 3840  
 aaaaatataa aatattctca aaacttttta acgagtgaaa aagtactcaa ccaaataata 3900  
 aaacaattga atttaaaaga aaccgatacc gtttacgaaa ttggaacagg taaagggcat 3960  
 ttaacgacga aactggctaa aataagtaaa caggtaacgt ctattgaatt agacagtcac 4020  
 ctattcaact taccgctcaga aaaattaaaa ctgaatactc gtgtcacttt aattcaccaa 4080  
 gatattctac agtttcaatt ccctaacaaa cagaggataa aaattgttgg gagtattcct 4140  
 taccatttaa gcacacaaat tattaaaaaa gtggtttttg aaagccatgc gtctgacatc 4200  
 tatctgattg ttgaagaagg attctacaag cgtaccttgg atattcaccg aacactaggg 4260  
 ttgctcttgc aactcaagt ctcgattcag caattgctta agctgccagc ggaatgcttt 4320  
 catcctaac caaaagtaaa cagtgtctta ataaaactta cccgccatac cacagatggt 4380  
 ccagataaat attggaagct atatacgtac tttgtttcaa aatgggtcaa tcgagaatat 4440  
 cgtcaactgt ttactaaaaa tcagtttcat caagcaatga aacacgcaa agtaacaat 4500  
 ttaagtaccg ttacttatga gcaagtattg tctattttta atagttatct attatttaac 4560  
 gggaggaaat aattctatga gtcgcttttg taaatttggg aagttacacg ttactaaagg 4620  
 gaatgtgttt 4630

<210> 85  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 5 <213> cebador sintético

<400> 85  
 tcagttccct gtggaatg tgc 23

10 <210> 86  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético

	<400> 86 tcagtagcac cgaaagattc ag	22
5	<210> 87 <211> 21 <212> ADN <213> cebador sintético	
	<400> 87 agtcctcat ctactgaact c	21
10	<210> 88 <211> 36 <212> ADN <213> cebador sintético	
	<400> 88 attagttaa acacgccagc aacgcgct tttac	36
15	<210> 89 <211> 27 <212> ADN <213> cebador sintético	
20	<400> 89 tcctattcca aggttacga gttggtc	27
	<210> 90 <211> 27 <212> ADN <213> cebador sintético	
25	<400> 90 acccaacc ataattgtca tgccatc	27
30	<210> 91 <211> 27 <212> ADN <213> cebador sintético	
	<400> 91 tgcaagagca aactcatctt gttcttc	27
35	<210> 92 <211> 43 <212> ADN <213> cebador sintético	
	<400> 92 agggtgccc cgcgattcat atatccataa tctttaagtt atc	43
40	<210> 93 <211> 38 <212> ADN <213> cebador sintético	
	<400> 93 atcttctgca gggccgcaga tagtcataat agtccag	38
45	<210> 94 <211> 43 <212> ADN <213> cebador sintético	
50	<400> 94 agggtgccc cgcgattcat atatccataa tctttaagtt atc	43
	<210> 95 <211> 7655	

ES 2 702 621 T3

<212> ADN

<213> Ácido nucleico sintético

<400> 95

aaactccttt ttgataatct catgaccaa atccctaac gtgagttttc gttccactga	60
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta	120
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa	180
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact	240
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca	300
tacctcgctc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtcctt	360
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg	420
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag	480
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta	540
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat	600
ctttatagtc ctgtcggggt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg	660
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc	720
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac	780
cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgcgca gccgaacgac cgagcgcagc	840
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca gggccccctg cagggccgca	900
gatagtcata atagttccag aatagttcaa tttagaaatt agactaaact tcaaaatggt	960
tgttaaatat ataccaaact agtatagata tttttaaat actggactta aacagtagta	1020
atttgcctaa aaaatTTTTT caatTTTTT taaaaatcc ttttcaagtt gtacattggt	1080
atggtaatat gtaattgaag aagttatgta gtaatattgt aaacgtttct tgattTTTTT	1140
acatccatgt agtgcttaaa aaacaaaat atgtcacatg caattgtata tttcaataa	1200
caatatttat tttctcgtta aattcacaaa taatttatta ataatatcaa taaccaagat	1260
tatacttaaa tggatgttta tttttaaca cttttatagt aaatatattt attttatgta	1320

5

ES 2 702 621 T3

gtaaaaagggt tataattata attgtattta ttacaattaa ttaaaataaa aaatagggtt 1380  
 ttaggtaaaa ttaagttatt ttaagaagta attacaataa aaattgaagt tatttcttta 1440  
 aggaggggat tattcatatg aaagaagttg taatagctag tgcagtaaga acagcgattg 1500  
 gatcttatgg aaagtctctt aaggatgtac cagcagtaga tttaggagct acagctataa 1560  
 aggaagcagt taaaaaagca ggaataaaac cagaggatgt taatgaagtc attttaggaa 1620  
 atgttcttca agcaggttta ggacagaatc cagcaagaca ggcatctttt aaagcaggat 1680  
 taccagttga aattccagct atgactatta ataaggtttg tggttcagga cttagaacag 1740  
 ttagcttagc agcacaaatt ataaaagcag gagatgctga cgtaataata gcagggtgga 1800  
 tggaaaatat gtctagagct cttacttag cgaataacgc tagatgggga tatagaatgg 1860  
 gaaacgctaa atttgttgat gaaatgatca ctgacggatt gtgggatgca tttaatgatt 1920  
 accacatggg aataacagca gaaaacatag ctgagagatg gaacatttca agagaagaac 1980  
 aagatgagtt tgctcttgca tcacaaaaaa aagctgaaga agctataaaa tcagggtcaat 2040  
 ttaaagatga aatagttcct gtagtaatta aaggcagaaa gggagaaact gtagttgata 2100  
 cagatgagca ccctagattt ggatcaacta tagaaggact tgcaaaatta aaacctgcct 2160  
 tcaaaaaaga tggaaacagtt acagctggta atgcatcagg attaaagac tgtgcagcag 2220  
 tacttgtaat catgagtgca gaaaaagcta aagagcttgg agtaaaacca cttgctaaga 2280  
 tagtttctta tggttcagca ggagttgacc cagcaataat gggatatgga cttttctatg 2340  
 caacaaaagc agctattgaa aaagcaggtt ggacagttga tgaattagat ttaatagaat 2400  
 caaatgaagc ttttgagct caaagtttag cagtagcaaa agatttaaaa tttgatatga 2460  
 ataaagtaaa tgtaaattga ggagctattg cccttggca tccaattgga gcatcagggtg 2520  
 caagaatact cgttactctt gtacacgcaa tgcaaaaaag agatgcaaaa aaaygcttag 2580  
 caactttatg tataggtggc ggacaaggaa cagcaatatt gctagaaaag tgctaggaat 2640  
 tcgagctcgg taccagggag atattaaaat gaataaatta gtaaaattaa cagatttaaa 2700  
 gcgcattttc aaagatggca tgacaattat ggttgggggt tttttagatt gtggaactcc 2760  
 tgaaaatatt atagatatgc tagttgattt aaatataaaa aatctgacta ttataagcaa 2820  
 tgatacagct tttcctaata aaggaatagg aaaacttatt gtaaatggtc aagtttctaa 2880  
 agtaattgct tcacatattg gaactaatcc tgaaactgga aaaaaaatga gctctggaga 2940  
 acttaaagtt gagctttccc cacaaggaac actgattgaa agaattcgtg cagctggatc 3000  
 tggactcggg ggtgtattaa ctccaactgg acttggaaact atcgttgaag aaggtaagaa 3060  
 aaaagttact atcgatggca aagaatatct attagaactt ctttatctg ctgatgtttc 3120  
 attaataaaa ggtagcattg tagatgaatt tggaaatacc ttctataggg ctgctactaa 3180  
 aaatttcaat ccatatatgg caatggctgc aaaaacagtt atagttgaag cagaaaattt 3240  
 agttaaagt gaagatttaa aaagagatgc cataatgact cctggcgtat tagtagatta 3300  
 tatcgttaag gaggcggctt aattgattgt agataaagtt ttagcaaaag agataattgc 3360

ES 2 702 621 T3

caaaagagtt gcaaaagaac taaaaaaga ccaactcgta aaccttgaa taggacttcc 3420  
 aactttagta gcaaattatg taccaaaaga aatgaacatt acttttgaat cagaaaatgg 3480  
 catggttggg atggcacaaa tggcatcatc aggtgaaaat gaccagata taataaatgc 3540  
 tggcggggaa tatgtaacat tattacctca aggttcattt tttgatagtt caatgtcttt 3600  
 cgcactaata cgaggaggac atgttgatgt tgctgttctt ggtgctctag aagttgatga 3660  
 aaaaggaat ttagctaact ggattgttcc aaataaaatt gtcccaggta tgggtggcgc 3720  
 tatggattta gcaataggcg caaaaaaat aatagtgga atgcaacata caggaaaaag 3780  
 taaacctaaa atcgtaaaa aatgtactct cccacttact gctaaggctc aagtgattt 3840  
 aattgtcaca gaactttgtg taattgatgt aacaaatgac ggcttacttt taaaagaaat 3900  
 tcataaagat acaactattg atgaaattaa atttttaaca gatgcagatt taattattcc 3960  
 agataactta aagattatgg atatatgaat cgcgccgca atatgatatt tatgtccatt 4020  
 gtgaaagga ttatattcaa ctattattcc agttacgttc atagaaattt tcctttctaa 4080  
 aatattttat tccatgtcaa gaactctgtt tatttcatta aagaactata agtacaaggt 4140  
 ataaggcatt tgaaaaata ggctagtata ttgattgatt atttatttta aaatgcctaa 4200  
 gtgaaatata tacatattat aacaataaaa taagtattag ttaggattt taaatagag 4260  
 tatctatttt cagattaaat ttttgattat ttgatttaca ttatataata ttgagtaaag 4320  
 tattgactag caaaattttt tgatacttta atttgtgaaa tttcttatca aaagttatat 4380  
 ttttgaataa tttttattga aaaatacaac taaaaggat tatagtataa gtgtgtgtaa 4440  
 ttttgtgta aatttaaagg gaggaatga acatgaaaca tatgtataca gttggtgatt 4500  
 atttacttga tagattacat gaacttgaa tagaagaaat ttttgggtga ccagggtgatt 4560  
 acaatcttca atcttagat caaataalat cacataagga talgaaatgg gtttgytaatg 4620  
 ctaatgaatt aaatgcatca tatatggcag acggatatgc aagaactaaa aaggcagcag 4680  
 ctttcttac tacatttggg gttggtgaat taagtgcagt aaatggatta gctggaagtt 4740  
 acgcagaaaa cttaccagtt gttgaaatag ttggatctcc tactagtaaa gtacaaaatg 4800  
 aaggtaaatt tgtacatcac actctgcag atggtgattt taagcatttt atgaaaatgc 4860  
 atgaacctgt tacagctgca agaacacttc ttacagctga aaacgctact gtagaaattg 4920  
 atagagtttt atctgcttta cttaaagaaa gaaagccagt atatattaac cttccagtag 4980  
 atgtagcagc agcaaaagct gagaacctt cattaccact taaaaggaa aattcaacat 5040  
 caaatacatc tgatcaagag atattaaata aaattcagga aagtcttaa aatgcaaga 5100  
 aacctatagt aataactgga catgaaataa ttagttttgg attagaaaag acagttacac 5160  
 agtttataag taaaactaag cttccaatta caactttaa ttttgaaag agttcagtag 5220  
 atgaggcact tccatcttc ttaggaattt ataatggaac attatctgaa cctaacttta 5280  
 aagaatttgt agagagtgc gattttatat taatgttagg tgtaaaactt actgatagta 5340  
 gtactggtgc atttactcat catcttaacg aaaataagat gatatcatta aatatagacg 5400

ES 2 702 621 T3

aaggtaaaat attcaatgaa agaatacaga actttgattt tgaatcactt atatcatcat 5460  
tacttgattt atcagagata gaatacaaaag gaaaatatat agataaaaag caagaagatt 5520  
ttgttccatc taatgctctt ctttctcaag atagactttg gcaagcagtt gagaatctta 5580  
cacagtctaa tgaactata gttgctgagc aaggaacatc atttttcggg gcatcaagta 5640  
tatttttaaa atctaaaagt cactttattg gacaacctct ttggggttct attggatata 5700  
cttttcagc agcttttaga agtcaaatag ctgataaaga aagtagacat ttattattta 5760  
ttggtgacgg ttcacttcag cttacagtac aagaattagg attagctata agagagaaga 5820  
taaactctat ttgtttcata ataaacaatg atggatatac tgtagaaaga gaaattcacg 5880  
gaccaaataca gtcataataat gatattccaa tgtggaatta ttcaaagtta cctgaatctt 5940  
tcggtgctac tgaagataga gtagtttcta aaattgtag aacagagaac gaatttgtat 6000  
ctgttatgaa agaagctcag gctgacccta atagaatgta ttggattgaa ttaattttag 6060  
caaaagaagg tgctcctaaa gtacttaaga aaatgggaaa attatttgca gaacaaaata 6120  
agtcataaga atttgtttgt tctaattttt cactcatttt gttctaattt cttttaacaa 6180  
atgttctttt ttttttagaa cagttatgat atagtttaga tagtttaaaa taaggagtga 6240  
gaaaaagatg aaagaaagat atggaacagt ctataaaggc tctcagaggc tcatagacga 6300  
agaaagtgga gaagtcatag aggtagacaa gttataccgt aaacaaacgt ctggtaactt 6360  
cgtaaaggca tatatagtgc aattaataag tatgttagat atgattggcg gaaaaaaact 6420  
taaaatcggt aactatatcc tagataatgt ccacttaagt aacaatacaa tgatagctac 6480  
aacaagagaa atagcaaaaag ctacaggaac aagtctacaa acagtaataa caacacttaa 6540  
aatcttagaa gaaggaaata ttataaaaag aaaaactgga gtattaatgt taaaccctga 6600  
actactaatg agaggcgagc accaaaaaca aaaatacctc ttactcgaat ttgggaactt 6660  
tgagcaagag gcaaatgaaa tagattgacc tccaataac accacgtagt tattgggagg 6720  
tcaatctatg aaatgcgatt aagggccggc cgaagcaaac ttaagagtgt gttgatagtg 6780  
cagtatctta aaattttgta taataggaat tgaagttaaa ttagatgcta aaaatttgta 6840  
attaagaagg agtgattaca tgaacaaaaa tataaaatat tctcaaaaact ttttaacgag 6900  
tgaaaaagta ctcaacaaa taataaaaaca attgaattta aaagaaaccg ataccgttta 6960  
cgaaattgga acaggtaaag ggcatttaac gacgaaactg gctaaaataa gtaaacaggt 7020  
aacgtctatt gaattagaca gtcatctatt caacttatcg tcagaaaaat taaaactgaa 7080  
tactcgtgtc actttaatc accaagatat tctacagttt caattcccta acaaacagag 7140  
gtataaaatt gttgggagta ttccttacca ttaagcaca caaattatta aaaaagtggg 7200  
ttttgaaagc catgctctg acatctatct gattgttgaa gaaggattct acaagcgtac 7260  
cttgatatt caccgaacac tagggttgct cttgcacact caagtctcga ttcagcaatt 7320  
gcttaagctg ccagcggaat gctttcatcc taaacaaaaa gtaaacagtg tcttaataaa 7380  
acttaccgc cataccacag atgttccaga taaatattgg aagctatata cgtactttgt 7440  
  
ttcaaaatgg gtcaatcgag aatatcgta actgtttact aaaaatcagt tcatcaagc 7500  
aatgaaacac gccaaagtaa acaatttaag taccgttact tatgagcaag tattgtctat 7560  
ttttaatagt tatctattat ttaacgggag gaaataattc tatgagtcgc ttttgtaaa 7620  
ttggaaggtt acacgttact aaagggaatg tgttt 7655

<210> 96  
<211> 35

5

ES 2 702 621 T3

<212> ADN  
 <213> cebador sintético

<400> 96  
 acgttgatc caggaggaac aaagatgagt atacc 35

5 <210> 97  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético

<400> 97  
 10 agcgtccatg gccttattta ctgtatcta caacatatac 39

<210> 98  
 <211> 8621  
 <212> ADN  
 <213> Ácido nucleico sintético

15 <400> 98  
 ccagtgggca agttgaaaaa ttcacaaaaa tgtgggataa tatctttggt cattagagcg 60  
 ataaacttga atttgagagg gaacttagat ggtatttgaa aaaattgata aaaatagttg 120  
 gaacagaaaa gagtattttg accactactt tgcaagtgta ccttgtacct acagcatgac 180  
 cgttaaagtg gatatacac aaataaagga aaagggaatg aactatatac ctgcaatgct 240  
 ttattatatt gcaatgattg taaaccgcca ttcagagttt aggacggcaa tcaatcaaga 300  
 tggatgaattg gggatatatg atgagatgat accaagctat acaatatttc acaatgatac 360  
 tgaacattt tccagccttt ggactgagtg taagtctgac tttaaatcat ttttagcaga 420  
 ttatgaaagt gatacgaac ggtatggaaa caatcataga atggaaggaa agccaaatgc 480  
 tccggaaaac atttttaatg tatctatgat accgtgggca accttcgatg gctttaatct 540  
 gaatttgag aaaggatatg attatttgat tcctattttt actatgggga aatattataa 600  
 agaagataac aaaattatac ttcctttggc aattcaagtt catcacgag tatgtgacgg 660  
 atttcacatt tgccgttttg taaacgaatt gcaggaattg ataaatagtt aacttcaggt 720  
 ttgtctgtaa ctaaaaacaa gtatttaagc aaaaacatcg tagaaatacg gtgttttttg 780  
 ttaccctaag tttaaactcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt 840  
 ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt 900  
 ttttctgagc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag cgggtggttg 960  
 tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca 1020

ES 2 702 621 T3

gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt 1080  
 agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga 1140  
 taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta cgggataagg cgcagcggtc 1200  
 gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact 1260  
 gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga 1320  
 caggatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg 1380  
 aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt 1440  
 tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt 1500  
 acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga 1560  
 ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac 1620  
 gaccgagcgc agcaggtcag tgagcgagga agcgggaagag cgccaatac gcagggcccc 1680  
 ctgcaggata aaaaaattgt agataaattt tataaaatag ttttatctac aatTTTTTTA 1740  
 tcaggaaca gctatgaccg cggccgcaga tagtcataat agttccagaa tagttcaatt 1800  
 tagaaattag actaaacttc aaaatgtttg ttaaataat accaaactag tatagatatt 1860  
 ttttaatac tggacttaaa cagtagtaat ttgcctaaaa aatTTTTTca atTTTTTTta 1920  
 aaaaatcctt tccaagttgt acattgttat ggtaatatgt aattgaagaa gttatgtagt 1980  
 aatattgtaa acgtttcttg atTTTTTTac atccatgtag tgcttaaaaa accaaaatat 2040  
 gtcacatgca attgtatatt tcaataaca atatttattt tctcgtaaa ttcacaaata 2100  
 atttattaat aatatcaata accaagatta tacttaaatg gatgtttatt ttttaact 2160  
 tttatagtaa atatatattt tttatgtagt aaaaaggtta taattataat tgtatttatt 2220  
 acaattaatt aaaataaaaa atagggtttt aggtaaaatt aagttatttt aagaagtaat 2280  
 tacaataaaa attgaagtta tttctttaag gagggaatta ttcatatgaa agaagttgta 2340  
 atagctagtg cagtaagaac agcgattgga tcttatggaa agtctcttaa ggatgtacca 2400  
 gcagtagatt taggagctac agctataaag gaagcagtta aaaaagcagg aataaaacca 2460  
 gaggatgta atgaagtcatt tttaggaaat gtcttcaag caggtttagg acagaatcca 2520  
 gcaagacagg catcttttaa agcaggatta ccagttgaaa ttccagctat gactattaat 2580  
 aaggtttgty gttcaggact tagaacagtt agcttagcag cacaaattat aaaagcagga 2640  
 gatgctgacg taataatagc aggtggtagt gaaaatatgt cttagagctcc ttacttagcg 2700  
 aataacgcta gatgggata tagaatggga aacgctaaat ttgttgatga aatgatcact 2760  
 gacggattgt gggatgcatt taatgattac cacatgggaa taacagcaga aaacatagct 2820  
 gagagatgga acatttcaag agaagaacaa gatgagtttg ctcttgcac acaaaaaaa 2880  
 gctgaagaag ctataaaatc aggtcaattt aaagatgaaa tagttcctgt agtaattaaa 2940  
 ggcagaaagg gagaaactgt agttgataca gatgagcacc cttagatttg atcaactata 3000  
 gaaggacttg caaaatataa acctgccttc aaaaagatg gaacagttac agctggtaat 3060

ES 2 702 621 T3

gcatcaggat taaatgactg tgcagcagta cttgtaatca tgagtgcaga aaaagctaaa 3120  
 gagcttggag taaaaccact tgctaagata gtttcttatg gttcagcagg agttgaccca 3180  
 gcaataatgg gatatggacc tttctatgca acaaagcag ctattgaaa agcaggttgg 3240  
 acagttgatg aattagattht aatagaatca aatgaagctt ttgcagctca aagtttagca 3300  
 gtagcaaaaag atttaaaatt tgatatgaat aaagtaaattg taaatggagg agctattgcc 3360  
 cttggatcatc caattggagc atcagggtgca agaatactcg ttactcttgt acacgcaatg 3420  
 caaaaaagag atgcaaaaaa aggcttagca actttatgta taggtggcgg acaaggaaca 3480  
 gcaatattgc tagaaaagtg ctaggaattc gagctcggta ccagggagat attaaaatga 3540  
 ataaattagt aaaattaaca gatttaaagc gcattttcaa agatggcatg acaattatgg 3600  
 ttggggggttt tttagattgt ggaactcctg aaaaattat agatattgcta gttgatttaa 3660  
 atataaaaaa tctgactatt ataagcaatg atacagcttt tcctaataaa ggaataggaa 3720  
 aacttattgt aaatgggtcaa gtttctaaag taattgcttc acatattgga actaatcctg 3780  
 aaactggaaa aaaaatgagc tctggagaac ttaaagttga gctttcccca caaggaacac 3840  
 tgattgaaag aattcgtgca gctggatctg gactcggagg tgtattaact ccaactggac 3900  
 ttggaactat cgttgaagaa ggtaagaaaa aagttactat cgatggcaaa gaatatctat 3960  
 tagaacttcc tttatctgct gatgtttcat taataaaagg tagcattgta gatgaatttg 4020  
 gaaatacctt ctatagggct gctactaaaa atttcaatcc atatatggca atggctgcaa 4080  
 aaacagttat agttgaagca gaaaatttag ttaaattgta agatttaaaa agagatgcca 4140  
 taatgactcc tggcgtatta gtagattata tcgttaagga ggcggttaa ttgattgtag 4200  
 ataaagtttt agcaaaagag ataattgcc aagagttgc aaaagaacta aaaaagacc 4260  
 aactcgtaaa ctttgaata ggacttccaa ctttagtagc aaattatgta ccaaaaagaaa 4320  
 tgaacattac ttttgaatca gaaaatggca tggttggtat ggcacaaatg gcatcatcag 4380  
 gtgaaaatga cccagatata ataaatgctg gcggggaata tgtaacatta ttacctcaag 4440  
 gttcattttt tgatagttca atgtctttcg cactaatacg aggaggacat gttgatgttg 4500  
 ctgttcttgg tgctctagaa gttgatgaaa aaggtaattt agctaactgg atgtttcaa 4560  
 ataaaattgt cccaggtatg ggtggcgcta tggatttagc aataggcgca aaaaaataa 4620  
 tagtggcaat gcaacataca ggaaaaagta aacctaaaat cgttaaaaaa tgtactctcc 4680  
 cacttactgc taaggctcaa gtggatttaa ttgtcacaga actttgtgta attgatgtaa 4740  
 caaatgacgg cttactttta aaagaaattc ataaagatac aactattgat gaaattaaat 4800  
 ttttaacaga tgcagattta attattccag ataacttaa gattatggat atatgaatca 4860  
 ttctattttta aatatataac tttaaaaatc ttatgtatta aaaactaaga aaagaggttg 4920  
 attgttttat gtagaaagt gaagtatcta acaaaattac aactccactt gctgctccag 4980  
 cgtttcttag aggaccatat aggtttcaca atagagaata tctaaacatt atttatcgaa 5040  
 ctgattttaga tgctcttcga aaaatagtac cagagccact tgaattagat agagcatatg 5100

ES 2 702 621 T3

ttagatttga aatgatggct atgcctgata caaccggact aggctcatat acagaatgtg 5160  
 gtcaagctat tccagtaaaa tataatgggtg ttaaggggtga ctacttgcac atgatgtatc 5220  
 tagataatga acctgctatt gctgttggaa gagaaagtag cgcttatcca aaaagcttg 5280  
 gctatccaaa gctatattgtt gattcagata ctttagttgg gacacttaaa tatggtacat 5340  
 taccagtagc tactgcaaca atgggatata agcacgagcc tctagatcct aaagaagcct 5400  
 atgctcaaat tgcaagacct aattttatgc taaaaatcat tcaaggttac gatggtaagc 5460  
 caagaatttg tgaactaata tgtgcagaaa atactgatat aactattcac ggtgcttggg 5520  
 ctggaagtgc acgtctacaa ttatttagcc atgcactagc tcctcttgct gatttacctg 5580  
 tattagagat tgtatcagca tctcatatcc tcacagattt aactcttggg acacctaagg 5640  
 ttgtacatga ttatctttca gtaaaataaa agcaatatag aggatccagg aggaacaaag 5700  
 atgagtatac cagaaacaca aaaagcaatt atattttatg agtcaaatgg aaaattagag 5760  
 cataaagata tacctgtacc aaaacaaaa ccaaacgaac ttcttataaa tgtaagtat 5820  
 tctgggtgtt gtcatactga tcttcatgca tggcatgggtg attggcctct tccaactaaa 5880  
 ttacctcttg taggtggca tgaaggtgct ggtgtagttg taggtatggg tgaaaatggt 5940  
 aaaggttggg aaataggtga ttatgctgga attaaatggc ttaatggatc ttgtatggca 6000  
 tgcgagtatt gtgaattag aaatgaaagt aattgtccac atgctgactt aagtggttat 6060  
 actcatgatg gatcttttca agaatatgct actgcagatg cagttcaggc tgcacacatt 6120  
 ccacagggaa ctgatcttgc tgaagtagct cctatattat gcgctggaat tacagtatac 6180  
 aaagcattaa aaagtgctaa tcttagagca ggacactggg cagctataag tgggtgctgca 6240  
 ggtggtttag gatcttttagc agttcaatat gctaaagcta tgggatatag agtattagga 6300  
 atagacgggtg gtccaggaag agaagagtta ttacatcat taggtgggtga agtttttata 6360  
 gatttcacaa aggaaaaaga tattgtttca gctgtagtaa aggcaactaa tgggtgggtgca 6420  
 cacggaatta taaatgtttc agtatctgaa gcagcaatag aagcaagtac tagatattgt 6480  
 agagcaaacg gaacagtagt tttagttgga cttccagctg gtgcaaagtg ttcatctgac 6540  
 gtatttaacc atgtagtaaa gagtatttca atagttggat cttacgtagg taatagagct 6600  
 gatacaagag aagcttttaga tttctttgca agaggtttag ttaagagtcc tataaaagta 6660  
 gtaggacttt catcacttcc tgaaatttat gaaaagatgg aaaagggaca aatagctggt 6720  
 agatatggtg tagatacaag taaataaggc catggagatc tcgaggcctg cagacatgca 6780  
 agcttggcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttaccaa 6840  
 cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccg 6900  
 accgatcgcc cttccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcta gcataaaaat 6960  
 aagaagcctg catttgcaag cttcttattt ttatggcgcg ccgccattat tttttgaa 7020  
 aattgacaat tcatttctta tttttatta agtgatagtc aaaaggcata acagtgtgca 7080  
 atagaagaa atttacagaa aagaaaatta tagaatttag tatgattaat tatactcatt 7140

ES 2 702 621 T3

tatgaatggt taattgaata caaaaaaaaa tacttgttat gtattcaatt acgggttaaa 7200  
 atatagacaa gttgaaaaat ttaataaaaa aataagtcct cagctcttat atattaagct 7260  
 accaacttag tatataagcc aaaacttaaa tgtgctacca acacatcaag ccgtagaga 7320  
 actctatcta tagcaatatt tcaaatgtac cgacatacaa gagaacatt aactatata 7380  
 attcaattta tgagattatc ttaacagata taaatgtaaa ttgcaataag taagatttag 7440  
 aagtttatag cttttgtgta ttggaagcag tacgcaaagg cttttttatt tgataaaaa 7500  
 tagaagtata tttatTTTTT cataattaat ttatgaaaat gaaagggggg gagcaaagt 7560  
 acagaggaaa gcagtatctt atcaaataac aaggatttag caatatcatt attgacttta 7620  
 gcagtaaaca ttatgacttt tatagtgcct gtagctaagt agtacgaaag ggggagcttt 7680  
 aaaagctcc ttggaataca tagaattcat aaattaattt atgaaaaga gggcgtatat 7740  
 gaaaacttgt aaaaattgca aagagtttat taaagatact gaaatatgca aaatacattc 7800  
 gttgatgatt catgataaaa cagtagcaac ctattgcagt aaatacaatg agtcaagatg 7860  
 tttacataaa gggaaagtcc aatgtattaa ttgttcaaag atgaaccgat atggatggg 7920  
 tgccataaaa atgagatggt ttacagagga agaacagaaa aaagaacgta catgcattaa 7980  
 atattatgca aggagcttta aaaaagctca tgtaaagaag agtaaaaaga aaaaataatt 8040  
 tatttattaa tttaatattg agagtgccga cacagtatgc actaaaaaat atatctgtgg 8100  
 tgtagtgagc cgatacaaaa ggatagtcac tcgcattttc ataatacatc ttatggtatg 8160  
 attatgtgtc ggtgggactt cacgacgaaa acccacaata aaaaaagagt tcggggtagg 8220  
 gttaagcata gttgaggcaa ctaaacaatc aagctaggat atgcagtagc agaccgtaag 8280  
 gtcgttgttt aggtgtgttg taatacatac gctattaaga tgtaaaaata cggataccaa 8340  
 tgaagggaaa agtataattt ttggatgtag tttgtttgtt catctatggg caaactacgt 8400  
 ccaagccgt ttcaaactc gctaaaagt atatccttc taaaatcaa gtcaagtatg 8460  
 aaatcataaa taaagtttaa ttttgaagtt attatgatat tatgtttttc tattaataa 8520  
 aattaagtat atagaatagt ttaataatag tatatactta atgtgataag tgtctgacag 8580  
 tgtcacagaa aggatgattg ttatggatta taagcggccg g 8621

<210> 99  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético

5

<400> 99  
 atattgatc cacagctatg accgcgccg caatatg 37

<210> 100  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> cebador sintético

10

<400> 100  
 agcgtcatg gcctattta ctgtatcta caacatc 39

<210> 101  
 <211> 10803  
 <212> ADN  
 <213> Ácido nucleico sintético

15

ES 2 702 621 T3

<400> 101  
ccagtgggca agttgaaaaa ttcacaaaaa tgtgggtataa tatctttggt cattagagcg 60  
ataaacttga atttgagagg gaacttagat ggtatttgaa aaaattgata aaaatagttg 120  
gaacagaaaa gagtattttg accactactt tgcaagtgtc cctgttacct acagcatgac 180  
cgttaaagtg gatatacacac aaataaagga aaagggaaatg aaactatatac ctgcaatgct 240  
ttattatatt gcaatgattg taaaccgcca ttcagagttt aggacggcaa tcaatcaaga 300  
tgggtgaattg gggatataatg atgagatgat accaagctat acaatatttc acaatgatac 360  
tgaacattt tccagccttt ggactgagtg taagtctgac tttaaatcat ttttagcaga 420  
ttatgaaagt gatacgcac ggtatggaaa caatcataga atggaaggaa agccaaatgc 480  
tccggaaaaac atttttaatg tatctatgat accgtggcca accttcgatg gctttaatct 540  
gaatttgag aaaggatag attatttgat tcctattttt actatgggga aatattataa 600  
agaagataac aaaattatac ttcctttggc aattcaagtt catcacgcag tatgtgacgg 660  
atcacatt tgccgttttg taaacgaatt gcaggaattg ataaatagtt aacttcaggt 720  
ttgtctgtaa ctaaaaacaa gtatttaagc aaaaacatcg tagaaatacg gtgttttttg 780  
ttaccctaag tttaaactcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt 840  
ttcgttccac tgagcgtcag acccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt 900  
ttttctgagc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag cgggtggtttg 960  
tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca 1020  
gataccaaat actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca agaactctgt 1080  
agcaccgct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga 1140  
taagtctgtt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc 1200  
gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact 1260  
gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggg 1320  
caggtatccg gtaagcggca gggcggaaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg 1380  
aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt 1440  
tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt 1500  
acggttctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttctgctg tatcccctga 1560  
ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac 1620  
gaccgagcgc agcgagttag tgagcgagga agcggaaagag cgccaatac gcagggcccc 1680  
ctgcaggata aaaaaattgt agataaattt tataaaatag ttttatctac aattttttta 1740  
tcaggaaaca gctatgaccg cggccgcaga tagtcataat agttccagaa tagttcaatt 1800  
tagaaattag actaaacttc aaaatgtttg ttaaataat accaaactag tatagatatt 1860

ES 2 702 621 T3

ttttaaatac tggacttaaa cagtagtaat ttgcctaaaa aatTTTTTca atTTTTTTta	1920
aaaaatcctt ttcaagttgt acattgttat ggtaatatgt aattgaagaa gttatgtagt	1980
aatattgtaa acgTTTcttg atTTTTttac atccatgtag tgcttaaaaa accaaaaat	2040
gtcacatgca attgtatatt tcaaataaca atatttattt tctcgTtaa ttcacaaata	2100
atttattaat aatatcaata accaagatta tacttAAatg gatgTTtatt tTTtaacact	2160
tttatagtaa atatatTTat tttatgtagt aaaaaggTta taattataat tgtatttatt	2220
acaattaatt aaaataaaaa atagggTTTT aggtAAaatt aagttatttt aagaagtaat	2280
tacaataaaa attgaagTta tttctTTaag gagggaatta tTcatatgaa agaagTtga	2340
atagctagtg cagtaagaac agcgattgga tcttatggaa agtctcttaa ggatgtacca	2400
gcagtagatt taggagctac agctataaag gaagcagTta aaaaagcagg aataaaacca	2460
gaggatgTta atgaagTcat tttagGaaat gttcttcaag caggTTtagg acagaatcca	2520
gcaagacagg catctTTtaa agcaggatta ccagTtGaaa tTccagctat gactattaat	2580
aaggTTTgtg gttcaggact tagaacagtt agcttagcag cacaaattat aaaagcagga	2640
gatgctgacg taataatagc aggtggtatg gaaaatatgt ctagagctcc ttacttagcg	2700
aataacgcta gatggggata tagaatggga aacgctaaat ttgttgatga aatgatcact	2760
gacggattgt gggatgcatt taatgattac cacatgggaa taacagcaga aaacatagct	2820
gagagatgga acatttcaag agaagaacaa gatgagTTtg ctcttgcatc acaaaaaaaa	2880
gctgaagaag ctataaaatc aggtcaattt aaagatgaaa tagttcctgt agtaattaaa	2940
ggcagaaagg gagaaactgt agttgataca gatgagcacc ctagattTgg atcaactata	3000
gaaggacttg caaaattaaa acctgccttc aaaaagatg gaacagttac agctgGtaat	3060
gcatcaggat taaatgactg tgCagcagta cttgtaatca tgagtgcaga aaaagctaaa	3120
gagcttgag taaaaccact tgctaagata gtttcttatg gttcagcagg agttgaccCa	3180
gcaataatgg gatatggacc tttctatgca acaaaagcag ctattgaaaa agcaggtTgg	3240
acagttgatg aattagattt aatagaatca aatgaagctt ttgcagctca aagTTtagca	3300
gtagcaaaag atttAAAaatt tgatatgaat aaagtaaatg taaatggagg agctattgcc	3360
cttggtcatc caattggagc atcaggtgca agaatactcg ttactcttgt acacgcaatg	3420
caaaaaagag atgcaaaaaa aggcTTtagca actttatgta taggtggcgg acaaggaaca	3480
gcaatattgc tagaaaagtg ctaggaattc gagctcggta ccagggagat attaaaatga	3540
ataaattagt aaaattaaca gatttAAagc gcattttcaa agatggcatg acaattatgg	3600
ttgggggttt tttagattgt ggaactcctg aaaaatattat agatatgcta gttgatttaa	3660
atataaaaaa tctgactatt ataagcaatg atacagcttt tcctaataaa ggaataggaa	3720
aacttattgt aaatggTcaa gtttctaaag taattgcttc acatattgga actaatcctg	3780
aaactggaaa aaaaatgagc tctggagaac ttaaagttga gctttcccca caaggaacac	3840
tgattgaaag aattcgtgca gctggatctg gactcggagg tgtattaact ccaactggac	3900

ES 2 702 621 T3

ttggaactat cgttgaagaa ggtaagaaaa aagttactat cgatggcaaa gaatatctat 3960  
 tagaacttcc tttatctgct gatgtttcat taataaaagg tagcattgta gatgaatttg 4020  
 gaaatacctt ctatagggct gctactaaaa atttcaatcc atatatggca atggctgcaa 4080  
 aaacagttat agttgaagca gaaaatttag ttaaagtga agatttaaaa agagatgcca 4140  
 taatgactcc tggcgtatta gtagattata tcgttaagga ggcggcttaa ttgattgtag 4200  
 ataaagtfff agcaaaagag ataattgcca aaagagttgc aaaagaacta aaaaaagacc 4260  
 aactcgtaaa ccttgaata ggacttccaa ctttagtagc aaattatgta ccaaaagaaa 4320  
 tgaacattac ttttgaatca gaaaatggca tggttggat ggcacaaatg gcatcatcag 4380  
 gtgaaaatga cccagatata ataaatgctg gcggggaata tgtaacatta ttacctcaag 4440  
 gttcattttt tgatagttca atgtctttcg cactaatcag aggaggacat gttgatgttg 4500  
 ctgttcttgg tgctctagaa gttgatgaaa aaggtaattt agctaactgg attgttccaa 4560  
 ataaaattgt cccaggtatg ggtggcgcta tggatttagc aataggcgca aaaaaataa 4620  
 tagtggaat gcaacataca ggaaaaagta aacctaaaat cgttaaaaaa tgtactctcc 4680  
 cacttactgc taaggctcaa gtggatttaa ttgtcacaga actttgtgta attgatgtaa 4740  
 caaatgacgg cttactttta aaagaaattc ataaagatac aactattgat gaaattaaat 4800  
 ttttaacaga tgcagattta attattccag ataacttaaa gattatggat atatgaatca 4860  
 ttctatttta aatatataac tttaaaaatc ttatgtatta aaaactaaga aaagaggttg 4920  
 attgttttat gttagaaagt gaagtatcta aacaaattac aactccactt gctgctccag 4980  
 cgtttcctag aggaccatat aggtttcaca atagagaata tctaaacatt atttatcgaa 5040  
 ctgatttaga tgctcttcca aaaatagtag cagagccact tgaattagat agagcatatg 5100  
 ttagatttga aatgatggct atgcctgata caaccggact aggctcatat acagaatgtg 5160  
 gtcaagctat tccagtaaaa tataatggtg ttaagggtag ctacttgcac atgatgtatc 5220  
 tagataatga acctgctatt gctgttggaa gagaaagtag cgcttatcca aaaaagcttg 5280  
 gctatccaaa gctatttgtt gattcagata ctttagttgg gacacttaaa tatggtacat 5340  
 taccagtagc tactgcaaca atgggatata agcaccagcc tctagatctt aaagaagcct 5400  
 atgctcaaat tgcaagacc aattttatgc taaaaatcat tcaaggttac gatggttaagc 5460  
 caagaatttg tgaactaata tgtgcagaaa atactgatat aactattcac ggtgcttggc 5520  
 ctggaagtgc acgtctacaa ttatttagcc atgcactagc tcctcttgct gatttacctg 5580  
 tattagagat tgtatcagca tctcatatcc tcacagattt aactcttggc acacctaagg 5640  
 ttgtacatga ttatctttca gtaaaataaa agcaatatag aggatccaca gctatgaccg 5700  
 cggccgcaat atgatattta tgtccattgt gaaagggatt atattcaact attattccag 5760  
 ttacgttcat agaaattttc ctttctaaaa tattttatc catgtcaaga actctgttta 5820  
 tttcattaaa gaactataag tacaagat aaggcatttg aaaaaatagg ctagtatatt 5880  
 gattgattat ttattttaaa atgcctaagt gaaatatata catattataa caataaata 5940

ES 2 702 621 T3

agtattagtg taggattttt aaatagagta tctattttca gattaaattt ttgattattt 6000  
 gatttacatt atataatatt gagtaaagta ttgactagca aaattttttg atactttaat 6060  
 ttgtgaaatt tcttatcaaa agttatattt ttgaataatt tttattgaaa aatacaacta 6120  
 aaaaggatta tagtataagt gtgtgtaatt ttgtgttaaa tttaaagga ggaatgaac 6180  
 atgaaacata tgtatacagt tgggtgattat ttacttgata gattacatga acttgaata 6240  
 gaagaaattt ttgggtgtacc aggtgattac aatcttcaat tcttagatca aataatatca 6300  
 cataaggata tgaatgggt tggtaatgct aatgaattaa atgcatcata tatggcagac 6360  
 ggatattgcaa gaactaaaaa ggcagcagca tttcttacta catttggtgt tgggaatta 6420  
 agtgcagtaa atggattagc tggaagtac gcagaaaact taccagttgt tgaatagtt 6480  
 ggatctccta ctagtaaagt acaaaatgaa ggtaaatttg tacatcacac tcttcagat 6540  
 ggtgatttta agcattttat gaaaatgcat gaacctgtta cagctgcaag aacacttctt 6600  
 acagctgaaa acgctactgt agaaattgat agagttttat ctgctttact taaagaaaga 6660  
 aagccagtat atattaacct tccagtagat gtagcagcag caaaagctga gaaaccttca 6720  
 ttaccactta aaaaggaaaa ttcaacatca aatacatctg atcaagagat attaaataaa 6780  
 attcaggaaa gtcttaaaaa tgcaaagaaa cctatagtaa taactggaca tgaataaatt 6840  
 agttttggat tagaaaagac agttacacag ttataagta aaactaagct tccaattaca 6900  
 actttaaatt ttggaaagag ttcagtagat gaggcacttc catcattctt aggaatttat 6960  
 aatggaacat tatctgaacc taatcttaaa gaattttag agagtgtgta ttttatatta 7020  
 atgttaggtg taaaacttac tgatagtagt actggtgcat ttactcatca tcttaacgaa 7080  
 aataagatga tatcattaaa tatagacgaa ggtaaaatat tcaatgaaag aatacagaac 7140  
 tttgattttg aatcacttat atcatcatta cttgattttat cagagataga atacaaagga 7200  
 aatatatag ataaaaagca agaagatttt gtccatcta atgctcttct ttctcaagat 7260  
 agactttggc aagcagttga gaatcttaca cagtctaag aaactatagt tgctgagcaa 7320  
 ggaacatcat ttttcggtgc atcaagtata tttttaaaat ctaaaagtca ctttattgga 7380  
 caacctcttt ggggttctat tggatatact tttccagcag ctttaggaag tcaaatagct 7440  
 gataaagaaa gtagacattt attatttatt ggtgacggtt cacttcagct tacagtacaa 7500  
 gaattaggat tagctataag agagaagata aatcctattt gtttcataat aaacaatgat 7560  
 ggatatactg tagaaagaga aattcacgga ccaaatcagt catataatga tattccaatg 7620  
 tggatttatt caaagttacc tgaatctttc ggtgctactg aagatagagt agtttctaaa 7680  
 attgttagaa cagagaacga atttgtatct gttatgaaag aagctcaggc tgaccctaata 7740  
 agaatgtatt ggattgaatt aatttttagca aaagaaggtg ctcctaaagt acttaagaaa 7800  
 atgggaaaat tatttgcaga acaaaaatag tcataagaat tcccataata aagaaagaat 7860  
 tttaaataaa ggaggaacaa agatgagtat accagaaaca caaaaagcaa ttatatttta 7920  
 tgagtcaaat ggaaaattag agcataaaga tatacctgta ccaaaaccaa aaccaaacga 7980

ES 2 702 621 T3

acttcttata aatgttaagt attctggtgt ttgtcatact gatcttcatg catggcatgg 8040  
 tgattggcct ctccaacta aattacctct tgtaggtggt catgaagggt ctggtgtagt 8100  
 tgtaggtatg ggtgaaaatg ttaaagggtg gaaaataggt gattatgctg gaattaaatg 8160  
 gcttaatgga tcttgtatgg catgcgagta ttgtgaatta ggaaatgaaa gtaattgtcc 8220  
 acatgctgac ttaagtgggt atactcatga tggatctttt caagaatatg ctactgcaga 8280  
 tgcagttcag gctgcacaca ttccacaggg aactgatctt gctgaagtag ctcctatatt 8340  
 atgcgctgga attacagtat acaaagcatt aaaaagtgct aatcttagag caggacactg 8400  
 ggcagctata agtgggtgctg caggtggttt aggatcttta gcagttcaat atgctaaagc 8460  
 tatgggatat agagtattag gaatagacgg tgggccagga aaagaagagt tatttacatc 8520  
 attaggtggt gaagttttta tagatttcac aaaggaaaaa gatattgttt cagctgtagt 8580  
 aaaggcaact aatggtggtg cacacggaat tataaatggt tcagtatctg aagcagcaat 8640  
 agaagcaagt actagatatt gtagagcaaa cggaacagta gttttagttg gacttccagc 8700  
 tgggtcaaaag tgttcatctg acgtatttaa ccatgtagta aagagtattt caatagttgg 8760  
 atcttacgta ggtaatagag ctgatacaag agaagcttta gatttctttg caagaggttt 8820  
 agttaagagt cctataaaag tagtaggact ttcatacctt cctgaaattt atgaaaagat 8880  
 ggaaaagggg caaatagctg gtagatatgt tgtagataca agtaaataag gccatggaga 8940  
 tctcgaggcc tgcagacatg caagcttggc actggccgctc gttttacaac gtcgtgactg 9000  
 ggaaaacctt ggcgttacc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg 9060  
 gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg 9120  
 cgaatggcgc tagcataaaa ataagaagcc tgcatttgca ggcttcttat ttttatggcg 9180  
 cgccgccatt atttttttga acaattgaca attcatttct tttttttat taagtgatag 9240  
 tcaaaaggca taacagtgct gaatagaaag aaatttacag aaaagaaaat tatagaattt 9300  
 agtatgatta attatactca tttatgaatg ttttaattgaa tacaaaaaaa aatacttggt 9360  
 atgtattcaa ttacgggtta aaatatagac aagttgaaaa atttaataaa aaaataagtc 9420  
 ctgagctctt atatatag ctaccaactt agtatataag ccaaaactta aatgtgctac 9480  
 caacacatca agccgttaga gaactctatc tatagcaata tttcaaatgt accgacatac 9540  
 aagagaaaca ttaactatat atattcaatt tatgagatta tcttaacaga tataaatgta 9600  
 aattgcaata agtaagattt agaagtttat agcctttgtg tattggaagc agtacgcaa 9660  
 ggctttttta tttgataaaa attagaagta tttttttt ttcataatta atttatgaaa 9720  
 atgaaagggg gtgagcaaag tgacagagga aagcagtatc ttatcaata acaaggtatt 9780  
 agcaatatca ttattgact tagcagtaaa cattatgact tttatagtgc ttgtagctaa 9840  
 gtagtacgaa aggggggagct ttaaaaagct ccttggata catagaattc ataaattaat 9900  
 ttatgaaaag aagggcgat atgaaaactt gtaaaaattg caaagagttt attaaagata 9960  
 ctgaaatatg caaaatacat tcgttgatga ttcatgataa aacagtagca acctattgca 10020

ES 2 702 621 T3

gtaaatacaa	tgagtcaaga	tgtttacata	aagggaaagt	ccaatgtatt	aattgttcaa	10080
agatgaaccg	atatggatgg	tgtgccataa	aatgagatg	ttttacagag	gaagaacaga	10140
aaaaagaacg	tacatgcatt	aaatattatg	caaggagctt	taaaaaagct	catgtaaaga	10200
agagtaaaaa	gaaaaaataa	tttatttatt	aatttaatat	tgagagtgcc	gacacagtat	10260
gcactaaaaa	atatatctgt	gggtagtaga	gccgatacaa	aaggatagtc	actcgcattt	10320
tcataataca	tcttatgtta	tgattatgtg	tcggtgggac	ttcacgacga	aaaccacaa	10380
taaaaaaaga	gttcggggta	gggttaagca	tagttgaggc	aactaaacaa	tcaagctagg	10440
atatgcagta	gcagaccgta	aggtcgttgt	ttaggtgtgt	tgtaatacat	acgctattaa	10500
gatgtaaaaa	tacggatacc	aatgaaggga	aaagtataat	ttttggatgt	agtttgtttg	10560
ttcatctatg	ggcaaaactac	gtccaaagcc	gtttccaaat	ctgctaaaaa	gtatatcctt	10620
tctaaaatca	aagtcaagta	tgaaatcata	aataaagttt	aattttgaag	ttattatgat	10680
attatgtttt	tctattaataa	taaattaagt	atatagaata	gtttaataat	agtatatact	10740
taatgtgata	agtgctctgac	agtgctcacag	aaaggatgat	tgttatggat	tataagcggc	10800
cgg						10803

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de isopropanol mediante fermentación microbiana, que comprende fermentar un sustrato que comprende CO utilizando un microorganismo acetogénico carboxidotrofo recombinante capaz de producir isopropanol mediante fermentación de CO,
- 5 en donde el microorganismo expresa la enzimas: acetil coenzima A acetiltransferasa (tiolasa; ThIA; E.C. 2.3.1.9); acetoacetil-CoA:acetato coenzima A transferasa A (CoA transferasa; CtfA; EC 2.8.3.9); y acetoacetil-CoA:acetato coenzima A transferasa B (CoA transferasa; CtfB; EC 2.8.3.9); y
- en donde el microorganismo expresa adicionalmente la enzima:
- a. acetoacetato descarboxilasa (Adc; EC 4.1.1.4); o
- 10 b. alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD; EC 4.1.1.74);
- en donde las enzimas no están naturalmente presentes en un microorganismo parental del cual se obtiene el microorganismo recombinante.
2. El método de la reivindicación 1a, en donde el microorganismo expresa adicionalmente la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh; EC 1.1.1.2).
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en donde la Adh se expresa exógenamente.
4. El método de la reivindicación 1a, en donde el microorganismo expresa adicionalmente la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh2; EC 1.1.1.1).
5. El método de la reivindicación 4, en donde la Adh2 se expresa exógenamente.
6. El método de la reivindicación 1a, en donde el microorganismo expresa adicionalmente las enzimas alfa-cetoisovalerato descarboxilasa (descarboxilasa; KivD; EC4.1.1.74) y la alcohol deshidrogenasa (Adh2; EC 1.1.1.1).
- 20 7. El método de la reivindicación 6, en donde la Adh2 se expresa exógenamente.
8. El método de la reivindicación 1, en donde el microorganismo parental se selecciona del grupo de bacterias acetogénicas carboxidotrofas que comprende: *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Butyribacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, y *Thermoanaerobacter kiuvi*.
- 25 9. El método de la reivindicación 6, en donde el microorganismo parental es *Clostridium autoethanogenum* DSM23693 o *Clostridium ljungdahlii* DSM13528 (o ATCC55383).
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la enzima:
- 30 a. ThIA está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 18; y
- b. CtfA está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 19; y
- c. CtfB está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 20 y/o
- d. Adc está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 21; y/o
- e. KivD está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 71; y/o
- 35 f. Adh está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 2, 3 ó 4; y/o
- g. Adh2 está codificada por un nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 75.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- a. el sustrato gaseoso que comprende CO es producido por medio de un procedimiento industrial seleccionado del grupo que consiste en fabricación de productos de metales ferroso, fabricación de productos no ferrosos, procedimientos de refinado de petróleo, gasificación de carbón, gasificación de biomasa, producción de energía eléctrica, producción de negro de humo, y fabricación de coque; o
- 40 b. el sustrato gaseoso comprende de 20% a 70% en volumen de CO.

Figura 1

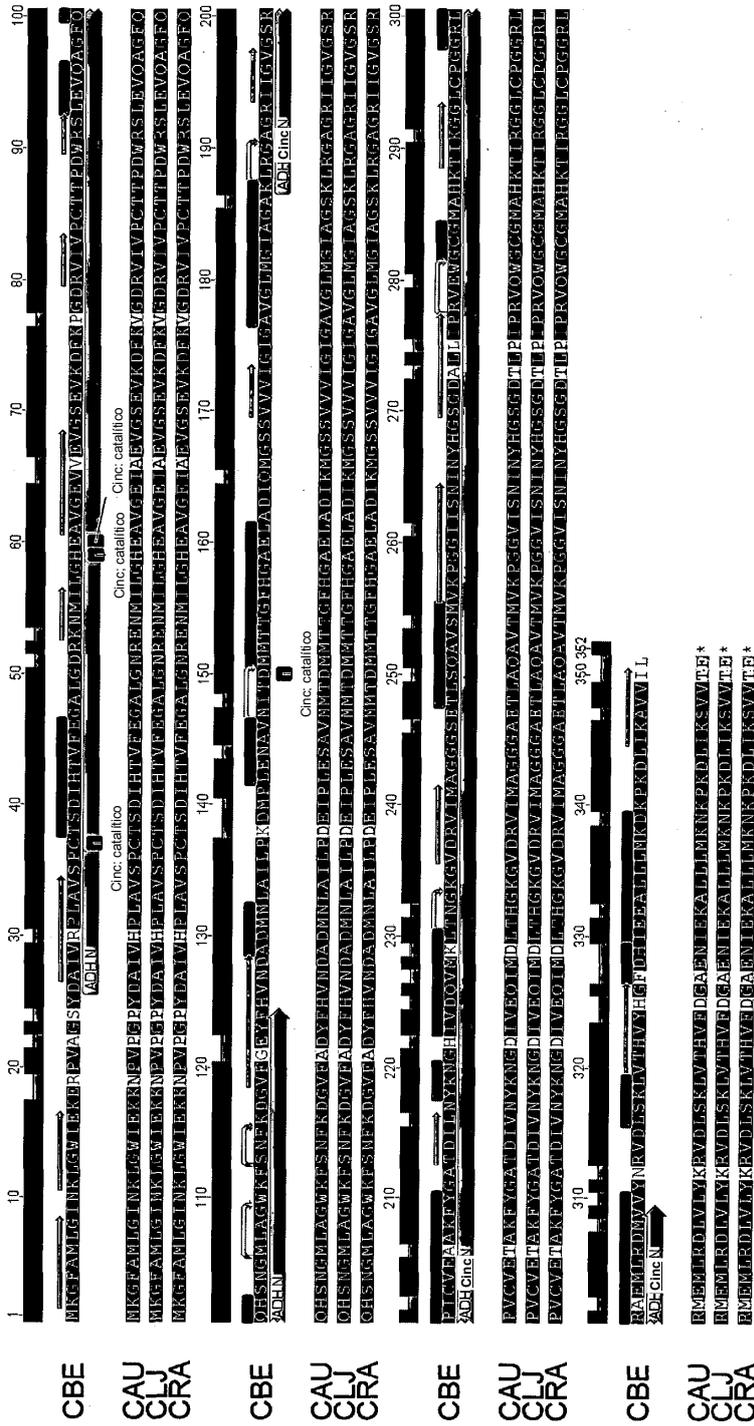


Figura 2

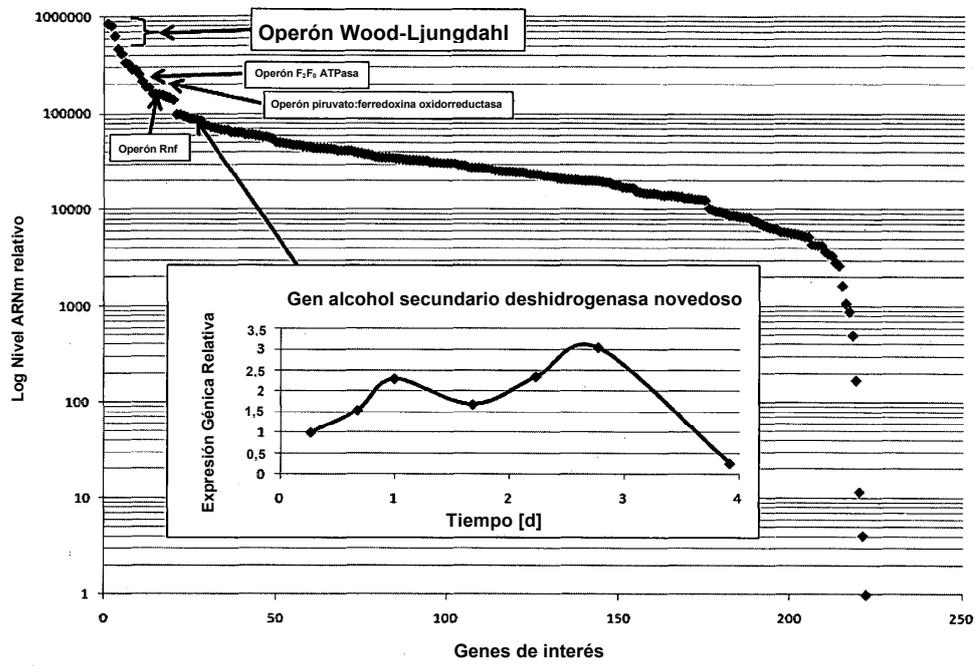


Figura 3

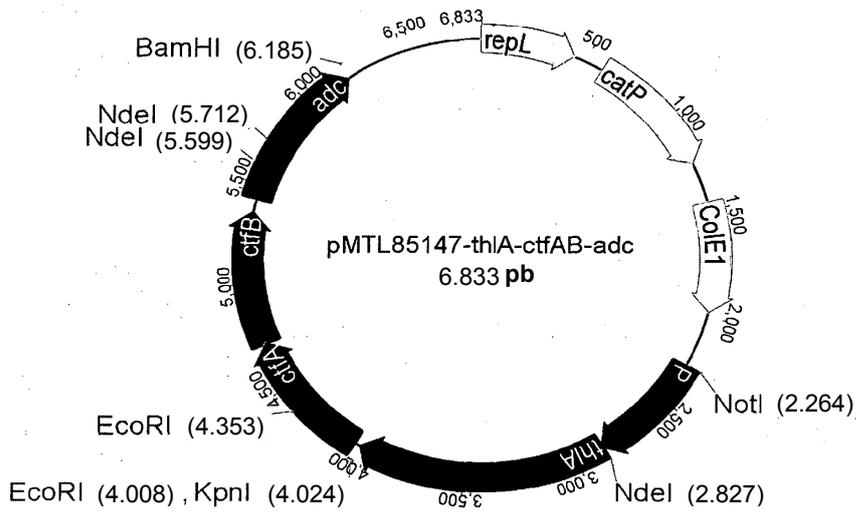


Figura 4

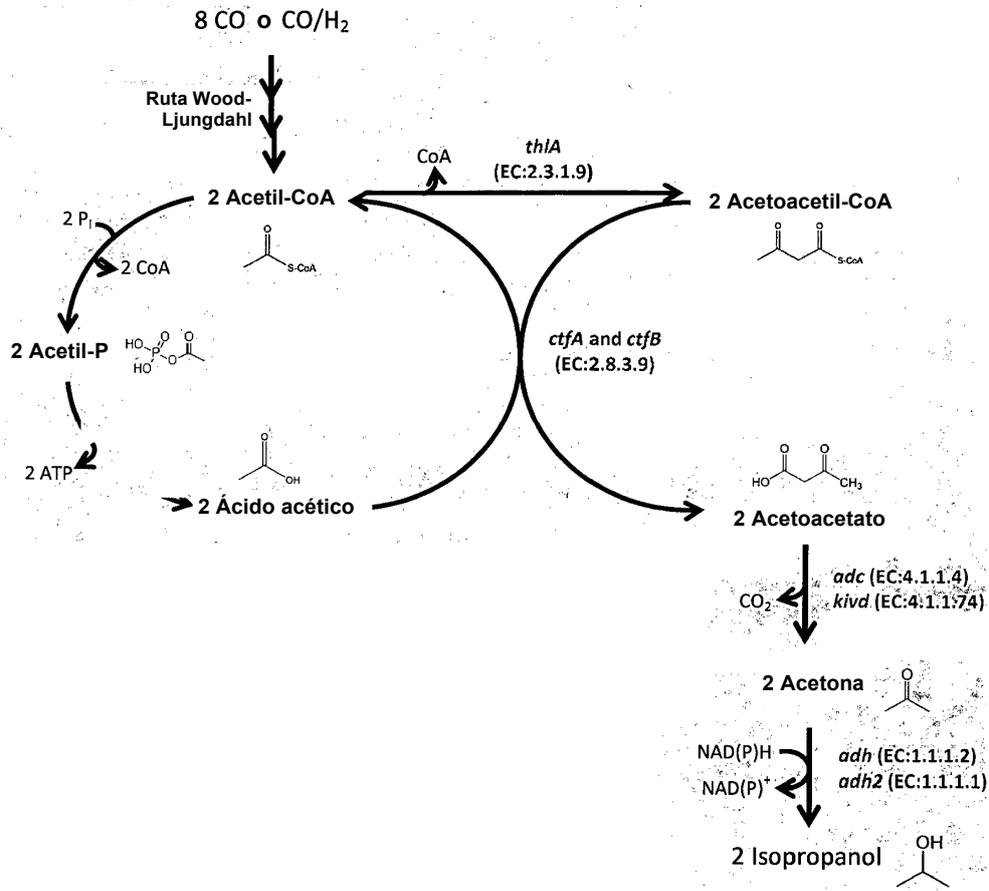


Figura 5

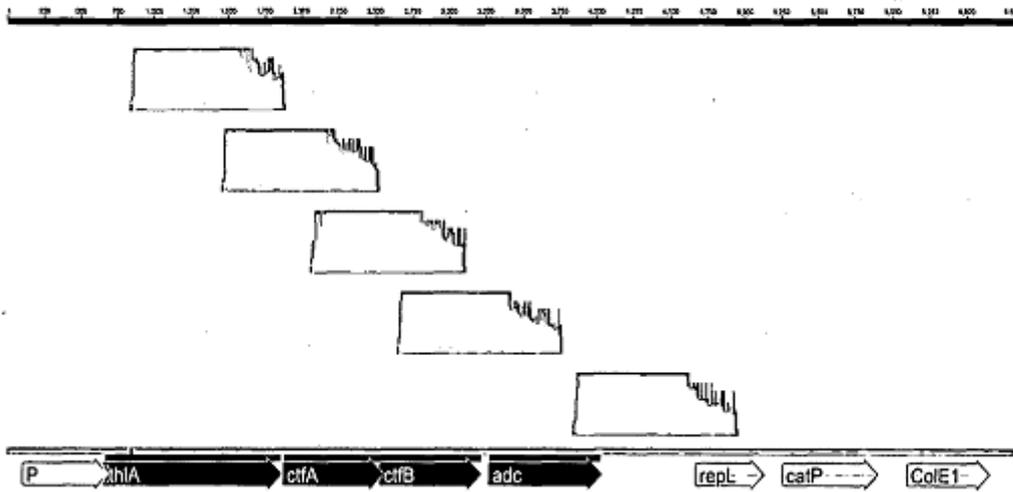


Figura 6

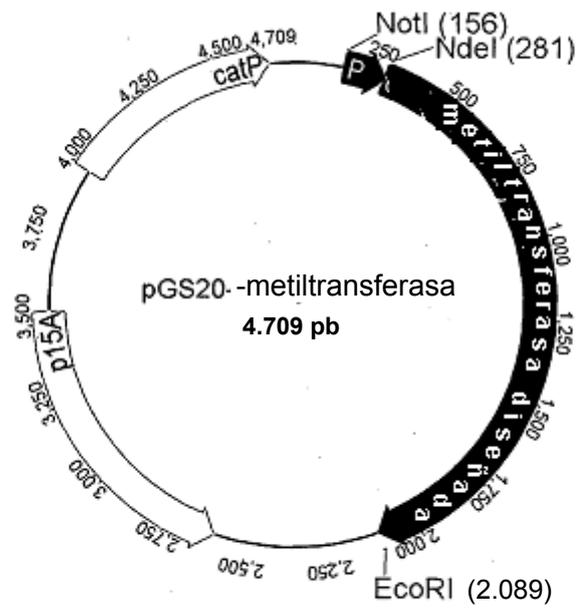


Figura 7

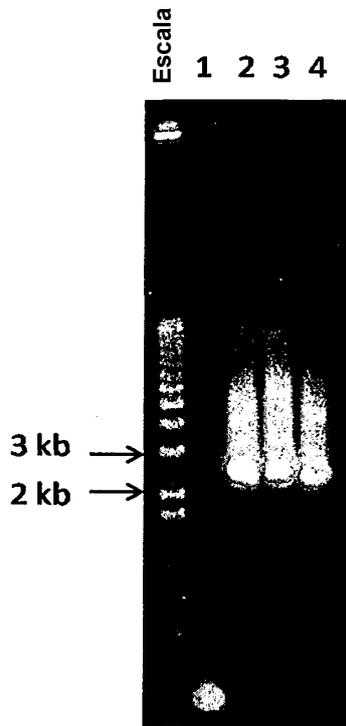


Figura 8

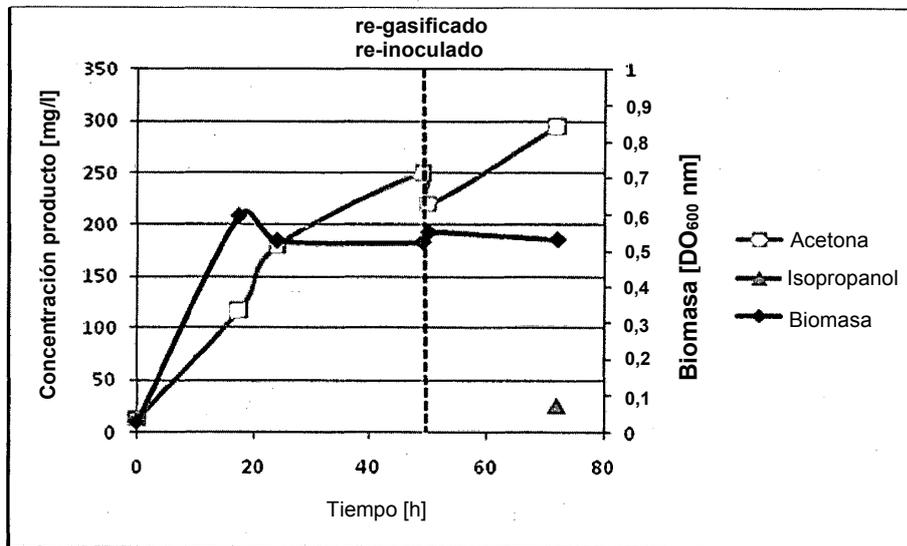


Figura 9

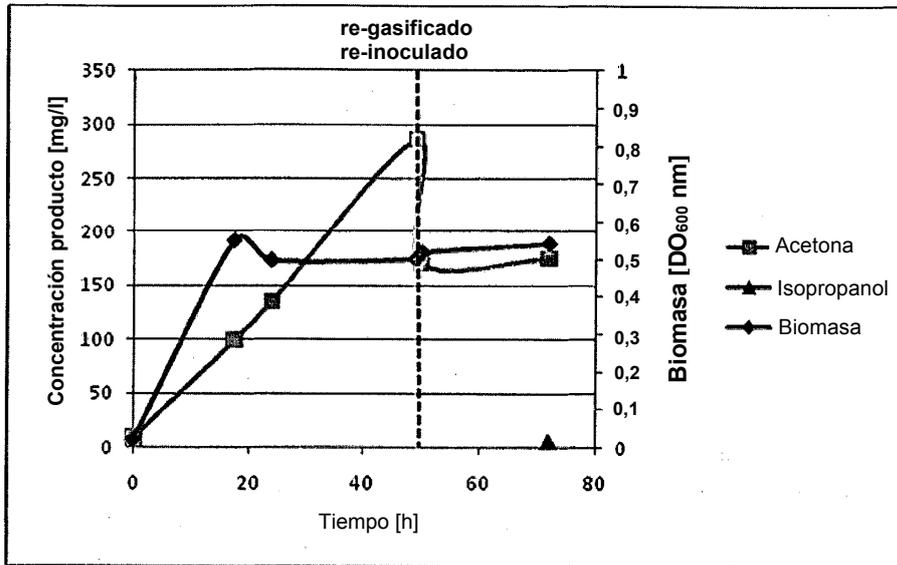


Figura 10

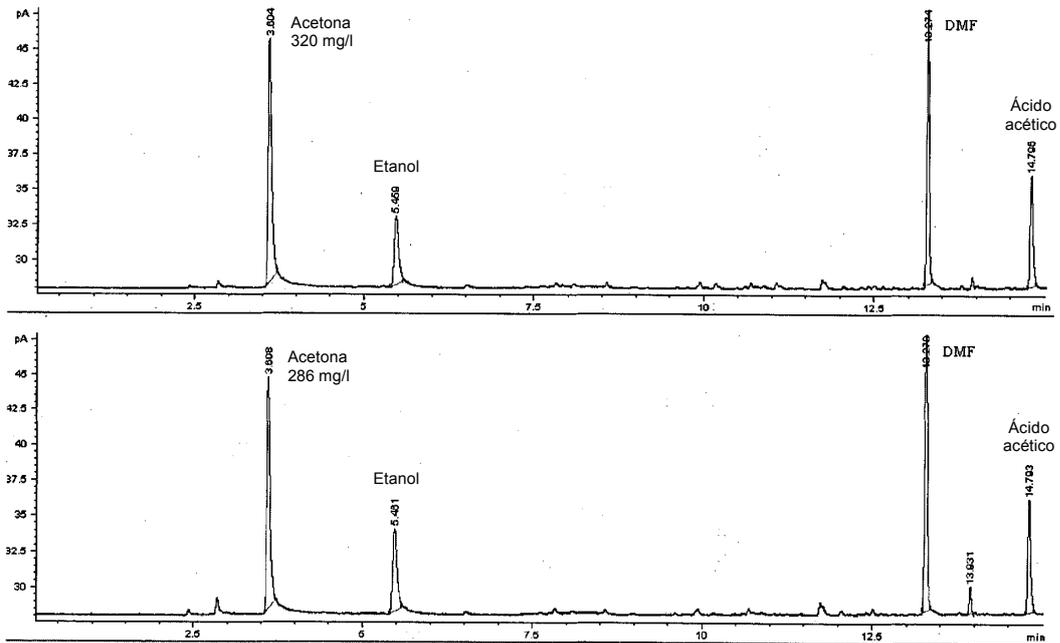


Figura 11

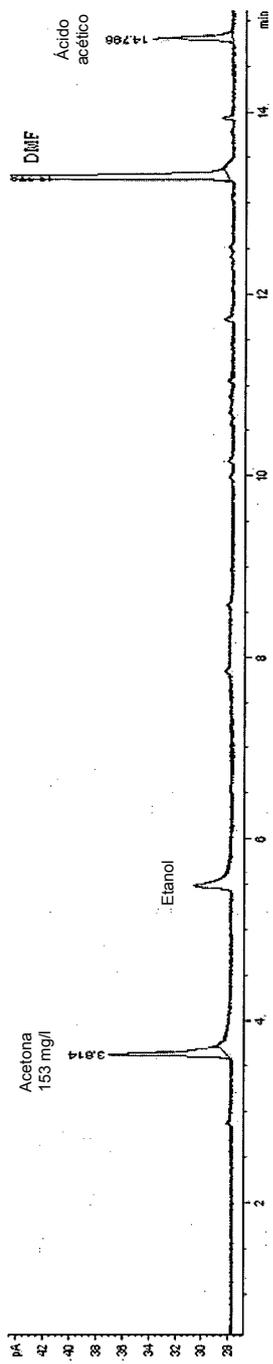


Figura 12

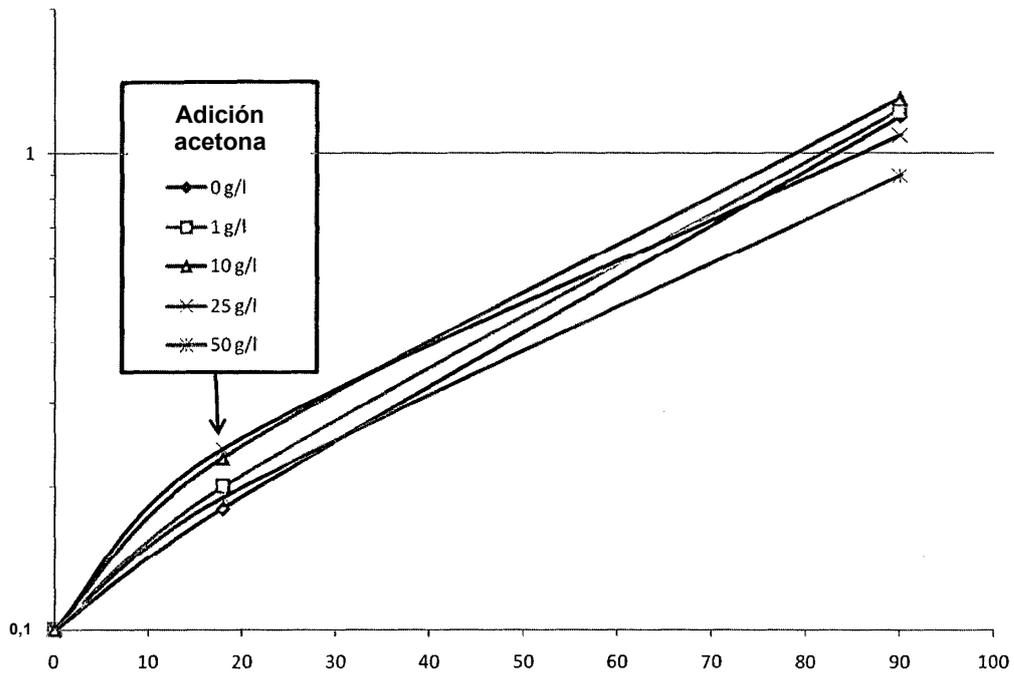
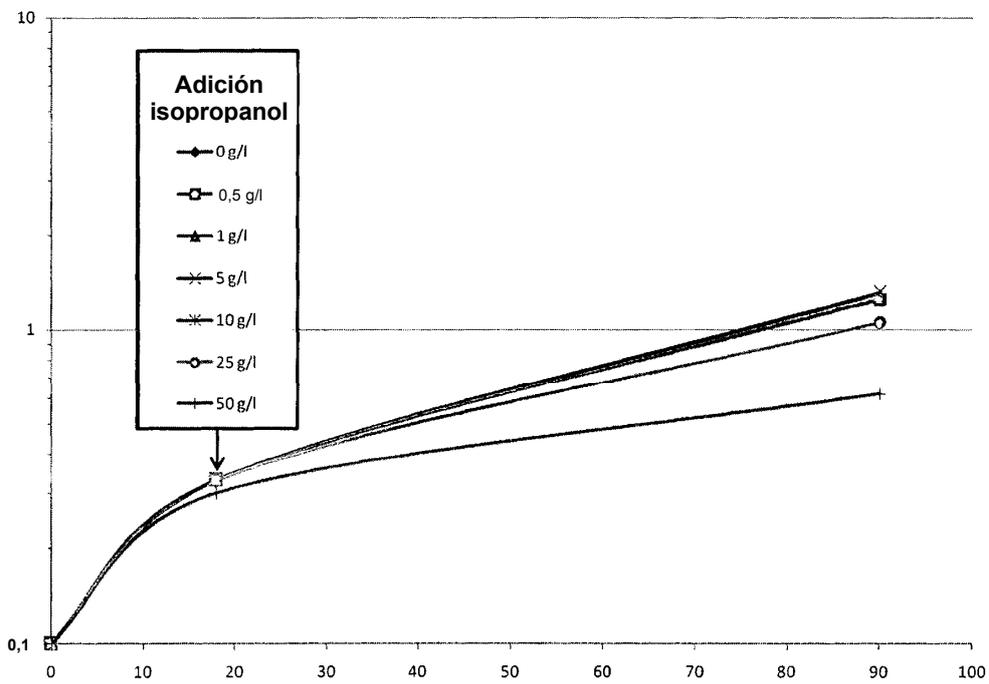


Figura 13



**Figura 14**

MKGFAMLGINKLGWIEKKNPVPGPYDAIVHPLAVSPCTSDIHTVFEGALGNRENMILGHEAVGEIAEVGSEVK  
 DFKVGDRIIVPCTTPDWRSLEVQAGFQQHSNGLAGWKFSNFKDGVFADYFHVNDADMNLAILPDEIPLESA  
 VMMTDMMTTGFHGAELADIKMGSSVVVIGIGAVGLMGIAGSKLRGAGRIIGVGSRPVCVETAKFYGATDIVN  
 YKNGDIVEQIMDLTHGKGVDRVIMAGGGAETLAQAVTMVKPGGVISNINYHSGDLPPIPRVQWCGMAHK  
 TIRGGLCPPGGRLRMEMLRDLVLYKRVDLKLVTHVFDGAENIEKALLLMKNPKDLIKSVVTF\*

**Figura 15**

ATGAAAGGTTTTGCAATGTTAGGTATTAACAAATTAGGATGGATTGAAAAGAAAAACCCAGTGCCAGGTC  
 CTTATGATGCGATTGTACATCCTCTAGCTGTATCCCATGTACATCAGATATACATACGGTTTTTGAAGGAG  
 CACTTGGTAATAGGGAAAAATGATTTTAGGCCATGAAGCTGTAGGTGAAATAGCCGAAGTTGGCAGCGA  
 AGTTAAAGATTTTAAAGTTGGCGATAGAGTTATCGTACCATGCACAACACCTGACTGGAGATCTTTAGAAG  
 TCCAAGCTGGTTTTCAGCAGCATTCAAACGGTATGCTTGCAGGATGGAAGTTTTCCAATTTTAAAGA\_CGGT  
 GTATTTGCAGATTACTTTTCATGTAAACGATGCAGATATGAATCTTGCCATACTCCAGATGAAATACCTTTA  
 GAAAGTGCAGTTATGATGACAGACATGATGACTACTGGTTTTTCATGGAGCAGAAGTTGCAGACATAAAAAAT  
 GGGCTCCAGCGTTGTAGTAATTGGTATAGGAGCTGTTGGATTAATGGGAATAGCCGGTTCCAAACTTCGA  
 GGAGCAGGCAGAATTATCGGTGTTGGAAGCAGACCTGTTTGTGTTGAAACAGCTAAATTTTATGGAGCAA  
 CTGATATTGTAATTATAAAAAATGGTGATATAGTTGAACAAATCATGGACTTAACTCATGGTAAAGGTGTA  
 GACCGTGAATCATGGCAGGCGGTGGTGCTGAAACACTAGCACAAGCAGTAACTATGGTTAAACCTGGCG  
 GCGTAATTTCTAACATCAACTACCATGGAAGCGGTGATACTTTACCAATACCTCGTGTCAATGGGGCTGCG  
 GCATGGCTCACAAAACATAAGAGGAGGATTATGCCCGCGGACGTCTTAGAATGGAAATGCTAAGAGA  
 TCTTGTCTATATAAACGTGTTGATTTGAGTAACTTGTTACTCATGTATTTGATGGTGCAGAAAATATTGAA  
 AAGGCCCTTTTGCTTATGAAAAATAAGCCAAAAGATTTAATTAATCAGTAGTTACATTCTAA

**Figura 16**

ATGAAAGGTTTTGCAATGTTAGGTATTAACAAATTAGGATGGATTGAAAAGAAAAACCCAGTGCCAGGTC  
 CTTATGATGCGATTGTACATCCTCTAGCTGTATCCCATGTACATCAGATATACATACGGTTTTTGAAGGAG  
 CACTTGGTAATAGGGAAAAATGATTTTAGGCCATGAAGCTGTAGGTGAAATAGCCGAAGTTGGCAGCGA  
 AGTTAAAGATTTTAAAGTTGGCGATAGAGTTATCGTACCATGCACAACACCTGACTGGAGATCTTTAGAAG  
 TCCAAGCTGGTTTTCAGCAGCATTCAAACGGTATGCTTGCAGGATGGAAGTTTTCCAATTTTAAAGATGGT  
 GTATTTGCAGATTACTTTTCATGTAAACGATGCAGATATGAATCTTGCCATACTCCAGATGAAATACCTTTA  
 GAAAGTGCAGTTATGATGACAGACATGATGACTACTGGTTTTTCATGGAGCAGAAGTTGCAGACATAAAAAAT  
 GGGCTCCAGCGTTGTAGTAATTGGTATAGGAGCTGTTGGATTAATGGGAATAGCCGGTTCCAAACTTCGA  
 GGAGCAGGCAGAATTATCGGTGTTGGAAGCAGACCTGTTTGTGTTGAAACAGCTAAATTTTATGGAGCAA  
 CTGATATTGTAATTATAAAAAATGGTGATATAGTTGAACAAATCATGGACTTAACTCATGGTAAAGGTGTA  
 GACCGTGAATCATGGCAGGCGGTGGTGCTGAAACACTAGCACAAGCAGTAACTATGGTTAAACCTGGCG  
 GCGTAATTTCTAACATCAACTACCATGGAAGCGGTGATACTTTACCAATACCTCGTGTCAATGGGGCTGCG  
 GCATGGCTCACAAAACATAAGAGGAGGATTATGCCCGCGGACGTCTTAGAATGGAAATGCTAAGAGA  
 TCTTGTCTATATAAACGTGTTGATTTGAGTAACTTGTTACTCATGTATTTGATGGTGCAGAAAATATTGAA  
 AAGGCCCTTTTGCTTATGAAAAATAAGCCAAAAGATTTAATTAATCAGTAGTTACATTCTAA

**Figura 17**

ATGAAAGGTTTTGCAATGTTAGGTATTAACAAGTTAGGATGGATTGAAAAGAAAAACCCAGTACCAGGTC  
 CTTATGATGCGATTGTACATCCTCTAGCTGTATCCCCATGTACATCAGATATACATACGGTTTTTGAAGGAG  
 CACTTGGTAATAGGGAAAAATAGTTTTAGGTCACGAAGCTGTAGGTGAAATAGCTGAAGTTGGCAGTGA  
 AGTTAAAGATTTTAAAGTTGGCGATAGAGTTATCGTACCATGCACAACACCTGACTGGAGATCCTTAGAAG  
 TCCAAGCTGGTTTTCAACAGCATTCAAACGGTATGCTTGCAGGATGGAAGTTTTCCAATTTTAAAGACGGT  
 GTATTTGCAGATTACTTTTCATGTAACGATGCAGATATGAATCTTGAATACTTCCAGATGAAATACCTTTA  
 GAAAGTGCAGTTATGATGACAGACATGATGACTACTGGTTTTTCATGGGGCAGAAGTTGCTGACATAAAAAAT  
 GGGTTCCAGTGTGTCGTAATTGGTATAGGAGCTGTTGGATTAATGGGAATAGCCGGTTCCAACTTCGAG  
 GAGCAGGTAGAATTATCGGTGTTGGAAGCAGACCCGTTTGTGTTGAAACAGCTAAATTTTATGGAGCAACT  
 GATATTTGAAATTAAAAATGGTGATATAGTTGAACAAATAATGGACTTAACTCATGGTAAAGGTGTAGA  
 CCGTGAATCATGGCAGGCGGTGGTGTGAAACACTAGCACAAGCAGTAACTATGGTTAAACCTGGCGGC  
 GTAATTTCTAACATCAACTACCATGGAAGCGGTGATACTTTGCCAATACCTCGTTCATGGGGCTGCGG  
 CATGGCTCAGAAAATAAGAGGAGGGTTATGTCCCGCGGACGTCTTAGAATGGAATGCTAAGAGAC  
 CTTGTTCTATATAAACGTGTTGATTTGAGCAAACCTGTTACTCATGTATTTGATGGTGCAGAAAATATTGAA  
 AAGGCCCTTTGCTTATGAAAAATAAGCCAAAAGATTTAATTAATCAGTAGTTACATTCTAA

**Figura 18**

ATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAGTGCAGTAAGAACAGCGATTGGATCTTATGGAAAGTCTCTTAAGGATG  
 TACCAGCAGTAGATTTAGGAGCTACAGCTATAAAGGAAGCAGTTAAAAAAGCAGGAATAAAACCAGAGG  
 ATGTTAATGAAGTCATTTTAGGAAATGTTCTTCAAGCAGGTTTAGGACAGAATCCAGCAAGACAGGCATCT  
 TTTAAAGCAGGATTACCAGTTGAAATCCAGCTATGACTATTAATAAGGTTTGTGGTTCAGGACTTAGAACA  
 GTTAGCTTAGCAGCACAAATTATAAAGCAGGAGATGCTGACGTAATAATAGCAGGTGGTATGGAAAATA  
 TGTCTAGAGCTCCTTACTTAGCGAATAACGCTAGATGGGGATATAGAATGGGAAACGCTAAATTTGTTGAT  
 GAAATGATCACTGACGGATTGTGGGATGCATTTAATGATTACCACATGGGAATAACAGCAGAAAACATAG  
 CTGAGAGATGGAACATTTCAAGAGAAGAACAAGATGAGTTTGTCTTGCATCAGAAAAAAGCTGAAGA  
 AGCTATAAAATCAGGTCAATTTAAAGATGAAATAGTTCTGTAGTAATTAAGGCAGAAAGGGAGAAACT  
 GTAGTTGATACAGATGAGCACCTAGATTTGGATCAACTATAGAAGGACTTGCAAAATTAACCTGCCTT  
 CAAAAAAGATGGAACAGTTACAGCTGGTAATGCATCAGGATTAATGACTGTGCAGCAGTACTTGTAAATCA  
 TGAGTGCAGAAAAAGCTAAAGAGCTTGGAGTAAACCACTTGCTAAGATAGTTTCTTATGGTTCAGCAGG  
 AGTTGACCCAGCAATAATGGGATATGGACCTTCTATGCAACAAAAGCAGCTATTGAAAAAGCAGGTTGG  
 ACAGTTGATGAATTAGATTTAATAGAATCAAATGAAGCTTTTGCAGCTCAAAGTTTAGCAGTAGCAAAAGA  
 TTTAAATTTGATATGAATAAAGTAAATGTAATGGAGGAGCTATTGCCCTTGGTCATCCAATTGGAGCAT  
 CAGGTGCAAGAATACTCGTACTCTTGTACACGCAATGCAAAAAAGAGATGCAAAAAAAGGCTTAGCAACT  
 TTATGTATAGGTGGCGGACAAGGAACAGCAATATTGCTAGAAAAGTGCTAG

**Figura 19**

ATGAATAAATTAGTAAAATTAACAGATTTAAAGCGCATTTTCAAAGATGGCATGACAATTATGGTTGGGGG  
 TTTTTAGATTGTGGAACCTCTGAAAATATTATAGATAGCTAGTTGATTTAAATATAAAAAATCTGACTATT  
 ATAAGCAATGATACAGCTTTTCTAATAAAGGAATAGGAAAACCTATTGTAATGGTCAAGTTTCTAAAGT  
 AATTGCTTACATATTGGAACCTAATCCTGAAACTGGAAAAAAATGAGCTCTGGAGAACTTAAAGTTGAGC  
 TTTCCCAACAAGGAACACTGATTGAAAGAAATTCGTGCAGCTGGATCTGGACTCGGAGGTGTATTAACCTCA  
 ACTGGACTTGGAACTATCGTTGAAAGAAGGTAAGAAAAAAGTTACTATCGATGGCAAAGAATATCTATTAGA  
 ACTTCTTTATCTGCTGATGTTTCATTAATAAAGGTAGCATTGTAGATGAATTTGAAATACCTTCTATAGG  
 GCTGCTACTAAAAATTTCAATCCATATATGGCAATGGCTGCAAAAACAGTTATAGTTGAAGCAGAAAATTT  
 AGTTAAATGTGAAGATTTAAAAAGAGATGCCATAATGACTCCTGGCGTATTAGTAGATTATATCGTTAAGG  
 AGCGGCTTAA

**Figura 20**

TTGATTGTAGATAAAGTTTTAGCAAAAAGAGATAATTGCCAAAAGAGTTGCAAAAAGAACTAAAAAAGACC  
 AACTCGTAAACCTTGGGAATAGGACTTCCAACCTTTAGTAGCAAATTATGTACCAAAAAGAAATGAACATTACTT  
 TTGAATCAGAAAATGGCATGGTTGGTATGGCACAAATGGCATCATCAGGTGAAAATGACCCAGATATAAT  
 AAATGCTGGCGGGGAATATGTAACATTATTACCTCAAGGTTCATTTTTTGATAGTTCAATGTCTTTCCGCACT  
 AATACGAGGAGGACATGTTGATGTTGCTGTTCTTGGTGTCTAGAAAGTTGATGAAAAAGGTAATTTAGCTA  
 ACTGGATTGTTCCAAATAAAATTGTCCCAGGTATGGGTGGCGCTATGGATTTAGCAATAGGCGCAAAAAAA  
 ATAATAGTGGCAATGCAACATACAGGAAAAAGTAAACCTAAAATCGTTAAAAAATGACTCTCCCACTTAC  
 TGCTAAGGCTCAAGTGGATTTAATTGTACAGAACTTTGTGTAATTGATGTAACAAATGACGGCTTACTTTT  
 AAAAGAAATTCATAAAGATCAACTATTGATGAAATTTAAATTTTAAACAGATGCAGATTTAATTATCCAGA  
 TAACTTAAAGATTATGGATATATGA

**Figura 21**

ATGTTAGAAAGTGAAGTATCTAAACAAATTACAACCTCACTTGCTGCTCCAGCGTTTCCTAGAGGACCATAT  
 AGGTTTCACAATAGAGAATATCTAAACATTATTTATCGAACTGATTTAGATGCTCTTCGAAAAATAGTACCA  
 GAGCCACTTGAATTAGATAGAGCATATGTTAGATTTGAAATGATGGCTATGCCTGATACAACCGGACTAGG  
 CTCATATACAGAATGTGGTCAAGCTATTCCAGTAAAATATAATGGTGTTAAGGGTGACTACTTGCATATGAT  
 GTATCTAGATAATGAACCTGCTATTGCTGTTGGAAGAGAAAAGTAGCGCTTATCCAAAAAGCTTGGCTATC  
 CAAAGCTATTTGTTGATTGAGACTTTAGTTGGGACACTTAAATATGGTACATTACCAGTAGCTACTGCAA  
 CAATGGGATATAAGCACGAGCCTCTAGATCTTAAAGAAGCCTATGCTCAAATTGCAAGACCCAATTTTATG  
 CTAATAATCATTCAAGTTACGATGGTAAGCCAAGAATTTGTGAATAATATGTGCAGAAAATACTGATAT  
 AACTATTCACGGTCTTGGACTGGAAGTGCACGTCTACAATTATTTAGCCATGCACTAGCTCCTCTTGCTGA  
 TTTACCTGTATTAGAGATTGTATCAGCATCTCATATCCTCACAGATTTAACTCTTGAACACCTAAGGTTGTA  
 CATGATTATCTTTCAGTAAAAATA

**Figura 22**

AGATAGTCATAATAGTTCAGAATAGTTCAATTTAGAAATTAGACTAAACTTCAAATGTTTGTTAAATATA  
 TACCAAAGTAGTATAGATATTTTTTAAACTGGACTTAAACAGTAGTAATTTGCCTAAAAAATTTTTTCAAT  
 TTTTTTAAAAAATCCTTTTCAAGTTGTACATTGTTATGGTAATATGTAATTGAAGAAGTTATGTAGTAATAT  
 TGTAACGTTTCTGATTTTTTACATCCATGTAGTGCTTAAAAACCAAATATGTCACATGCAATTGTATA  
 TTTCAAATAACAATATTTATTTTCTCGTTAAATTCACAAATAATTTATTAATAATCAATAACCAAGATTATA  
 CTTAAATGGATGTTTATTTTTAACACTTTTATAGTAAATATATTTATTTTATGTAGTAAAAAGGTTATAATTA  
 TAATTGTATTTATTACAATTAATTAATAAAAAAATAGGGTTTTAGGTAAAATTAAGTTATTTAAGAAGTA  
 ATTACAATAAAAAATGAAGTTATTTCTTTAAGGAGGGAATTATTA

**Figura 23**

MFPCNAYIEYGDKNMNSFIEDVEQIYNFIKKNIDVEEKMHFIETYKQKSNMKKEISFSEYYKQKIMNGKNGVVY  
 TPPEMAAFMVKNLINVNDVIGNPFIKIIDPSCGSGNLICKFLYLNRFIKNIEVINSKNLNLKLEDISYHIVRNNLF  
 GFDIDETAIKVLKIDFLISNQFSEKNFQVKDFLVENIDRKYDVFIGNPPYIGHKSVDSYSYVLRKIYGSYRDKGDI  
 SYCFFQKSLKCLKEGGKLVFVTSRYFCESCSGKELRFLIENTSIYKIIDFYGIRPFKRVGIDPMIIFLVRTKNWNNNI  
 EIIRPNKIEKNEKNKFLDSLFLDKSEKCKKFSISQKSINNDGWVVFVDEVEKNIIDKIKEKSKFILKDICHSCQGIITGCD  
 RAFIVDRDIINSRRIELRLIKPWIKSSHIRKNEVIKGEKFIYSNLIENETECPNAIKYIEQYKRLMERRECKKGRKW  
 YELQWGRKPEIFEKIVFPYKSCDNRFALDKGSYFSADIYSLVLKKNVPFTYEILLNILNSPLYEFYKTFAKKLGEN  
 LYEYPPNNLMKLCIPSIDFGGENNIEKKLYDFFLTDKEIEIEKIDNC\*

**Figura 24**

ATGTTTCCGTGCAATGCCTATATCGAATATGGTGATAAAAAATATGAACAGCTTTATCGAAGATGTGGAACA  
 GATCTACAACCTTCATTA AAAAAGAACATTGATGTGGAAGAAAAGATGCATTTTCATTGAAACCTATAAACAGA  
 AAAGCAACATGAAGAAAGAGATTAGCTTTAGCGAAGAATACTATAAACAGAAGATTATGAACGGCAAAAA  
 TGGCGTTGTGTACACCCCGCCGAAATGGCGGCCTTTATGGTTAAAAATCTGATCAACGTTAACGATGTTA  
 TTGGCAATCCGTTTATTA AAAATCATTGACCCGAGCTGCGGTAGCGGCAATCTGATTTGCAATGTTTTCTGT  
 ATCTGAATCGCATCTTTATTAAGAACATTGAGGTGATTAACAGCAAAAATAACCTGAATCTGAAACTGGAA  
 GACATCAGCTACCACATCGTTTCGCAACAATCTGTTTGGCTTCGATATTGACGAAACCGCGATCAAAGTGCT  
 GAAAATTGATCTGTTTCTGATCAGCAACCAATTTAGCGAGAAAAATTTCCAGGTTAAAGACTTTCTGGTGG  
 AAAATATTGATCGCAATATGACGTGTTTCATTGGTAAATCCGCCGTATATCGGTCACAAAAGCGTGGACAGC  
 AGCTACAGCTACGTGCTGCGCAAAATCTACGGCAGCATCTACCGCGACAAAGGCGATATCAGCTATTGTTT  
 CTTTCAGAAGAGCCTGAAATGTCTGAAGGAAGGTGGCAAACTGGTGTGTTGTGACCAGCCGCTACTTCTGCC  
 AGAGCTGCAGCGGTAAAGAACTGCGTAAATTCCTGATCGAAAAACGAGCATTACAAGATCATTGATTTT  
 TACGGCATCCGCCCGTTCAAACGCGTGGGTATCGATCCGATGATTATTTTTCTGGTTCGTACGAAGAAGCTG  
 GAACAATAACATTGAAATTATTCGCCCAACAAGATTGAAAAAGAACGAAAAAACAATTCCTGGATAGC  
 CTGTTCTGGACAAAAGCGAAAAGTGTAAAAAGTTTAGCATTAGCCAGAAAAGCATTAAATAACGATGGCT  
 GGGTTTTCTGTGGACGAAGTGGAGAAAAACATTATCGACAAAATCAAAGAGAAAAGCAAGTTCATTCTGAA  
 AGATATTTGCCATAGCTGTCAAGGCATTATCACCGTTGTGATCGCGCCTTTATTGTGGACCGTGATATCAT  
 CAATAGCCGTAAGATCGAACTGCGTCTGATTAACCGTGGATTAAGCAGCCATATCCGTAAGAATGAAG  
 TTATTAAGGGCGAAAAATTCATCATCTATAGCAACCTGATTGAGAATGAAACCGAGTGTCCGAATGCGATT  
 AAATATATCGAACAGTACAAGAAACGTCTGATGGAGCGCCGGAATGCAAAAAGGGCACGCGTAAGTGG  
 TATGAACTGCAATGGGGCCGTAACCGGAAATCTTCAAGAAAAGAAAATGTTTTCCCGTATAAAAAGCTG  
 TGACAATCGTTTTGCACTGGATAAGGGTAGCTATTTTAGCGCAGACATTTATAGCCTGTTCTGAAGAAAA  
 ATGTGCCGTTACCTATGAGATCCTGCTGAATATCCTGAATAGCCCGCTGTACGAGTTTTACTTTAAGACCT  
 TCGCGAAAAAGCTGGGCGGAGAACTGTACGAGTACTATCCGAACAACCTGATGAAGCTGTGCATCCCGAG  
 CATCGATTTCCGGCGGTGAGAACAAATATTGAGAAAAAGCTGTATGATTTCTTTGGTCTGACGGATAAAGAAA  
 TTGAGATTGTGGAGAAGATCAAAGATAACTGCTAA

**Figura 25**

MKGFAMILGINKLWIEKERPVAGSYDAIVRPLAVSPTSDIHTVFEGALGDRKNMILGHEAVGEVVEVGVSEVK  
 DFKPGDRVIVPCTTPDWRSLVQAGFQHSNGLAGWKFSNFKDGVFGEYFHVNDADMNLAILPKDMPLE  
 NAVMITDMMTTGFGHGAELADIQMGSSVVVIGIGAVGLMGIAGAKLRGAGRIIGVGSRPICVEAKFYGATDIL  
 NYKNGHIVDQVMKLTNGKGVDRVIMAGGGSETLSQAVSMVKPGGHSNINHYHSGDALLIPRVEWCGCMAH  
 KTIKGGCLCPGRLRAEMLRDMVVYNRVDSLKLVTHVYHGFHDHIEALLMKDKPKDLIKAVVIL

**Figura 26**

ATGAAAGGTTTTGCAATGCTAGGTATTAATAAGTTAGGATGGATCGAAAAAGAAAGGCCAGTTGCGGGTT  
 CATATGATGCTATTGTACGCCATTAGCAGTATCTCCGTGTACATCAGATATACATACTGTTTTTGAGGGAG  
 CTCTTGAGATAGGAAGAATATGATTTTAGGGCATGAAGCTGTAGGTGAAGTTGTTGAAGTAGGAAGTGA  
 AGTGAAGGATTTTAAACCTGGTGACAGAGTTATAGTTCCTGTACAACCTCCAGATTGGAGATCTTTGGAAG  
 TTCAAGCTGTTTTCAACAGCACTCAAACGGTATGCTCGCAGGATGGAAATTTTCAAATTTCAAGGATGGA  
 GTTTTTGGTGAATATTTTCATGTAATGATGCGGATATGAATCTTGCATTCTACCTAAAGACATGCCATTA  
 GAAAATGCTGTTATGATAACAGATATGATGACTACTGGATTTTCATGGAGCAGAACTTGCAGATATTTCAAT  
 GGGTTCAAGTGTGTGTAATTGGCATTGGAGCTGTTGGCTTAATGGGAATAGCAGGTGCTAAATTACGT  
 GGAGCAGGTAGAATAATTGGAGTGGGGAGCAGGCCGATTTGTGTTGAGGCTGCAAAAATTTTATGGAGCA  
 ACAGATATTCTAAATTATAAAAATGGTCATATAGTTGATCAAGTTATGAAATTAACGAATGGAAAAGGCGT  
 TGACCGGTAATATGGCAGGCGGTGGTTCTGAAACATTATCCCAAGCAGTATCTATGGTTAAACCAGGAG  
 GAATAATTTCTAATATAAATATCATGGAAGTGGAGATGCTTTACTAATACCACGTGTAGAATGGGGATGT  
 GGAATGGCTACAAGACTATAAAGGAGGTCTTTGTCTGGGGACGTTTGTAGAGCAGAAATGTTAAGAG  
 ATATGGTAGTATAAATCGTGTGATCTAAGTAAATTAGTTACACATGTATATCATGGATTTGATCACATAG  
 AAGAAGCACTGTTATTAATGAAAGACAAGCCAAAAGACTTAATTAAGCAGTAGTTATATTATAA

**Figura 27**

MKGFAMLSIGKVGWIEKEKPAPGPFDAIVRPLAVAPCTSDIHTVFEGAIGERHNMILGHEAVGEVVEVGSEVKD  
FKPGDRVVVPAITPDWRTSEVQRGYHQHSGGMLAGWKFNSNVKDGVFGEFFHVNDADMNLAHLPKEIPLEAA  
VMIPDMMTTGFHGAELADIELGATVAVLIGIPVGLMAVAGAKLRGAGRIIIVGSRPVCVDAAKYYGATDIVNY  
KDGPIESQIMNLTEGKGVDAIIAGGNADIMATAVKIVKPGGTIANVNYFGEGEVLPVPRLEWGCMAHKTIK  
GGLCPPGRLRMERLIDLVFYKRVDPKLVTHVFRGFDNIEKAFMLMKDKPKDLIKPVVILA

**Figura 28**

ATGAAAGGTTTTGCAATGCTAGGTATTAATAAGTTAGGATGGATCGAAAAAGAAAGGCCAGTTGCGGGTT  
CATATGATGCTATTGTACGCCATTAGCAGTATCTCCGTGTACATCAGATATACATACTGTTTTGAGGGAG  
CTCTTGGAGATAGGAAGAATATGATTTTAGGGCATGAAGCTGTAGGTGAAGTTGTTGAAGTAGGAAGTGA  
AGTGAAGGATTTAAACCTGGTGACAGAGTTATAGTTCCTTGACAACCTCCAGATTGGAGATCTTTGGAAG  
TTCAAGCTGGTTTTCAACAGCACTCAAACGGTATGCTCGCAGGATGGAAATTTTCAAATTTCAAGGATGGA  
GTTTTGGTGAATATTTTCATGTAATGATGCGGATATGAATCTTGCGATTCTACCTAAAGACATGCCATTA  
GAAAATGCTGTATGATAACAGATATGATGACTACTGGATTTTCATGGAGCAGAACTTGAGATATTTCAAAT  
GGTTCAAGTGTGTGGTAATTGGCATTGGAGCTGTTGGCTTAATGGGAATAGCAGGTGCTAAATTTACGT  
GGAGCAGGTAGAATAATTGGAGTGGGGAGCAGGCCGATTTGTTGAGGCTGCAAAATTTTATGGAGCA  
ACAGATATTTCAAATTAATAAAAATGGTCATATAGTTGATCAAGTTATGAAATTAACGAATGGAAAAGCGT  
TGACCGCGTAATTATGGCAGGCGGTGTTCTGAAACATTATCCAAGCAGTATCTATGGTTAAACCAGGAG  
GAATAATTTCTAATATAAATTATCATGGAAGTGGAGATGCTTTACTAATACCACGTGTAGAATGGGGATGT  
GGAATGGCTCACAAAGACTATAAAAAGGAGGCTTTTGTCTGGGGGACGTTTGAGAGCAGAAATGTTAAGAG  
ATATGGTAGTATAATCGTGTGATCTAAGTAAATTAGTTACACATGTATATCATGGATTTGATCACATAG  
AAGAAGCACTGTTATTAATGAAAGACAAGCCAAAAGACTTAATTAAGCAGTAGTTATATTATAA

**Figura 29**

MKEVVIAAVRTAIGSYGKSLKDVPVAVDLGATAIKEAVKAGIKPEDVNEVILGNVLQAGLGQNPARQASFKAG  
LPVEIPAMTINKVCGSLRTVSLAAQIIKAGDADVIIAGGMENMSRAPYLANNARWGYRMGNAKFVDEMITD  
GLWDAFNHYHMGITAENIAERWNISREEQDEFALASQKKAEEAIKSGQFKDEIVPVVIKGRKGETVVDTEHPR  
FGSTIEGLAKLKPFAKKGDTVAGNASGLNDCAAVLVIMSAAEKAKELGVKPLAKIVSYGSAGVDPAIMGYGPFYA  
TKAAIEKAGWTVDELDELIESNEFAAQSALAVAKDLKFDMNKVVNNGGAIALGHPIGASGARILVTLVHAMQKR  
DAKKGLATLCIGGGQGTAILLEKC\*

**Figura 30**

MNKLVKLTDLKRIFKDGMTIMVGGFLDCGTPENIIDMLVDLNIKNLTIISNDTAFPNKGIGKLIVNGQVSKVIASH  
IGTNPETGKKMSSGELKVELSPQGTIERIRAAGSGLGGVLTPTGLGTIVEEGKKVTIDGKEYLLELPLSADVSLIK  
GSIVDEFNGTFYRAATKNFNPYMAMAAKTVIVEAENLVKCEDLKRDAIMTPGVLVVYIVKEAA\*

**Figura 31**

LIVDKVLAKELIAKRVAKELKKDQLVNLGIGLPTLVANYVPKEMNITFESENGMVGMAQMASSGENDPDIINAG  
GEYVTLPLQGSFFDSSMSFALIRGGHVDVAVLGALEVDEKGNLANWIVPNKIVPGMGGAMDIAIGAKKIIVAM  
QHTGKSKPKIVKCTLP LTAKAQVDLIVTELCVIDVTNDGLLKEIHKDTTIDEIKFLTDADLIIPDNLKIMDI\*

**Figura 32**

MLESEVSKQITTPLAAPAFPRGPYRFHNREYLNIIYRTDLDALRKIVPEPELEDRAYVRFEMMAMPDPTGLGSYTE  
CGQAIPVKYNGVKGDYLMHMYLDNEPAIIVGRESSAYPKLGYPKLVDSDTLVGTLKYGTLPVATATMGYKH  
EPLDLKEAYAQIARPNFMLKIIQGYDGKPRICELICAENTDITIHGAWTGSARLQLFSHALAPLADLPVLEIVSASHI  
LTDLTLGTPKVVHDYLSVK\*

Figura 33

TGAAAGAAAGATATGGAACAGTCTATAAAGGCTCTCAGAGGCTCATAGACGAAGAAAGTGGAGAAGTCAT  
 AGAGGTAGACAAGTTATACCGTAAACAAACGTCTGGTAACTTCGTAAAGGCATATATAGTGCAATTAATAA  
 GTATGTTAGATATGATTGGCGGAAAAAACTTAAAAATCGTAACTATATCCTAGATAATGTCCACTTAAGTA  
 ACAATACAATGATAGCTACAACAAGAGAAATAGCAAAAAGCTACAGGAACAAGTCTACAAAACAGTAATAAC  
 AACACTTAAAAATCTTAGAAGAAGGAAATATTATAAAAAGAAAACTGGAGTATTAAATGTTAAACCCTGAAC  
 TACTAATGAGAGGGCAGCACCACAAAAACAAAAATACCTCTTACTCGAATTTGGGAACTTTGAGCAAGAGGC  
 AAATGAAATAGATTGACCTCCAATAACACCACGTAGTTATTGGGAGGTCAATCTATGAAATGCGATTAAG  
 GGCCGGCCAGTGGGCAAGTTGAAAAATTCACAAAATGTGGTATAATATCTTTGTTTCATTAGAGCGATAAA  
 CTTGAATTTGAGAGGGAACCTTAGATGGTATTTGAAAAATTTGATAAAAAATAGTTGGAACAGAAAAGAGTA  
 TTTTGACCACTACTTTGCAAGGTACCTTGACCTACAGCATGACCGTTAAAGTGGATATCACACAAAATAAA  
 GGAAAAGGGAATGAAACTATATCCTGCAATGCTTTATTATATTGCAATGATTGTAACCGCCATTTCAGAGTT  
 TAGGACGGCAATCAATCAAGATGGTGAATTTGGGGATATATGATGAGATGATACCAAGCTATACAATATTT  
 ACAATGATACTGAAACATTTTCCAGCCTTTGGACTGAGTGAAGTCTGACTTTAAATCATTTTTAGCAGATT  
 ATGAAAGTGATACGCAACGGTATGGAAACAATCATAGAATGGAAGGAAAGCCAAATGCTCCGGAAAACAT  
 TTTAATGTTATCTATGATACCGTGGTCAACCTTCGATGGCTTAACTCTGAATTTGCAGAAAAGGATATGATTA  
 TTTGATTCCTATTTTACTATGGGAAATATTATAAAGAAGATAACAAAATTAATACTTCTTTGGCAATTCAA  
 GTTCATCACGCAGTATGTGACGGATTTACATTTGCCGTTTTGTAACGAATTGCAGGAATTGATAAATAGT  
 TAACTTCAGGTTTTGTCTGTAACAAAAACAAGTATTTAAGCAAAAACATCGTAGAAAATACGGTGTTTTTTGT  
 TACCCTAAGTTTAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTCGTTCCACTGAG  
 CGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC  
 AAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGTTTTGTTTCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG  
 GTAACCTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAACTAGTTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTC  
 AAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGAT  
 AAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGG  
 GGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCT  
 ATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAA  
 CAGGAGAGCGCAGCGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTTCCGCA  
 CCTCTGACTTGAACGCTGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC  
 GCGGCCTTTTTACGGTCTGCTGCTTTTGTGCTGACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTC  
 TGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGC  
 GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGAGGGCCCTGCGAGGATAAAAAAATTTGTAG  
 ATAAATTTATAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTATCAGGAAACAGCTATGACCGCGCCGAGATAGT  
 CATAATAGTCCAGAATAGTTCAATTTAGAAATAGACTAACTTCAAATGTTTGTAAATATATACCAAA  
 CTAGTATAGATATTTTTAAATACTGGACTTAAACAGTAGTAATTTGCCTAAAAAATTTTTCAATTTTTTTA  
 AAAAACTTTTTCAAGTTGTACATTGTTATGGTAATATGTAATTGAAGAAGTTATGTAGTAATATTGTAAC  
 GTTTCTTGATTTTTTACATCCATGTAGTGCTAAAAAACCAAAATATGTCACATGCAATTTGATATTTCAA  
 TAACAATATTTATTTCTCGTTAAATTCACAAATAATTTATTAATAATATCAATAACCAAGATTACTTAAAT  
 GGATGTTATTTTTAACACTTTTATAGTAAATATTTATTTATGTAGTAAAAAGGTTATAATTATAATTGT  
 ATTTATTACAATTAATTAATAAAAAATAGGGTTTTAGGTAATAAATTAAGTTATTTAAGAAGTAATTACAA  
 TAAAAATTGAAGTTATTTCTTTAAGGAGGGAATTTTCATATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAGTGCAATAA  
 GAACAGCGATTGGATCTTATGGAAAGTCTCTTAAGGATGTACCAGCAGTAGATTTAGGAGCTACAGCTATA  
 AAGGAAGCAGTTAAAAAAGCAGGAATAAAACCAGAGGATGTTAATGAAGTCATTTTAGGAAATGTTCTTC  
 AAGCAGGTTTAGGACAGAATCCAGCAAGACAGGCATCTTTAAAGCAGGATTACCAGTTGAAATCCAGCT  
 ATGACTATTAATAAGGTTTGTGGTTCAGGACTTAGAACAGTTAGCTTAGCAGCACAAATTAATAAGCAGG  
 AGATGCTGACGTAATAATAGCAGGTGGTATGGAAAATATGTCTAGAGCTCCTTACTTAGCGAATAACGCTA  
 GATGGGGATATAGAATGGGAAACGCTAAATTTGTTGATGAAATGATCACTGACGGATTGTGGGATGCATT  
 TAATGATTACCACATGGGAATAACAGCAGAAAACATAGCTGAGAGATGGAACATTTCAAGAGAAGAACAA  
 GATGAGTTTGCTCTTGCATCACAAAAAAGCTGAAGAAGCTATAAAATCAGGTCATTTAAAGATGAAAT  
 AGTTCCTGTAGTAATTAAGGCAGAAAAGGGAGAACTGTAGTTGATACAGATGAGCACCCCTAGATTTGGA  
 TCAACTATAGAAGGACTTGCAAAATTAACCTGCCTTCAAAAAAGATGGAACAGTTACAGCTGTTAATGC

**Figura 33 continuación**

ATCAGGATTA AATGACTGTGCAGCAGTACTTGTAAATCATGAGTGCAGAAAAAGCTAAAGAGCTTGGAGTA  
 AAACCACCTTGCTAAGATAGTTTCTTATGGTTCCAGCAGGAGTTGACCCAGCAATAATGGGATATGGACCTTT  
 CTATGCAACAAAAGCAGCTATTGAAAAAGCAGGTTGGACAGTTGATGAATTAGATTTAATAGAATCAAATG  
 AAGCTTTTGCAGCTCAAAGTTTAGCAGTAGCAAAAGATTTAAAATTTGATATGAATAAAGTAAATGTAAAT  
 GGAGGAGCTATTGCCCTTGGTCATCCAATTGGAGCATCAGGTGCAAGAATACTCGTTACTCTTGTACACGC  
 AATGCAAAAAAGAGATGCAAAAAAGGCTTAGCAACTTTATGTATAGGTGGCGGACAAGGAACAGCAATA  
 TTGCTAGAAAAGTGCTAGGAATTCGAGCTCGGTACCAGGGAGATATTAATGAATAAATAGTAAATTA  
 ACAGATTTAAAGCGCATTTTCAAAGATGGCATGACAATTATGGTTGGGGTTTTTTAGATTGTGGAACCTCT  
 GAAAATATTATAGATATGCTAGTTGATTTAAATATAAAAAATCTGACTATTATAAGCAATGATACAGCTTTT  
 CCTAATAAAGGAATAGGAAAACCTTATTGTAATGGTCAAGTTTCTAAAGTAATTGCTTCACATATTGGAAC  
 AATCCTGAAACTGGAAAAAAATGAGCTCTGGAGAACTTAAAGTTGAGCTTTCCCAAGGAACACTGAT  
 TGAAAGAATTCGTGCAGCTGGATCTGGACTCGGAGGTGTATTAAGTCAACTGGACTTGGAACTATCGTTG  
 AAGAAGGTAAGAAAAAGTTACTATCGATGGCAAAGAATATCTATTAGAATTCCTTTATCTGCTGATGTTT  
 CATTAAATAAAGGTAGCATTGTAGATGAATTTGGAAATACCTTCTATAGGGCTGCTACTAAAAATTTCAATC  
 CATATATGGCAATGGCTGCAAAAACAGTTATAGTTGAAGCAGAAAATTTAGTTAAATGTGAAGATTTAAAA  
 AGAGATGCCATAATGACTCTGGCGTATTAGTAGATTATATCGTTAAGGAGGCGGCTTAATTGATTGTAGA  
 TAAAGTTTTAGCAAAAGAGATAATTGCCAAAAGAGTTGCAAAAAGAACTAAAAAAGACCAACTCGTAAAC  
 CTTGGAATAGGACTTCCAACCTTAGTAGCAAATATGTACAAAAGAAATGAACATTACTTTTGAATCAGAA  
 AATGGCATGGTTGGTATGGCACAAATGGCATCATCAGGTGAAAATGACCCAGATATAATAAATGCTGGCG  
 GGAATATGTAACATTATTACCTCAAGGTTCATTTTTATAGTTCAATGTCTTTTCGCACTAATACGAGGAG  
 GACATGTTGATGTTGCTGTTCTTGGTGTCTAGAAGTTGATGAAAAAGGTAATTAGCTAACTGGATTGTTT  
 CAAATAAATTTGCCAGGATGGGTGGCGCTATGGATTAGCAATAGGCGCAAAAAAATAATAGTGGC  
 AATGCAACATACAGGAAAAAGTAAACCTAAAATCGTTAAAAAATGACTCTCCCACTTACTGCTAAGGCTC  
 AAGTGGATTTAATTGTACAGAATTTGTGTAATTGATGTAACAAATGACGGCTACTTTTAAAAGAAATTC  
 ATAAAGATACAACATTGATGAAAATAAATTTTTAACAATGACAGATGCAATTTAATTATCCAGATAACTAAAGA  
 TTATGGATATGAATCATTCTATTTTAAATATATAACTTTAAAAATCTTATGTATTAATAAATAAGAAAGA  
 GTTGATTGTTTTATGTTAGAAAAGTGAAGTATCTAAACAAATTACAACCTCCACTTGCTGCTCCAGCGTTTCT  
 AGAGGACCATATAGGTTTCACAATAGAGAATATCTAAACATTATTTATCGAACTGATTTAGATGCTCTTCGA  
 AAAATAGTACCAGAGCCACTTGAATTAGATAGAGCATATGTTAGATTTGAAATGATGGCTATGCCTGATAC  
 AACCGGACTAGGCTCATATACAGAATGTGGTCAAGCTATTCCAGTAAAAATATAATGGTGTAAAGGGTACT  
 ACTTGCATATGATGTATCTAGATAATGAACCTGCTATTGCTGTTGGAAGAGAAAGTAGCGCTTATCCAAA  
 AAGCTTGGCTATCCAAAGCTATTTGTTGATTCAGATACTTTAGTTGGGACACTTAAATATGGTACATTACCA  
 GTAGCTACTGCAACAATGGGATATAAGCACGAGCCTCTAGATCTTAAAGAAGCCTATGCTCAAATGCAAG  
 ACCCAATTTTATGCTAAAAATCATTCAAGGTTACGATGGTAAGCCAAGAATTTGTGAACATAATGTGCAG  
 AAAATACTGATATAACTATTCACGGTGTGGACTGGAAGTGCACGTCTACAATTTTAGCCATGCACTAG  
 CTCCTCTGCTGATTTACCTGTATTAGAGATTGTATCAGCATCTCATATCCTCACAGATTTAACTCTTGAAC  
 ACCTAAGGTTGTACATGATTATCTTTCAGTAAAATAAAGCAATATAGAGGATCCTCTAGAGTCGACGTCA  
 CGCGTCCATGGAGATCTCGAGGCTGCAGACATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGA  
 CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAG  
 CGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTAGCATAAA  
 AATAAGAAGCCTGCATTTGCAGGCTTCTATTTTTATGGCGCGCCGATTCACCTCTTTCTATATAAATATG  
 AGCGAAGCGAATAAGCGTCGGAAGCAGCAAAAAGTTTCTTTTTGCTGTTGGAGCATGGGGGTTTCAGG  
 GGGTGCAGTATCTGACGTCAATGCCGAGCGAAAAGCGAGCCGAAGGGTAGCATTTACGTTAGATAACCCCC  
 TGATATGCTCCGACGCTTATATAGAAAAGAAGATCAACTAGGTAAAATCTTAATATAGGTTGAGATGAT  
 AAGGTTTATAAGGAATTTGTTTGTCTAATTTTCACTCATTTTGTCTAATTTCTTTTAAACAATGTTCTTTT  
 TTTTAGAACAGTTATGATATAGTTAGAATAGTTAAAATAAGGAGTGAGAAAAAG

**Figura 34**

ATGAATAAATTAGTAAAATTAACAGATTTAAAGCGCATTTTCAAAGATGGCATGACAATTATGGTTGGGGG  
 TTTTTAGATTGTGGAACCTCTGAAAATATTATAGATATGCTAGTTGATTTAAATATAAAAAATCTGACTATT  
 ATAAGCAATGATACAGCTTTTCTAATAAAGGAATAGGAAAACCTTATTGTAATGGTCAAGTTTCTAAAGT  
 AATTGCTTACACATATTGGAACCTAATCCTGAACTGGAAAAAATGAGCTCTGGAGAACTTAAAGTTGAGC  
 TTCCCCACAAGGAACACTGATTGAAAGAATTCGTGCAGCTGGATCTGGACTCGGAGGTGATTAACCTCA  
 ACTGGACTTGAACTATCGTTGAAGAAGGTAAGAAAAAAGTACTATCGATGGCAAAGAATATCTATTAGA  
 ACTTCTTTTACTGCTGATGTTTCATTAATAAAAAGGTAGCATTGTAGATGAATTTGAAATACCTTCTATAGG  
 GCTGCTACTAAAAATTTCAATCCATATATGGCAATGGCTGCAAAAACAGTTATAGTTGAAGCAGAAAATTT  
 AGTTAAATGTGAAGATTTAAAAAGAGATGCCATAATGACTCCTGGCGTATTAGTAGATTATATCGTTAAGG  
 AGGCGGCTTAATTGATTGTAGATAAAGTTTTAGCAAAAGAGATAATTGCCAAAAGAGTTGCAAAAAGAACT  
 AAAAAAAGACCAACTCGTAAACCTTGAATAGGACTTCCAACCTTAGTAGCAAATTATGTACCAAAAAGAAA  
 TGAACATTACTTTTGAATCAGAAAATGGCATGGTTGGTATGGCACAATGGCATCATCAGGTGAAAAATGAC  
 CCAGATAATAAATGCTGGCGGGGAATATGTAACATTATTACCTCAAGGTTTCATTTTTTGATAGTTCAATG  
 TCTTCGCACTAATACGAGGAGGACATGTTGATGTTGCTGTTCTTGGTGCTCTAGAAGTTGATGAAAAAGG  
 TAATTTAGCTAACTGGATTGTTCCAAATAAAATTTGCCAGGATGGGTGGCGCTATGGATTTAGCAATAG  
 GCGCAAAAAAATAATAGTGGCAATGCAACATACAGGAAAAAGTAAACCTAAAATCGTTAAAAAATGTAC  
 TCTCCACTTACTGCTAAGGCTCAAGTGGATTAATTGTACAGAACTTTGTGTAATTGATGTAACAAATGA  
 CGGCTTACTTTTAAAAGAAAATTCATAAAGATACAACCTTTGATGAAATTAATTTTTAACAGATGCAGATTT  
 AATTATTCAGATAACTTAAAGATTATGGATATATGAATCATTCTATTTTAAATATATAACTTTAAAAAATCTT  
 ATGTATTAATAAATAAGAAAAGAGGTTGATTGTTTATGTTAGAAAAGTGAAGTATCTAAACAAATTACAAC  
 TCCACTTGCTGCTCCAGCGTTTCTAGAGGACCATATAGGTTTACAATAGAGAATATCTAAACATTATTTAT  
 CGAACTGATTTAGATGCTCTTCGAAAAATAGTACCAGAGCCACTTGAATTAGATAGAGCATATGTTAGATTT  
 GAAATGATGGCTATGCCTGATACAACCGGACTAGGCTCATATACAGAATGTGGTCAAGCTATTCCAGTAAA  
 ATATAATGGTGTTAAGGGTGACTACTTGCATATGATGTATCTAGATAATGAACCTGCTATTGCTGTTGGAA  
 GAGAAAGTAGCGCTTATCCAAAAAAGCTTGGCTATCCAAAGCTATTTGTTGATTAGATACTTTAGTTGGG  
 AACTTAAATATGGTACATTACCAGTAGCTACTGCAACAATGGGATATAAGCACGAGCCTCTAGATCTTAA  
 AGAAGCCTATGCTCAAATGCAAGACCCAATTTTATGCTAAAAATCATTCAAGGTTACGATGGTAAGCCAA  
 GAATTTGTGAACTAATATGTGCAGAAAATACTGATATAACTATTACCGGTGCTTGGACTGGAAGTGCACGT  
 CTACAATTTTAGCCATGCACTAGCTCCTCTTGTGATTTACCTGTATTAGAGATTGTATCAGCATCTCATA  
 TCCTCACAGATTTAACTCTTGGAACACCTAAGGTTGTACATGATTATCTTTCAGTAAAATAA

**Figura 35**

ATGAAAGAAAGATATGGAACAGTCTATAAAGGCTCTCAGAGGCTCATAGACGAAGAAAGTGGAGAAGTC  
 ATAGAGGTAGACAAGTTATACCGTAAACAAACGCTCTGGTAACTTCGTAAAGGCATATATAGTGAATTAAT  
 AAGTATGTTAGATATGATTGGCGGAAAAAATCTAAAATCGTAACTATATCCTAGATAATGTCCACTTAAAG  
 TAACAATACAATGATAGCTACAACAAGAGAAAATAGCAAAAAGCTACAGGAACAAGTCTACAAACAGTAATA  
 ACAACACTTAAATCTTAGAAGAAGGAAATATTATAAAAAGAAAACTGGAGTATTAATGTTAAACCCCTGA  
 ACTACTAATGAGAGGCGACGACCAAAAAACAAAAATACCTCTTACTCGAATTTGGGAACCTTGAGCAAGAG  
 GCAAATGAAATAGATTGACCTCCAATAACACCACGTAGTTATTGGGAGGTCAATCTATGAAATGCGATTA  
 AGGGCCGGCCAGTGGGCAAGTTGAAAAATCACAAAAATGTGGTATAATATCTTTGTTTATTAGAGCGATA  
 AACTTGAATTTGAGAGGGAACCTTAGATGGTATTTGAAAAAATGATAAAAAATAGTTGGAACAGAAAAGAG  
 TATTTTGACCACTACTTTGCAAGTGTACCTGTACCTACAGCATGACCGTTAAAGTGGATATCACACAAATA  
 AAGGAAAAGGGAATGAACTATATCCTGCAATGCTTTATTATATTGCAATGATTGTAAACCGCCATTGAGA  
 GTTTAGGACGCAATCAATCAAGATGGTGAATTGGGGATATATGATGAGATGATACCAAGCTATACAATA  
 TTTACAATGATACTGAAACATTTTCCAGCCTTTGGACTGAGTGAAGTCTGACTTTAAATCATTTTTAGCAG  
 ATTATGAAAGTGATACGCAACGGTATGGAAACAATCATAGAATGGAAGGAAAGCCAAATGCTCCGGAAAA  
 CATTTTTAATGTATCTATGATACCGTGGTCAACCTTCGATGGCTTTAATCTGAATTTGCAGAAAAGGATATGA  
 TTATTTGATTCCTATTTTTACTATGGGGAAATATTATAAAGAAGATAACAAAAATTATACTTCTTTGGCAATT  
 CAAGTTCATCACGCAGTATGTGACGGATTTACATTTGCCGTTTTGTAACGAATTGCAGGAATTGATAAAT

**Figura 35 continuación**

AGTTAACTTCAGGTTTGTCTGTAACATAAAAAACAAGTATTTAAGCAAAAAACATCGTAGAAATACGGTGTITTT  
 TGTTACCCTAAGTTTAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTG  
 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTT  
 GCAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGA  
 AGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCAC  
 TCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGC  
 GATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAA  
 CGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA  
 GCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCG  
 AACAGGAGAGCGCAGGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCCG  
 CACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCA  
 ACGCGGCTTTTTACGGTCTCTGGCCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGAT  
 TCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAG  
 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAGGGCCCTGCAGGATAAAAAAATTGTA  
 GATAAATTTTATAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTTATCAGGAAACAGCTATGACCGCGCCGAGATAG  
 TCATAATAGTCCAGAATAGTTCAATTTAGAAATTAGACTAACTTCAAATGTTTGTAAATATATACCAAA  
 CTAGTATAGATATTTTTAAATACTGGACTTAAACAGTAGTAATTTGCCTAAAAAATTTTTCAATTTTTTTA  
 AAAAATCCTTTCAAGTTGTACATTGTTATGGTAATATGTAATGAAGAAGTTATGTAGTAATATTGTAAC  
 GTTTCTTGATTTTTTACATCCATGTAGTGCTTAAAAACCAAATATGTCACATGCAATTGTATATTTCAA  
 TAACAATATTTATTTCTCGTTAAATTCACAAATAATTTATTAATAATATCAATAACCAAGATTACTTAAAT  
 GGATGTTATTTTTAACACTTTTATAGTAAATATATTTATTTATGTAGTAAAAAGGTTATAATTATAATTGT  
 ATTTATTACAATTAATTAATAAAAAATAGGGTTTTAGGTAAAATTAAGTTATTTAAGAAGTAATTACAA  
 TAAAAATTGAAGTTATTTCTTTAAGGAGGGAATTATTCATATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAGTGCAGTAA  
 GAACAGCGATTGGATCTTATGAAAAGTCTCTAAGGATGTACCAGCAGTAGATTTAGGAGCTACAGCTATA  
 AAGGAAGCAGTTAAAAAAGCAGGAATAAAACAGAGGATGTTAATGAAGTCATTTTAGGAAATGTTCTT  
 AAGCAGGTTTAGGACAGAATCCAGCAAGACAGGCATCTTTAAAGCAGGATTACAGTTGAAATCCAGCT  
 ATGACTATTAATAAGGTTTGTGGTTCAGGACTTAGAACAGTTAGCTTAGCAGCACAAATTATAAAAGCAGG  
 AGATGCTGACGTAATAATAGCAGGTGGTATGGAAAATATGTCTAGAGCTCCTTACTTAGCGAATAACGCTA  
 GATGGGGATATAGAATGGGAAACGCTAAATTTGTTGATGAAATGATCACTGACGGATTGTGGGATGCATT  
 TAATGATTACCACATGGGAATAACAGCAGAAAACATAGCTGAGAGATGGAACATTTCAAGAGAAGAACA  
 GATGAGTTTGTCTTGCATCACAATAAAAGCTGAAGAAGCTATAAAATCAGGTCAATTTAAGATGAAAT  
 AGTTCCTGTAGTAATTAAGGCGAGAAAGGGAGAACTGTAGTTGATACAGATGAGCACCTAGATTTGGA  
 TCAACTATAGAAGGACTTGCAAAATTAACCTGCCTTCAAAAAAGATGGAACAGTTACAGCTGGTAATGC  
 ATCAGGATTAATGACTGTGCAGCAGTACTGTAATCATGAGTGCAGAAAAAGCTAAAGAGCTTGGAGTA  
 AAACCACTTGCTAAGATAGTTTCTTATGGTTCAGCAGGAGTTGACCCAGCAATAATGGGATATGGACCTT  
 CTATGCAACAAAAGCAGCTATTGAAAAGCAGGTTGGACAGTTGATGAATTAGATTTAATAGAATCAAATG  
 AAGCTTTTGCAGCTCAAAGTTTAGCAGTAGCAAAAAGATTTAAATTTGATATGAATAAAGTAAATGTAAT  
 GGAGGAGCTATTGCCCTTGGTCATCCAATTGGAGCATCAGGTGCAAGAATACTCGTTACTCTTGTACACGC  
 AATGCAAAAAAGAGATGCAAAAAAAGGCTTAGCAACTTTATGTATAGGTGGCGGACAAGGAACAGCAATA  
 TTGCTAGAAAAGTCTAGGAATTCGAGCTCGGTACCAGGGAGATATTAATGAATAAATTAGTAAATTA  
 ACAGATTTAAAGCGCATTTTCAAAGATGGCATGACAATTATGGTTGGGGTTTTTTAGATTGTGGAACCTCT  
 GAAAATATTATAGATATGCTAGTTGATTTAAATATAAAAAATCTGACTATTATAAGCAATGATACAGCTTTT  
 CCTAATAAAGGAATAGGAAAACCTATTGTAATGGTCAAGTTTCTAAAGTAATTGCTTCACATATTGGAAC  
 AATCCTGAAACTGGAAAAAAATGAGCTCTGGAGAACCTAAAGTTGAGCTTTCCCAAGGAACACTGAT  
 TGAAAGAATTCTGTCAGCTGGATCTGGACTCGGAGGTGATTAACCTCAACTGGACTTGGAACTATCGTTG  
 AAGAAGGTAAGAAAAAAGTTACTATCGATGGCAAGAATATCTATTAGAACTTCTTTATCTGCTGATGTTT  
 CATTAAATAAAGGTAGCATTGTAGATGAATTTGAAAAACCTTCTATAGGGCTGCTACTAAAAATTTCAATC  
 CATATATGGCAATGGCTGCAAAAAACAGTTATAGTTGAAGCAGAAAAATTTAGTTAAATGTGAAGATTTAAA  
 AGAGATGCCATAATGACTCCTGGCGTATTAGTAGATTATATCGTTAAGGAGGCGGCTTAATTGATTGTAGA  
 TAAAGTTTTAGCAAAAGAGATAATTGCCAAAAGAGTTGCAAAAAGAACTAAAAAAGACCAACTCGTAAAC

**Figura 35 continuación**

CTTGAATAGGACTTCCAACCTTTAGTAGCAAATTATGTACCAAAAAGAAATGAACATTACTTTTGAATCAGAA  
 AATGGCATGGTTGGTATGGCACAAATGGCATCATCAGGTGAAAAATGACCCAGATATAATAAATGCTGGCG  
 GGAATATGTAACATTATTACCTCAAGGTTCATTTTTGGATAGTTCAATGTCTTTGCACTAATACGAGGAG  
 GACATGTTGATGTTGCTGTTCTGGTGCTCTAGAAGTTGATGAAAAAGGTAATTTAGCTAACTGGATTGTT  
 CAAATAAAATTGTCCAGGTATGGGTGGCGCTATGGATTTAGCAATAGGCGCAAAAAATAATAGTGGC  
 AATGCAACATACAGGAAAAAGTAAACCTAAAATCGTTAAAAATGACTCTCCACTTACTGCTAAGGCTC  
 AAGTGGATTTAATTGTACAGAACTTTGTGTAATTGATGTAACAAATGACGGCTTACTTTTAAAGAAATTC  
 ATAAAGATACAACTATTGATGAAATTAATTTTTAACAGATGCAGATTTAATTATTCCAGATAACTTAAAGA  
 TTATGGATATATGAATCATTCTATTTTAAATATAACTTTAAAAATCTTATGATTTAAAAACTAAGAAAAGA  
 GGTTGATTGTTTTATGTTAGAAAGTGAAGTATCTAAACAAATTACAACCTCCACTTGTGCTCCAGCGTTTCT  
 AGAGGACCATATAGGTTTACAATAGAGAATATCTAACATTATTTATCGAACTGATTTAGATGCTCTTCGA  
 AAAATAGTACCAGAGCCACTTGAATTAGATAGAGCATATGTTAGATTTGAAATGATGGCTATGCCTGATAC  
 AACCGGACTAGGCTCATATACAGAATGTGGTCAAGCTATTCCAGTAAAAATAATGGTGTAAAGGGTGACT  
 ACTTGCATATGATGTATCTAGATAATGAACCTGCTATTGCTGTTGGAAGAGAAAAGTAGCGCTTATCCAAAA  
 AAGCTTGGCTATCCAAGCTATTTGTTGATTAGATACTTTAGTTGGGACTTAAATATGGTACATTACCA  
 GTAGCTACTGCAACAATGGGATATAAGCACGAGCCTCTAGATCTTAAAGAAGCCTATGCTCAAATGCAAG  
 ACCCAATTTTATGCTAAAAATCATTCAAGGTTACGATGGTAAGCCAAGAATTTGTGAATAATATGTGCAG  
 AAAATACTGATATAACTATTCACGGTGCTTGGACTGGAAGTGCACGTCTACAATTTTATAGCCATGCACTAG  
 CTCCTCTTGCTGATTTACCTGTATTAGAGATTGTATCAGCATCTCATATCCTCACAGATTTAACTCTTGGAAC  
 ACCTAAGGTTGTACATGATTATCTTTCAGTAAAAATAAAGCAATATAGAGGATCCTCTAGAGTCGACTTAG  
 GAGGTTCTATTATGAAAGTTTTGCAATGTTAGGTTAACAATAAGGATGGATTGAAAAGAAAAACCA  
 GTGCCAGGTCCTTATGATGCGATTGTACATCCTCTAGCTGTATCCCATGTACATCAGATATACATACGGTT  
 TTTGAAGGAGCACTTGGTAAATAGGGAAAATATGATTTTAGGCCATGAAGCTGTAGGTGAAATAGCCGAAG  
 TTGGCAGCGAAGTTAAAGATTTTAAAGTTGGCGATAGAGTTATCGTACCATGCACAACACCTGACTGGAGA  
 TCTTTAGAAGTCCAAGCTGGTTTTAGCAGCATTCAAACGGTATGCTTGCAGGATGGAAGTTTTCCAATTTT  
 AAAGATGGTGTATTTGCAGATTACTTTTATGTAACGATGCAGATATGAATCTTGCATACTCCAGATGAA  
 ATACCTTTAGAAAAGTCAAGTTATGATGACAGACATGACTACTGGTTTTTATGAGGAGAACTGGCAGAA  
 CATAAAAAATGGGCTCCAGGCTTGTAGTAATTGGTATAGGAGCTGTTGGATTAATGGGAATAGCCGTTCCA  
 AACTTCGAGGAGCAGGCAGAATTATCGGTGTTGGAAGCAGACCTGTTGTGTTGAAACAGCTAAATTTTAT  
 GGAGCAACTGATATTGTAATATAAAAAATGGTATATAGTTGAACAAATCATGGACTTAACTCATGGTAA  
 AGGTGTAGACCGTGAATCATGGCAGGCGGTGGTGTGAAACACTAGCACAAGCAGTAACTATGGTTAAA  
 CCTGGCGGCGTAATTTCTAACATCAACTACCATGGAAGCGGTGATACTTTACCAATACCTCGTGTCAATGG  
 GGCTGCGGCATGGCTCACAAAATAAGAGGAGGATTATGCCCGGCGGACGTCTTAGAATGGAAATGC  
 TAAGAGATCTGTTCTATATAAACGTGTTGATTTGAGTAACTTGTACTCATGTATTTGATGGTGCAGAAA  
 ATATTGAAAAGGCCCTTTTGTCTTATGAAAAATAAGCCAAAAGATTTAATTAATCAGTAGTTACATTTCTAAA  
 AATTCATATAAAAAACTGTGCGATTAAAAAAATGTCTCGAGGCTGACAGCATGCAAGCTTGGCACTGGC  
 CGTCTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCAGCACATCCCC  
 TTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGACCGATCGCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATG  
 GCGAATGGCGCTAGCATAAAAAATAAGAAGCCTGATTTGCAGGCTTCTTATTTTATGGCGCGCCGATTC  
 ACTTCTTTTCTATATAAATATGAGCGAAGCGAATAAGCGTCGAAAAGCAGCAAAAAGTTTCTTTTTGCTG  
 TTGGAGCATGGGGTTTCAAGGGGTGCAATGCTGACGTCAATGCCGAGCGAAAAGCGAGCCGAAGGGTAG  
 CATTTACGTTAGATAACCCCTGATATGCTCCGACGCTTATATAGAAAAGAAGATTCAACTAGGTAAAATC  
 TTAATATAGGTTGAGATGATAAGGTTTATAAGGAATTTGTTTGTCTAATTTTCACTCATTTTGTCTAATTT  
 CTTTTAACAAATGTTCTTTTTTTTTTAGAACAGTTATGATATAGTTAGAATAGTTTAAATAAGGAGTGAGA  
 AAAAG

**Figura 36**

GTTTGCCACCTGACGTCTAAGAAAAGGAATATTCAGCAATTTGCCCGTGCCGAAGAAAGGCCACCCGTGA  
 AGGTGAGCCAGTGAGTTGATTGCTACGTAATTAGTTAGCCCTTAGTGACTCGTAATACGACTCACTAT  
 AGGGCTCGAGGCGCCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTATTAGGCCACCCAGGCTTACAC  
 TTTATGCTCCGGCTGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACACATATGTT  
 TCCGTGCAATGCCATATATCGAATATGGTGATAAAAAATGAAACAGCTTTATCGAAGATGTGGAACAGATCT  
 ACAACTTCATTA AAAAGAACATTGATGTGGAAGAAAAGATGCATTTTCATTGAAACCTATAAACAGAAAAGC  
 AACATGAAGAAAGAGATTAGCTTTAGCGAAGAATACTATAAACAGAAAGATTATGAACGGCAAAAATGGCG  
 TTGTGTACACCCCGCCGAAATGGCGGCCCTTTATGGTTAAAAATCTGATCAACGTTAACGATGTTATTGGC  
 AATCCGTTTATTA AAAATCATTGACCCGAGCTGCGGTAGCGGCAATCTGATTTGCAAATGTTTTCTGTATCTG  
 AATCGCATCTTTATTAAGAACATTGAGGTGATTAACAGCAAAAATAACCTGAATCTGAAACTGGAAGACAT  
 CAGCTACCACATCGTTCGCAACAATCTGTTTGGCTTCGATATTGACGAAACCCGATCAAAGTGCTGAAAA  
 TTGATCTGTTTCTGATCAGCAACCAATTTAGCGAGAAAAATTTCCAGGTTAAAGACTTTCTGGTGGAAAATA  
 TTGATCGCAAATATGACGTGTTTCATTGGTAATCCGCGGTATATCGGTCACAAAAGCGTGGACAGCAGCTAC  
 AGCTACGTGCTGCGCAAAATCTACGGCAGCATCTACCGCGACAAAGCGGATATCAGCTATTGTTTCTTTCA  
 GAAGAGCCTGAAATGTCTGAAGGAAGGTGGCAAACTGGTGTGTTGTGACCGAGCCGCTACTTCTGCGAGAGC  
 TGCAGCGTTAAAGAACTGCGTAAATTCCTGATCGAAAAACAGCAGCATTTACAAGATCATTGATTTTTACGG  
 CATCCGCCGTTCAAACGCGTGGGTATCGATCCGATGATTATTTTTCTGGTTCGTACGAAGAACTGGAACA  
 ATAACATTGAAATTATTCGCCGAACAAGATTGAAAAGAACGAAAAGAACAATTCCTGGATAGCCTGTTT  
 CTGGACAAAAGCGAAAAGTGTAAAAAGTTTAGCATTAGCCAGAAAAGCATTAAACGATGGCTGGGTTT  
 TCGTGGACGAAGTGGAGAAAAACATTATCGACAAAATCAAAGAGAAAAGCAAGTTCATTCTGAAAGATAT  
 TTGCCATAGCTGTCAAGGCATTATCACCGGTTGTGATCGCGCCTTTATTGTGGACCGTGATATCATCAATAG  
 CCGTAAGATCGAACTGCGTCTGATTAACCGTGGATTA AAAAGCAGCCATATCCGTAAGAATGAAGTTATTA  
 AGGGCGAAAAATTCATCATCTATAGCAACCTGATTGAGAATGAAACCGAGTGTCGAATGCGATTAATAT  
 ATCGAACAGTACAAGAAACGCTCTGATGGAGCGCCGCAATGCAAAAAGGGCACGCGTAAGTGGTATGAA  
 CTGCAATGGGGCCGTA AACCGGAAATCTTCAAGAAAAGAAAATGTTTTCCCGTATAAAAAGCTGTGACAA  
 TCGTTTTGCACTGGATAAGGGTAGCTATTTTAGCGCAGACATTTATAGCCTGGTTCTGAAGAAAAATGTGC  
 CGTTCACCTGGAGACTCTGAAATACCTGAATACCGCCGCTGACGAGTTTTACTTTAAGACCTTCGCGA  
 AAAAGCTGGGCGAGAATCTGTACGAGTACTATCCGAACAACCTGATGAAGCTGTGCATCCCGAGCATCGA  
 TTTCCGGCGTGAGAACAATATTGAGAAAAAGCTGTATGATTTCTTTGGTCTGACGGATAAAGAAAATTGAGA  
 TTGTGGAGAAGATCAAAGATAACTGCTAAGAAATTCGATATCACCCGGGAACTAGTCTGCAGCCCTTAGTG  
 AGGGTTAATTGGAGTCACTAAGGGTTAGTTAGTTAGATTAGCAGAAAGTCAAAGCCTCCGACCGGAGGC  
 TTTGACTAAAACCTCCCTTGGGGTTATCATTGGGGCTCACTCAAAGGCGGTAATCAGATAAAAAAATCCT  
 TAGCTTTGCTAAGGATGATTTCTGCTAGAGATGGAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGAC  
 CACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT  
 CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGA  
 GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA  
 ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAG  
 GTGAAGATCCTTTTGAATCTCATGACCAAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGAC  
 CCCTTAATAAGATGATCTTCTGAGAGTCTTTGGTCTGCGCGTAATCTCTTGTCTGAAAACGAAAAAAC  
 GCCTTGCAAGGGCGTTTTTTCGAAGGTTCTCTGAGCTACCAACTTTGAACCGAGGTAACCTGGCTTGAGG  
 AGCGCAGTACCAAAAATCTGCTTTTCTGTTAGCCTAACCGGCGCATGACTTCAAGACTAACTCCTCTAA  
 ATCAATTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGTGCTTTTGCATGTCTTTCCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTAC  
 CGGATAAGGCGCAGCGGTGCGACTGAACGGGGGGTTGCTGCATACAGTCCAGCTTGGAGCGAACTGCCT  
 ACCCGAACTGAGTGTGAGCGTGAATGAGACAAACCGGCCATAACAGCGGAATGACACCGGTAAAC  
 CGAAAGGACGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCCGAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTG  
 TCGGGTTTTCCGACCACTGATTTGAGCGTACGATTTCTGTGATGCTTGTGAGGGGGGGCGGAGCCTATGGAA  
 AAACGGCTTTGCCGCGGCCCTCTCACTTCCCTGTTAAGTATCTTCTGGCATCTTCCAGGAAATCTCCGCCCC  
 GTTCTGAAGCCATTTCCGCTCGCCGAGTCGAACGACCGAGCGTAGCGAGTCAAGTGTGAGCGGGAAGCGGA  
 ATATATCCTGTATCACATACTGTGCTGACGCACCGGTGACGCTTTTTTCTCCTGCCACATGAAGCACTTAC  
 TGACACCCTCATCAGTGCCAACATAGTAAGCCAGTATACACTCCGCTAGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAG

**Figura 36 continuación**

AAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCCGAATCGCCCCATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTT  
GATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGATTTTGAACTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGT  
TGTCGGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAGTTTCGATTTATTCAACAAAGCCACGTTGTGT  
CTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACA  
TAAACAGTAATAACAAGGGGTGTTTACTAGAGGTTGATCGGGCACGTAAGAGGTTCCAACCTTACCATAAT  
GAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGA  
GAAAAAATCACGGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTT  
AGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGA  
AAAAAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTCTTGCCCGCCTGATGAACGCTCACCCGGAGTTTC  
GTATGGCCATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATCTGGGATAGTGTTCACCCCTGTTACACCGTTTTCCATGAG  
CAAACTGAAACGTTTTCTGCCCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTTCTCCACATATATTCCG  
CAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTATTGAGAATATGTTTTTGTCT  
TCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTTCTCGCCCC  
GTTTTACGATGGGCAAAATATTATCGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATCCAGGTTTCATCA  
TGCCGTTTGATGGCTTCCATGTCCGGCCGATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGTGATGAGTGGCAGG  
GCGGGGCGTAATAACTAGCTCCGGCAAAAAACGGGCAAGGTGTCACCACCTGCCCTTTTTCTTAA  
ACCGAAAAGATTACTTCGC

**Figura 37**

GCGGCCGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCC  
GGCTCGTATGTTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACACAT

**Figura 38**

TTATAAGAAATCCTAAGGAATATGATGTAATGAGTAAAGCTATAAATCCTTATGGAGATGGCAAGGCAGCT  
TATAGAATAACAGAAGCTATTTTACAATATTTTGAATTTAGCAAAAGGTACATATAGTGAGTTAAATCAAAT  
TAAAAAGTTATAATTTTCAATTTTCACTTTTTAAAGGAGATTAGCATACATTTTATCATAATTATACAGAC  
AATATAGTAATATATGATGTTAAAATATCAATATATGGTTAAAATCTGTATTTTTTCCATTTTAATTATT  
TGACTATAATATTACACTGAGTGTATTGTATATTTAAAAATATTTGGTACAATTAGTTAGTTAAATAAATT  
CTAAATTGTAATTATCAGAATCCTTATTAAGGAAATACATAGATTTAAGGAGAAATCATAAAAAGGTGTA  
ATATAAACTGGCTAAAATTGAGCAAAAATTGAGCAATTAAGACTTTTTGATTGTATCTTTTTATATTTAAG  
GTATATAATCTTATTTATTTGGGGAACTTGATGAATAAACATATTCTAGAC

**Figura 39**

TAATTTTTGTGTCAATAATTTTTGTTATATTATTTAATTAATTTTTTACATGTATAAATAAAAGTAAGATA  
GATATTCTAATGTACTTACTTAGGTAGAAAAACATGTATACAAAATTAATAAATACTATTATAACACATAGTAT  
CAATATTGAAGGTAATACTGTTCAATATCGATACAGATAAAAAAATATATAATACAGAAGAAAAAATTATA  
AATTTGTGGTATAATATAAAGTATAGTAATTTAAGTTAAACCTCGTAAAAACGCTAACAAATAATAGGAG  
GTGATTTAT

**Figura 40**

ATAGTATAACTTTAAAAAAGTCTTAAAAAGTTGTTATATAAAAAATGTTGACAATTAACAGCTATTTAG  
TGCAAAACAACCATAAAAAATTTAAAAAATACCATAAATTACTTGAAAAATAGTTGATAATAATGTAGAGTTA  
TAAACAAAGGTGAAAAGCATTACTTGTATTCTTTTTATATATTATAAATTAATTAAGCTGTATTAGA  
AAAAATACACACCTGTAATATAAAAAATTTAAATTAATTTTTAATTTTTCAAAATGTATTTACATGTTTAGAA  
TTTTGATGTATATTAATAAGTAGAATACATAAGATACTTAATTTAATTAAGATAGTTAAGTACTTTTCAAT  
GTGCTTTTTAGATGTTAATACAAATCTTAAATGTAAGAAATGCTGTACTATTTACTGTACTAGTGACG  
GGATTAACTGTATTAATTAATAAAAAATAAGTACAGTTGTTAAATTTATATTTGTATTAATCTAAT  
AGTACGATGAAGTTATTTTATACTATTGCTAGTTAATAAAAAAGATTTAATTTATATACTTGAAAAGGAGAG  
GAATTTTTATGCGTAAA

Figura 41

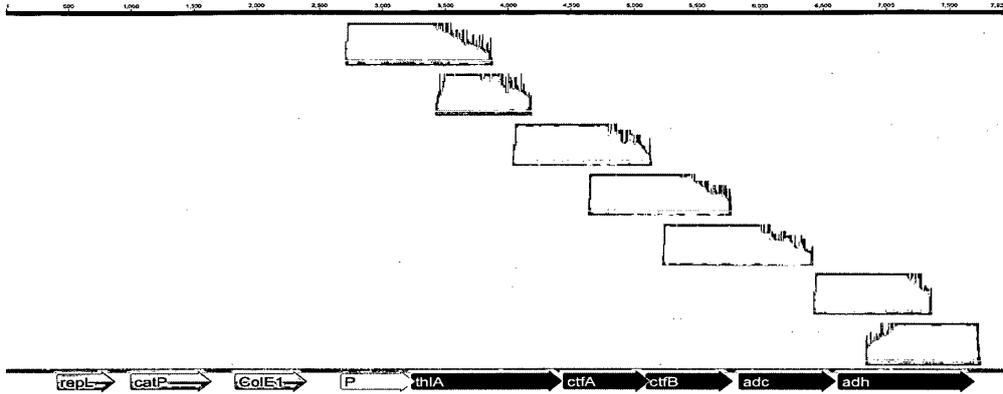


Figura 42

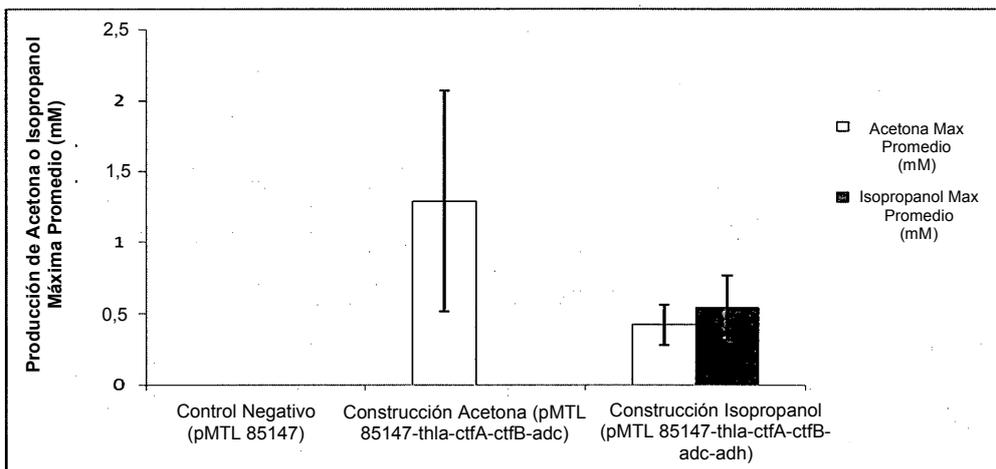
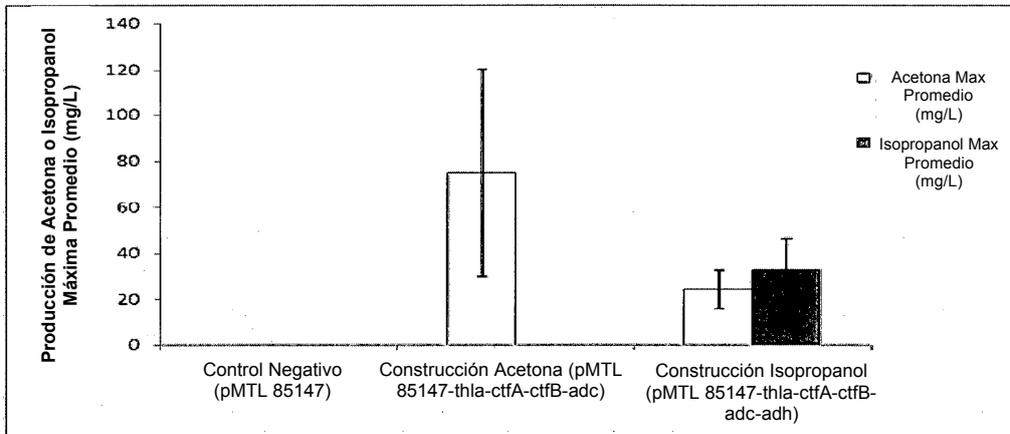


Figura 43

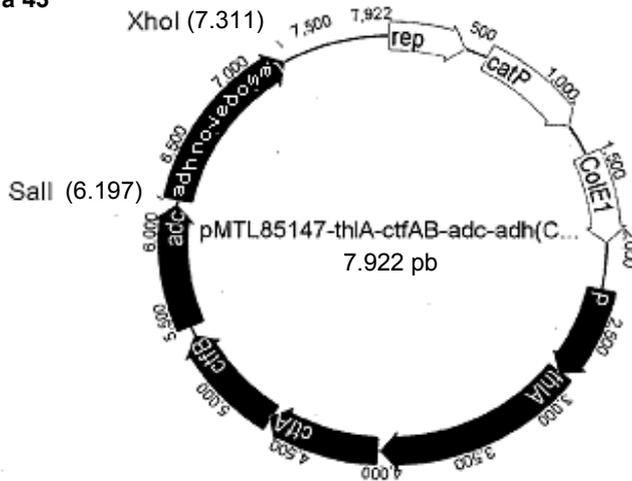


Figura 44

AGATAGTCATAATAGTTCAGAATAGTTTAAATTTAGCATTGGATTAAATCCCATATGTTTGTTAAATATAT  
ACCAAAC TAGTATAGATATTTTTAAATACTGACTTAAACAGTAGTAATTTACGTAAAAAATTTTTGATT  
TTTTAAAAAAGTCCTTTTCAAGTTGTACATTATTATGGTAATATGTAATTGAAGAAGTTGTGTAGTAATATT  
GTAACGTTTCTTAATTTATTTTCATCCATGTAGTGCTTAAAAAACCAAAATATGTCACACGCAATTGCATAT  
TTCAAACAATAATTTATTTCTCGTTAAATTCACAAATAATTTATTAATAATCAATAACCAAGATTATAC  
TAAATGGATGTTTATTTTTAACATTTTTATAGTAAATATATTTATTTATGTAGTAAAAAGGTTATAATTA  
TAATTGTATTTATTACAATTAATTAATAAAAAAATAGGGTTTTAGGTAAAATTAAGTTATTTAAGAAGT  
AATTACAACAAAAATTGAAGTTATTTCTTTAAGGAGGGAATTATTA

Figura 45

AGATAGTCATAATAGTTCAGAATAGTTTAAATTTGAAATTGGAGTAACTTCCAATGTTTGTTAAATATA  
TACCAAAC TAGTATAGATATTTTTAAATACTAGACTTAAACAGTAGAAATTTGCCTAAAAAATTTTTAGTT  
TTTTAAAAAATCCTTTTCAAGTTGTACGTTATTATGGTAATATGTAATTGAAGAAGTTATGTAATAATTTG  
TAAACGTTTCTTAATTTTTTACATCCATGTAATGCTTAAAAGACCAAAATATGTCACATGTAATTGTATATT  
CACATAATAATTTATTTTCTTATTAATTCACAAATAATTTATTAATAATCAATAACCAAGATTATACTT  
AAATGGATGTTTATTTTTAACATTTTTATGGTAAATATATTTATTTATGTAGTAAAAAGGTTATAATTA  
ATTGTATTTATTACAATTAATTAATAAAAAAATAGGGTTTTAGGTAAAATTAAGTTATTTAAGAAGTAAT  
TACAACAAAAATTGAAGTTATTTCTTTAAGGAGGGAATTATTA

Figura 46

TTATAAGAAATCCTAAGGAATATGATGTAATGAGTAAAGCTATAAATCCTTATGGAGATGGCAAGGCAGCT  
TATAGAATAACAGAAGCTATTTTACAATATTTGATTTAGCAAAGGTACATATAGTGAGTTTAAATCAAAT  
TAAAAAGTTATAATTTTCAATTTTCATTCCTTTTAAAGGAGATTAGCATAATTTATCATAATTATACAGAC  
AATATAGTAATATATGATGTTAAATATCAATATATGGTTAAAAATCTGTATATTTTTCCCATTTTAATTATT  
TGTAATAATATTACACTGAGTGATTGTATATTTAAAAAATATTTGGTACAATTAGTTAGTTAAATAAATT  
CTAAATTGTAATATCAGAATCCTTATTAAGGAAATACATAGATTTAAGGAGAAATCATAAAAAAGGTGTA  
ATATAAATCGGCTAAAATTGAGCAAAAAATGAGCAATTAAGACTTTTTGATTGTATCTTTTTATATTTAAG  
GTATATAATCTTATTTATTTGGGGGAAC

**Figura 47**

TTATAAGAAATCCTAAGGAATATGATGTAATGAGTAAAGCTATAAATCCTTATGGAGATGGCAAGGCAGCT  
 TATAGAATAACAGAAGCTATTTTACAATATTTTGATTTAGCAAAAGGTACATATAGTGAGTTTAAATCAAAT  
 TAAAAAGTTATAATTTTGAATTTTCATTCTTTTAAAGGAGATTAGCATAACATTTTATCATAATTATACAGAC  
 AATATAGTAATATATGATGTTAAAATATCAATATATGGTTAAAAAACTGTATATTTTTCCCATTTTAATTATT  
 TGTACTATAATATTACACTGAGTGTATTGTATATTTAAAAAATATTTGGTACAATTAGTTAGTTAAATAAATT  
 CTAATTATAAATTATCAGAAACCTTATTAAGGAAATACATAGATTTAGGGAGAAATAATAAAAAGGTGTA  
 ATATAAACTGGCTAAAGTTGAGTAATTAAGACTTTTAGGTTGTATCTTTTTATATATTTAAGGTATATAATCT  
 TAGTTATATAGGGGAACTTGATGAATAAACATATTCTAGAC

**Figura 48**

TAATTTTTGTGTCAATAATTTTTGTTATATTATTTAATTAAATTTTTCACATGTATAATTTAAAGTAAGATA  
 GATATTCTAATGTACTTACTTAGGTAGAAAAACATGTATACAAAATTTAAAAACTATTATAACACATAGTAT  
 CAATATTGAAGGTAATACTGTTCAATATCGATACAGATAAAAAAATATATAATACAGAAGAAAAAATTAT  
 AAATTTGTGGTATAATATAAAGTATAGTAATTTAAGTTTAAACCTCGTGAAAACGCTAACAAATAATAGGA  
 GGTGTATTAT

**Figura 49**

TAATTTTTTATATCAATAATTTTTATTATATTATTTAATTAAATTTTTCACATGTATAATTTAAAGTAAGATA  
 GAGATAGTTAGGATATTTTAGTGCAATTTATTTAGATAAAAAATATGTATACAAGATTAGAAAAAATTATAA  
 CACATAATAGTTGCATTGAAGGTAATACTGTTCAATATCGATACAGATAAAAAAATTTATAATACAGAAGA  
 AAAAAATATAAATTTGTGGTATAATATAAAATATAATAATTTAGATTTACACCCCGTGAAAACGCTAACAAA  
 TAAATAGGGAG

**Figura 50**

ATAGTATAACTTTAAAAAACTGTCTTAAAAAGTTGTTATATAAAAAATGTTGACAATTAACAGCTATTTAG  
 TGCAAAACAACCATAAAAAATTTAAAAAATACCATAAATTACTTGAAAAATAGTTGATAATAATGTAGAGTTA  
 TAAACAAAGGTGAAAAGCATTACTTGTATTCTTTTATATATTATTATAAATTTAAATGAAGCTGTATTAGA  
 AAAAATACACACCTGTAATATAAAATTTTAAATTAATTTTTAATTTTTTCAAAATGTATTTTACATGTTTAGAA  
 TTTTGATGTATATTTAAATAGTAGAATACATAAGATACTTAATTTAATTAAGATAGTTAAGTACTTTTCAAT  
 GTGCTTTTTTAGATGTTTAATACAAATCTTAAATTGTAAGAAATGCTGTACTATTTACTGTACTAGTGACG  
 GGATTAAACTGTATTAATTATAAATAAAAAATAAGTACAGTTGTTTAAATTTATATTTTGTATTAAATCTAAT  
 AGTACGATGTAAGTTATTTTATACTATTGCTAGTTTAAATAAAAAGATTTAATTATATACTTGAAAAGGAGAG  
 GAATTTTT

**Figura 51**

ATAGAATAACTTAAAAAACTGTCTTAAAAAGCTGTTATATAAAAAATGTTAACAATTAACAGCTATTTA  
 GTGCAAAACAACCATAAAAAATTTAAAAAATACCATAAATTACTTGAAAAATAGTAGAGAATAATGTAGAGT  
 TATAAACGAAGGTGAAAAGCATTACTTGTATTCCTTTTTACAGACTATTATAAATTAAGATAAAGCTGTATT  
 AGGAAAAATGCACACCTGTAATATAAGGTTTTAAATTAATTTTTAATTTTCCCAAATGTATTTTACATGTTT  
 AGAATTTTGATGTATATTTAAATAGTAGAATACATAAGATACTTAATTTAATAAAGATAGTTAAGTACTTTT  
 CAATGTACTTTTTTAGATATTTAATACAAGTTTTAATTGTAAGAAAAATGCTGTGCTATTTACTGTACTAATG  
 GTAGTACTATATCTGTATTAATTGTATGTAAGAAAGTAAGTATAGTTATTTAAGATTATGTTTTGTATTAAATC  
 TAAATAGTACAATGTAGGTTATGTTATACTATTGCTAGTTTAAATAAAAAGATTTAATTATATACTTGAAAAG  
 GAGAGGAATTTTTATGCGTAAA

Figura 52

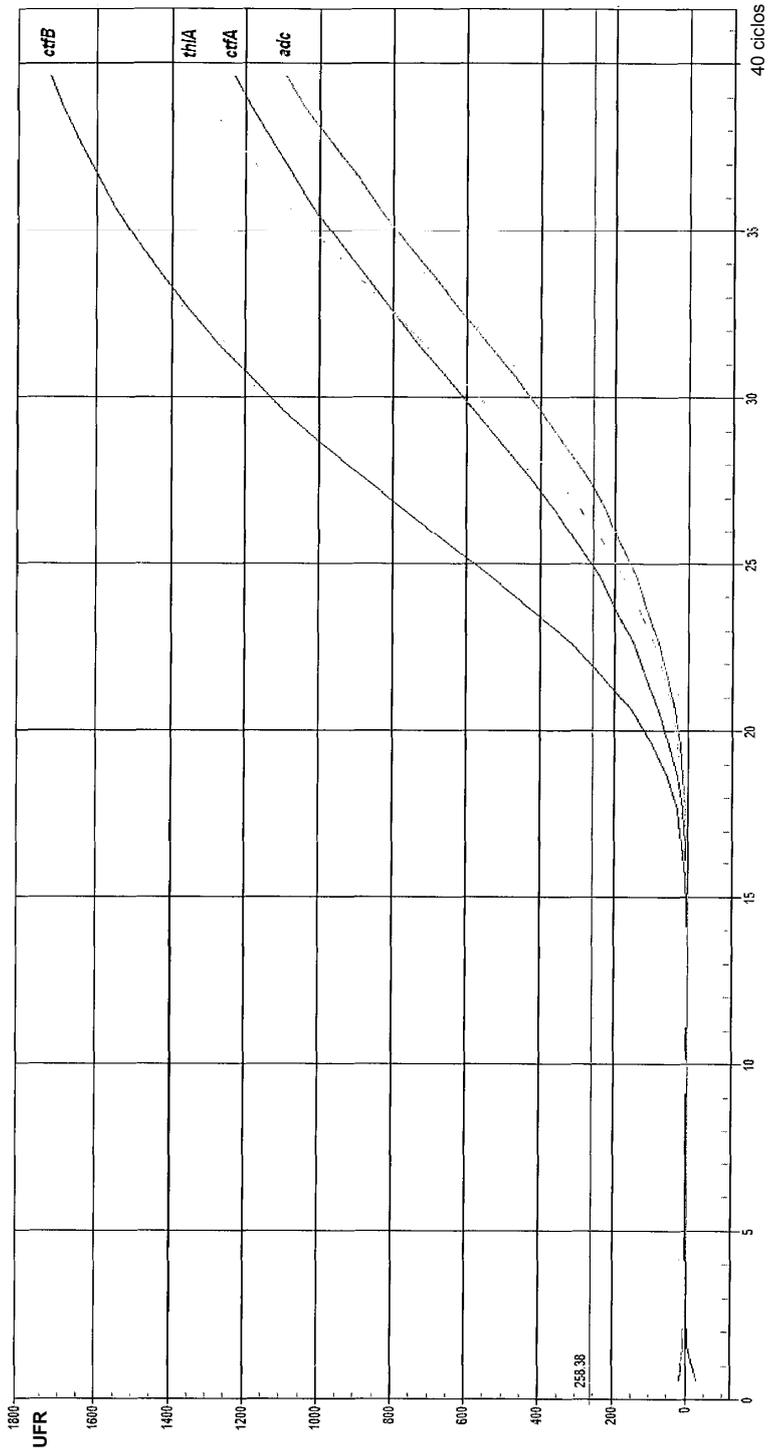
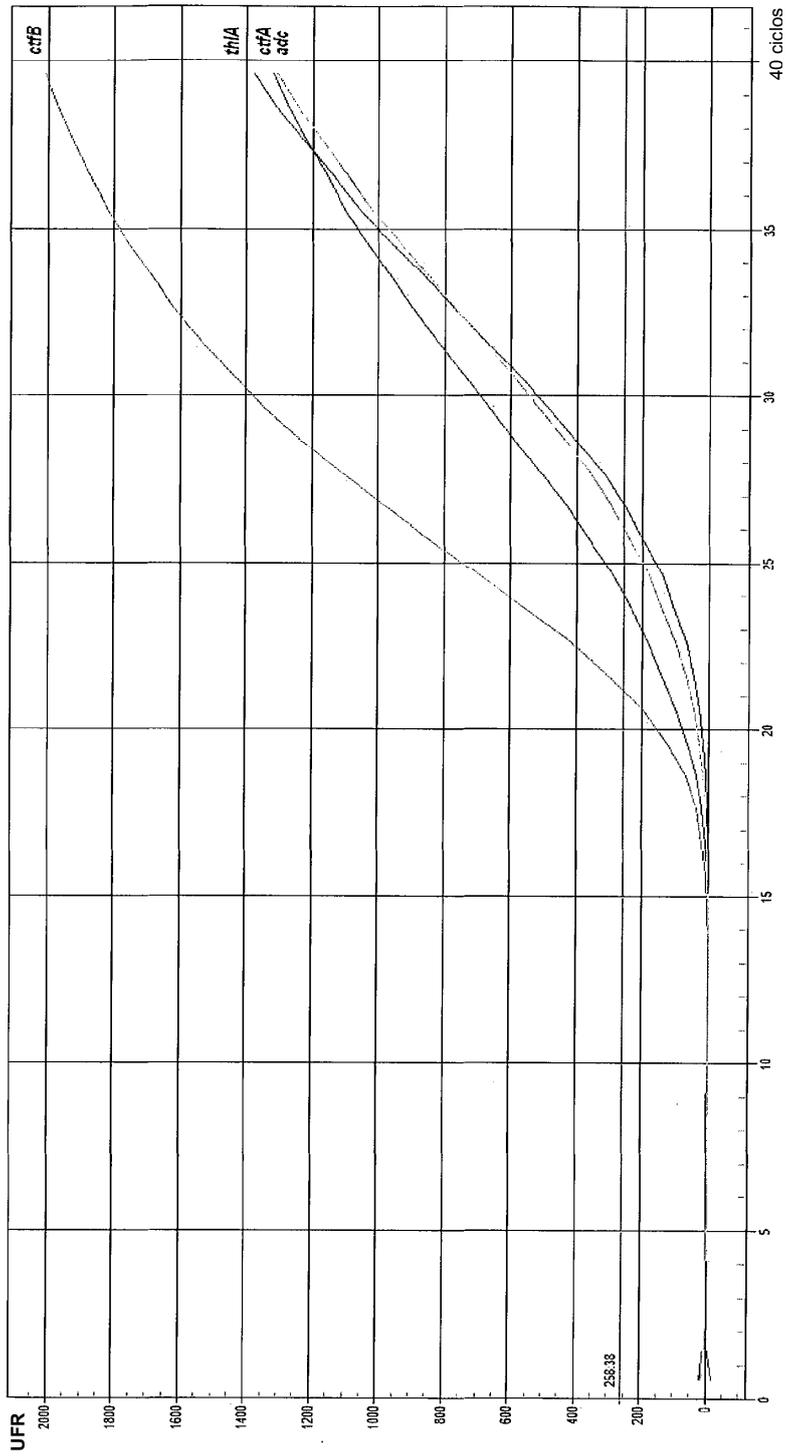


Figura 53



**FIGURA 54**

**SEQ\_ID No. 72**

ATGTATACAGTAGGAGATTACCTATTAGACCGATTACACGAGTTAGGAATTGAAGAAATTTTGGAGTCCC  
 TGGAGACTATAACTTACAATTTTATAGATCAAATTATTTCCACAAGGATATGAAATGGGTCGGAAATGCTAA  
 TGAATTAATGCTTCATATATGGCTGATGGCTATGCTCGTACTAAAAAGCTGCCGCATTTCTTACAACCTTT  
 GGAGTAGGTGAATTGAGTGCAGTTAATGGATTAGCAGGAAGTTACGCCGAAAATTTACCAGTAGTAGAAA  
 TAGTGGGATCACCTACATCAAAAGTTCAAATGAAGGAAAATTTGTTTCATCATACGCTGGCTGACGGTGAT  
 TTTAAACACTTTATGAAAATGCACGAACCTGTTACAGCAGCTCGAACTTTACTGACAGCAGAAAATGCAACC  
 GTTGAATTGACCGAGTACTTTCTGCACTATTAAGAAAAGAAAACCTGTCTATATCAACTTACCAGTTGAT  
 GTTGCTGCTGCAAAAGCAGAGAAACCTCACTCCCTTTGAAAAAGGAAAACCTCAACTTCAAATACAAGTGA  
 CCAAGAAAATTTGAACAAAATCAAGAAAGCTTGAAAAATGCCAAAAACCAATCGTGATTACAGGACATG  
 AAATAATTAGTTTTGGCTTAGAAAAACAGTCACTCAATTTATTTCAAAGACAAAACCTACCTATTACGACAT  
 TAACTTTGGTAAAAGTTCAGTTGATGAAGCCCTCCCTTCATTTTTAGGAATCTATAATGGTACTCTCAG  
 AGCCTAATCTTAAAGAATTCGTGGAATCAGCCGACTTCATCTTGATGCTTGGAGTTAAACTCACAGACTCTT  
 CAACAGGAGCCTTCACTCATCTTTAAATGAAAATAAAATGATTTCACTGAATATAGATGAAGGAAAAATA  
 TTTAACGAAAAGAAATCCAAAATTTGATTTGAAATCCCTCATCTCCTCTCTTAGACCTAAGCGAAATAGAAT  
 ACAAAGGAAAATATATCGATAAAAAGCAAGAAGACTTTGTTCCATCAAATGCGCTTTTATCACAAGACCGC  
 CTATGGCAAGCAGTTGAAAACCTAACTCAAAGCAATGAAACAATCGTTGCTGAAACAAGGGACATCATTCTT  
 TGGCGCTTCATCAATTTCTTAAAATCAAAGAGTCATTTTATTGGTCAACCCTTATGGGGATCAATTGGATAT  
 ACATTTCCAGCAGCATTAGGAAGCCAAATTCAGATAAAGAAAAGCAGACACCTTTTATTTATTGGTGATGG  
 TTCACCTCAACTTACAGTGCAAGAATTAGGATTAGCAATCAGAGAAAAAATTAATCCAATTTGCTTTATTAT  
 CAATAATGATGGTTATACAGTCGAAAGAGAAATTCATGGACCAATCAAAGCTACAATGATATTCCAATGT  
 GGAATTACTCAAATACCAGAATCGTTTGGAGCAACAGAAGATCGAGTAGTCTCAAAAATCGTTAGAAT  
 GAAAATGAATTTGTGTCTGTCATGAAAGAAGCTCAAGCAGATCCAAATAGAATGACTGGATTGAGTTAAT  
 TTTGGCAAAAAGAGGTGCACCAAAAGTACTGAAAAAATGGGCAAACTATTTGCTGAACAAAATAAATCA  
 TAA

**SEQ\_ID No. 73:**

MYTVGDYLLDRLHELGIIEIFVPGDYNLQFLDQIISHKDMKWVGNANELNASYMADGYARTKKAAFLTTFG  
 VGELSAVNGLAGSYAENLPVVEIVGSPSTKVQNEGKVFHHTLADGDFKHFMMHEPVTAARTLLTAENATVEI  
 DRVLSALLKERKPVYINLPVDVAAAKAEKPSLPLKKNSTSNSTSDQEILNKIQESLKNAKKPIVITGHEIISFLEKTV  
 TQFISKTKLPITTLNFGKSSVDEALPSFLGIYNGTLSEPNLKEFVESADFILMLGVKLTDSSTGAFTHHLNENKMISL  
 NIDEGKIFNERIQNFDLSELISSLLDLSEIEYKGYIDKKQEDFVPSNALLSQDRLWQAVENLTQSNETIVAEQGT  
 FFGASSIFLKSXSHFIGQPLWGSIGYTFPAALGSQIADKESRHLLFIGDGSLLQTVQELGLAIREKINPICFIINNDGY  
 TVEREIHGPNQSYNDIPMWNYSKLPESFGATEDRVVSKIVRTENEFVSMKEAQADPNRMYWIELILAKEGAP  
 KVLKMGKLF AEQNK\*

**FIGURA 55**

**SEQ\_ID No. 74**

ATGTCTATTCCAGAACTCAAAAAGCCATTATCTTCTACGAATCCAACGGCAAGTTGGAGCATAAGGATAT  
 CCCAGTTCCAAAGCCAAAGCCCAACGAATTGTTAATCAACGTCAGTACTCTGGTGTCTGCCACACCGATTT  
 GCACGCTTGGCATGGTGACTGGCCATTGCCAACTAAGTTACCATTAGTTGGTGGTCACGAAGGTGCCGGTG  
 TCGTTGTCCGCATGGGTGAAAACGTTAAGGGCTGGAAGATCGGTGACTACGCCGGTATCAAATGTTGAA  
 CGTTTCTGTATGGCCTGTGAATACTGTGAATTGGTAACGAATCCAACGTCCCTCACGCTGACTTGTCTGG  
 TTACACCCACGACGGTCTTTCCAAGAATACGCTACCGCTGACGCTGTTCAAGCCGCTCACATTCTCAAGG  
 TACTGACTTGGCTGAAGTCGCGCCAATCTTGTGTGCTGGTATCACCGTATACAAGGCTTTGAAGTCTGCCAA  
 CTTGAGAGCAGGCCACTGGGCGGCCATTTCTGGTGTCTGGTGGTCTAGGTTCTTTGGCTGTTCAATATG  
 CTAAGGCGATGGGTTACAGAGTCTTAGGTATTGATGGTGGTCCAGGAAAGGAAGAATTGTTTACCTCGCTC  
 GGTGGTGAAGTATTCATCGACTTCACCAAAGAGAAGGACATTGTTAGCGCAGTCGTTAAGGCTACCAACG  
 GCGGTGCCACGGTATCATCAATGTTTCCGTTTCCGAAGCCGCTATCGAAGCTTCTACCAGATACTGTAGG  
 GCGAACGGTACTGTTGTCTTGGTTGGTTGGCCAGCCGGTGCAAAGTGTCTCTGTATGTCTTCAACCAGTT  
 GTCAAGTCTATCTCATTGTGCGGCTCTTACGTGGGGAACAGAGCTGATACCAGAGAAGCCTTAGATTTCTTT  
 GCCAGAGGTCTAGTCAAGTCTCCAATAAAGGTAGTTGGCTTATCCAGTTTACCAGAAATTTACGAAAAGAT  
 GGAGAAGGGCCAAATTGCTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAA

**SEQ\_ID No. 75:**

MSIPETQKAIIFYESNGKLEHKDIPVPKPKPNELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPTKPLPLVGGHEGAGVVV  
 GMGENVKGWKIGDYAGIKWLNNGSCMACEYCELGNESNCPHADLSGYTHDGSFQEYATADAVQAAHIPQGT  
 DLAEVAPILCAGITVYKALKSANLRAGHWAAISGAAGGLGSLAVQYAKAMGYRVLIDGGPGKEELFTSLGGEV  
 FIDFTKEKDIVSAVVKATNGGAHGIINVSVSEAAIEASTRYCRANGTVVLVGLPAGAKCSSDVFHNVVKSISIVGSY  
 VGNRADTREALDFFARGLVKSPIKVVGLSSLPEIYEKMEKGQIAGRYVVDTSK\*

**Seq. ID No. 76:**

CATATGTATACAGTAGGAGATTACCTATTAGACCGATTACACGAGTTAGGAATTGAAGAAATTTTGGAGT  
 CCCTGGAGACTATAACTTACAATTTTAGATCAAATTTTCCACAAGGATATGAAATGGGTCGGAAATGC  
 TAATGAATTAATGCTTCATATATGGCTGATGGCTATGCTCGTACTAAAAAGCTGCCGATTTCTTACAAC  
 CTTTGGAGTAGGTGAATTGAGTGCAGTTAATGGATTAGCAGGAAGTTACGCCGAAAATTTACCAGTAGTA  
 GAAATAGTGGGATCACCTACATCAAAAGTTCAAAATGAAGGAAAATTTGTTTCATCATACTGCTGGCTGACGG  
 TGATTTTAAACTTTTATGAAAATGCACGAACCTGTTACAGCAGCTCGAAGCTTTACTGACAGCAGAAAATGC  
 AACCGTTGAAATTGACCGAGTACTTTCTGCACTATTAAGAAAGAAAACCTGTCTATATCAACTTACCAGT  
 TGATGTTGTCTGCTGAAAAGCAGAGAAACCTCACTCCCTTTGAAAAGGAAAACCTCAACTTCAAATACAA  
 GTGACCAAGAAATTTGAACAAAATCAAGAAAGCTTGAAAAATGCCAAAAACCAATCGTGATTACAGG  
 ACATGAAATAATTAGTTTTGGCTTAGAAAAACAGTCACTCAATTTTCAAAGACAAAACCTACCTATTAC  
 GACATTAACCTTTGGTAAAAGTTGAGTTGATGAAGCCCTCCCTTCATTTTAGGAATCTATAATGGTACT  
 CTCAGAGCCTAATCTTAAAGAATTCGTGGAATCAGCCGACTTCATCTTGTGCTTGGAGTTAACTCACAGA  
 CTCTTCAACAGGAGCCTTCACTCATCTTAAATGAAAATAAAATGATTTCACTGAATATAGATGAAGGAAA  
 AATATTTAACGAAAGAATCCAAAATTTGATTTGAATCCCTCATCTCTCTTAGACCTAAGCGAAATA  
 GAATACAAAGGAAAATATATCGATAAAAAGCAAGAAGACTTTGTTCCATCAAATGCGCTTTTATCACAAGA  
 CCGCCTATGGCAAGCAGTTGAAAACCTAACTCAAAGCAATGAAACAATCGTTGCTGAACAAGGGACATCAT  
 TCTTTGGCGCTTCATCAATTTCTTAAATCAAAGAGTCATTTTATTGGTCAACCCTTATGGGGATCAATTGG  
 ATATACATCCAGCAGCATTAGGAAGCCAAATTCAGATAAAGAAAGCAGACACCTTTTATTATTGGTG  
 ATGGTCACTTCAACTTACAGTGAAGAATTAGGATTAGCAATCAGAGAAAAATTAATCCAATTTGCTTTA  
 TTATCAATAATGATGGTTATACAGTCGAAAGAGAAATTCATGGACCAAATCAAAGCTACAATGATATTCCA  
 ATGTGGAATTACTAAAATTACCAGAATCGTTTGGAGCAACAGAAGATCGAGTAGTCTCAAAAATCGTTAG  
 AACTGAAAATGAATTTGTCTGTGTCATGAAAGAAGCTCAAGCAGATCCAAATAGAATGACTGGATTGAGT  
 TAATTTGGCAAAGAAGGTGCACAAAAGTACTGAAAAAATGGGCAAACCTATTTGCTGAACAAAATAA  
 ATCATAA

**FIGURA 56**

**Seq. ID No. 77:**

ATGTCTATTCCAGAACTCAAAAAGCCATTATCTTCTACGAATCCAACGGCAAGTTGGAGCATAAGGATAT  
 CCCAGTCCAAAGCCAAAGCCCAACGAATTGTTAATCAACGTCAAGTACTCTGGTGTCTGCCACACCGATTT  
 GCACGCTTGGCATGGTACTGGCCATTGCCAACTAAGTTACCATTAGTTGGTGGTCACGAAGGTGCCGGT  
 TCGTTGTCGGCATGGGTGAAAACGTTAAGGGCTGGAAGATCGGTGACTACGCCGGTATCAAATGGTTGAA  
 CGGTTCTGTATGGCCTGTGAATACTGTGAATTGGGTAACGAATCCAAGTCTCCTCACGCTGACTTGTCTGG  
 TTACACCCACGACGGTCTTTCCAAGAATACGCTACCGCTGACGCTGTTCAAGCCGCTCACATTCCTCAAGG  
 TACTGACTTGGCTGAAGTCGCGCCAATCTTGTGTGCTGGTATCACCGTATACAAGGCTTTGAAGTCTGCCAA  
 CTTGAGAGCAGGCCACTGGGCGGCCATTTCTGGTGTGCTGGTGGTCTAGGTTCTTTGGCTGTTCAATATG  
 CTAAGGCGATGGGTTACAGAGTCTTAGGTATTGATGGTGGTCCAGGAAAGGAAGAATTGTTTACCTCGCTC  
 GGTGGTGAAGTATTCATCGACTTCCCAAAGAGAAGGACATTGTTAGCGCAGTCGTTAAGGCTACCAACG  
 GCGGTGCCACGGTATCATCAATGTTCCGTTCCGAAGCCGCTATCGAAGCTTCTACCAGATACTGTAGG  
 GCGAACGGTACTGTTGCTTGGTTGGTTTCCAGCCGGTCAAAGTGTCTCTGATGTCTTCAACCACGTT  
 GTCAGTCTATCTCATTGTCGGCTTACGTGGGGAACAGAGCTGATACCAGAGAAGCCTTAGATTTCTTT  
 GCCAGAGGTCTAGTCAAGTCTCCAATAAAGGTAGTTGGCTTATCCAGTTTACCAGAAATTTACGAAAAGAT  
 GGAGAAGGGCCAAATGCTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAA

**Seq. ID No. 78:**

CATATGTATACAGTAGGAGATTACCTATTAGACCGATTACACGAGTTAGGAATTGAAGAAATTTTGGAGT  
 CCCTGGAGACTATAACTTACAATTTTATAGTCAAATTTTCCACAAGGATATGAAATGGGTGCGAAATGC  
 TAATGAATTAATGCTTCATATATGGCTGATGGCTATGCTCGTACTAAAAAAGCTGCCGATTTCTTACAAC  
 CTTTGGAGTAGGTGAATTGAGTGCAGTTAATGGATTAGCAGGAAGTTACGCCGAAAATTTACCAGTAGTA  
 GAAATAGTGGGATCACCTACATCAAAGTTCAAATGAAGGAAAATTTGTTTCATCATACGCTGGCTGACGG  
 TGATTTTAAACACTTTATGAAAATGCACGAACCTGTTACAGCAGCTCGAATTTACTGACAGCAGAAAATGC  
 AACCGTTGAAATTGACCGAGTACTTTCTGCACTATTTAAAAGAAAGAAAACCTGTCTATATCAACTTACCAGT  
 TGATGTTGCTGCTGCAAAAGCAGAGAAACCCTCACTCCCTTTGAAAAAGGAAAACCTCAACTCAAATACAA  
 GTGACCAAGAAATTTGAACAAAATTCAAGAAAGCTTGAAAAATGCCAAAAACCAATCGTGATTACAGG  
 ACATGAAATAATTAGTTTTGGCTTAGAAAAACAGTCACTCAATTTATTTCAAAGACAAAACCTACTATTAC  
 GACATTAACCTTTGGTAAAAGTTCAGTTGATGAAGCCCTCCCTTCAATTTTAGGAATCTATAATGGTACACT  
 CTCAGAGCCTAATCTTAAAGAATTCGTGGAATCAGCCGACTTCATCTTGATGCTTGGAGTTAAACTCACAGA  
 CTCTTCAACAGGAGCCTTCACTCATCTTAAATGAAAATAAAATGATTTCACTGAATATAGATGAAGGAAA  
 AATATTTAACGAAAAGAAATCAAAAATTTGATTTTGAATCCCTCATCTCTCTTAGACCTAAGCGAAATA  
 GAATACAAAAGGAAAATATATCGATAAAAAGCAAGAAGACTTTGTTCCATCAAATGCGCTTTTATCACAAGA  
 CCGCCTATGGCAAGCAGTTGAAAACCTAACTCAAAGCAATGAAACAATCGTTGCTGAACAAGGGACATCAT  
 TCTTTGGCGCTTCATCAATTTTCTTAAAATCAAAGAGTCAATTTATTGGTCAACCCTTATGGGGATCAATTGG  
 ATATACATTCAGCAGCATTAGGAAGCCAAATTGCAGATAAAGAAAGCAGACACCTTTTATTTATTGGTG  
 ATGGTTCACTTCAACTTACAGTGCAAGAATTAGGATTAGCAATCAGAGAAAAAATTAATCCAATTTGCTTTA  
 TTATCAATAATGATGGTTATACAGTCGAAAAGAGAAATTCATGGACCAATCAAAGCTACAATGATTTCCA  
 ATGTGGAATTACTCAAATACCAGAATCGTTGGAGCAACAGAAGATCGAGTAGTCTCAAAAATCGTTAG  
 AACTGAAAATGAATTTGTGCTGTCATGAAAGAAGCTCAAGCAGATCCAATAGAATGACTGGATTGAGT  
 TAATTTTGGCAAAAAGGAGTGCACCAAAAGTACTGAAAAAATGGGCAAACTATTTGCTGAACAAAATAA  
 ATCATAAGAATTCAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGTCTATTCCAGAACTCAA  
 AAGCCATTATCTTACGAATCCAACGGCAAGTTGGAGCATAAGGATATCCAGTTCAAAGCCAAAGCCC  
 AACGAATGTTAATCAACGTCAAGTACTCTGGTGTCTGCCACACCGATTTGCACGCTTGGCATGGTACTG  
 GCCATTGCCAACTAAGTTACCATTAGTTGGTGGTACGAAGGTGCCGGTGTGCTTGTGCGCATGGGTGAAA  
 ACGTTAAGGGCTGGAAGATCGGTGACTACGCCGGTATCAAATGGTTGAACGGTCTTGTATGGCCTGTGA  
 ATACTGTGAATTTGGTAACGAATCCAAGTCTCCTCACGCTGACTTGTCTGGTTACACCCACGACGGTCTTT  
 CCAAGAATACGCTACCGCTGACGCT

**FIGURA 56 CONTINUACIÓN**

GTTCAAGCCGCTCACATTCCTCAAGGTAAGTACTGACTTGGCTGAAGTCGCGCCAATCTTGTGTGCTGGTATCACCGTATACAAGGCTTTGAAGTCTGCCAAGTCTGAGAGCAGGCCACTGGGCGGCCATTTCTGGTGTGCTGGTGTCTAGGTTCTTTGGCTGTCAATATGCTAAGGCGATGGGTTACAGAGTCTTAGGTATTGATGGTGGTCCAGGAAAGGAAGAATTGTTTACCTCGCTCGGTGGTGAAGTATTCATCGACTTCACCAAAGAGAAGGACATTGTAGCGCAGTCGTTAAGGCTACCAACGGCGGTGCCACGGTATCATCAATGTTCCGTTCCGAAGCCGCTATCGAAGCTTCTACCAGATACTGTAGGGCGAACGGTACTGTTGTCTTGGTTGGTTTCCAGCCGGTGCAAAGTGCTCCTCTGATGTCTTCAACCACGTTGTCAAGTCTATCTCCATTGTCGGCTCTTACGTGGGGAACAGAGCTGATACCAGAGAAGCCTTAGATTTCTTTGCCAGAGGTCTAGTCAAGTCTCCAATAAAGGTAGTTGGCTTATCCAGTTTACCAGAAATTTACGAAAAGATGGAGAAGGGCCAAATTTGCTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAAGGTACC

**FIGURA 57**

**SEQ\_ID No. 79:**

AATATGATATTTATGTCCATTGTGAAAGGGATTATATTTCAACTATTATCCAGTTACGTTATAGAAATTTTCTTTCTAAAATATTTTATCCATGTCAAGAACTGTTTATTTTATTAAAGAACTATAAGTACAAAGTATAAGGCATTTGAAAAAATAGGCTAGTATATTGATTGATTATTTATTTTAAAATGCCTAAGTAAATATATACATATATAACAATAAAAATAAGTATTAGTGTAGGATTTTTAAATAGAGTATCTATTTTTCAGATTAATTTTTGATTATTGATTAC  
ATTATATAATATTGAGTAAAGTATTGACTAGCAAAATTTTTGATACTTTAATTTGTGAAATTTCTTATCAAAAGTTATATTTTTGAATAATTTTTATTGAAAAATACAATAAAAAGGATTATAGTATAAGTGTGTGTAATTTTGTGTTAAATTTAAAGGGAGGAAATGAACATGAAA

**SEQ\_ID No. 82:**

AAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTCAAACAAAAAACACCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGTAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTTTCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAAGCAGCGCAGCGAGTCAAGTGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAGGGCCCCCTGCAGGATAAAAAAATTGTAGATAAATTTTATAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTTATCAGGAAACAGCTATGACCGCGCCGCAATATGATATTTATGTCCATGTGAAAGGGATTATTTCAACTATTATCCAGTTACGTTATAGAAATTTTCTTTCTAAAATATTTTATTCCATGTCAAGAACTCTGTTTATTTTATTAAAGAACTATAAGTACAAAGTATAAGGCATTTGAAAAAATAGGCTAGTATATTGATTGATTATTTTAAAATGCCTAAGTAAATATATACATATATAACAATAAAAATAAGTATTAGTGTAGGATTTTTAAATAGAGTATCTATTTTTCAGATTAATTTTTGATTATTTGATTACATTATATAATATTGAGTAAAGTATTGACTAGCAAAATTTTTGATACTTTAATTTGTGAAATTTCTTATCAAAAGTTATATTTTTGAATAATTTTTATTGAAAAATACAATAAAAAGGATTATAGTATAAGTGTGTGTAATTTTGTGTTAAATTTAAAGGGAGGAAATGAACATGAACATATGGTGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTGCAGCTACGCGTCCATGGAGATCTCGAGGCCGTCAGACATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTTCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAAATGGCGCTAGCATAAAAAATAAGAAGCCTGCATTTGCAGGCTTCTATTTTTATGGCGCGCCGCACTTCACTTCT

**FIGURA 57 CONTINUACIÓN**

TTTCTATATAAATATGAGCGAAGCGAATAAGCGTCGGAAAAGCAGCAAAAAGTTTCCTTTTTGCTGTTGGA  
 GCATGGGGGTTTCAGGGGGTGCAGTATCTGACGTCAATGCCGAGCGAAAGCGAGCCGAAGGGTAGCATT  
 ACGTTAGATAACCCCTGATATGCTCCGACGCTTATATAGAAAAGAAGATTCAACTAGGTAAAATCTTAAT  
 ATAGGTTGAGATGATAAGGTTTATAAGGAATTTGTTTGTCTAATTTTTCACTCATTTTGTCTAATTTCTTT  
 AACAAATGTTCTTTTTTTTTTGTAGAACAGTTATGATATAGTTAGAATAGTTTAAAATAAGGAGTGAGAAAAAG  
 ATGAAAGAAAGATATGGAACAGTCTATAAAGGCTCTCAGAGGCTCATAGACGAAGAAAGTGAGAAAGTC  
 ATAGAGGTAGACAAGTTATACCGTAAACAAACGCTCGGTAACCTTCGTAAAGGCATATATAGTGCAATTAAT  
 AAGTATGTTAGATATGATTGGCGGAAAAAACTTAAAATCGTTAACTATATCCTAGATAATGTCCACTTAAG  
 TAACAATACAATGATAGTACAACAAGAGAAATAGCAAAAGCTACAGGAACAAGTCTACAAACAGTAATA  
 ACAACACTTAAAATCTTAGAAGAAGGAAATATTATAAAAAGAAAACTGGAGTATTAATGTTAAACCCTGA  
 ACTACTAATGAGAGGCGACGACCAAAAACAAAAATACCTCTACTCGAATTTGGGAACTTTGAGCAAGAG  
 GCAAATGAAATAGATTGACCTCCCAATAACACCACGTAGTTATTGGGAGGTCAATCTATGAAATGCGATTA  
 AGGGCCGGCCGAAGCAAACCTTAAGAGTGTGTTGATAGTGCAGTATCTTAAAATTTGTATAATAGGAATTG  
 AAGTTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTAAGAAGGAGTGATTACATGAACAAAAATATAAAATATTCT  
 CAAAACTTTTTAACGAGTGAAAAAGTACTCAACCAATAATAAAACAATTGAATTTAAAAGAAACCGATAC  
 CGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGCATTAAACGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAAACG  
 TCTATTGAATTAGACAGTCATCTATTCACTTATCGTCAGAAAAATTAAACTGAATACTCGTGTCACTTTAA  
 TTCACCAAGATATTCTACAGTTTCAATTCCTAACAAACAGAGGTATAAAATTTGTTGGGAGTATTCCTTACC  
 ATTTAAGCACACAAATTATTA AAAAAGTGGTTTTTGAAGCCATGCGTCTGACATCTATCTGATTGTTGAAG  
 AAGGATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGACACTCAAGTCTCGATT  
 AGCAATTGCTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATCCTAAACCAAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAACTTA  
 CCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAATATTGGAAGCTATATACGTACTTTGTTTCAAATGGGTCAATC  
 GAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCAATGAAACACGCCAAAGTAAACAATTTAA  
 GTACCGTTACTTATGAGCAAGTATTGTCTATTTTTAATAGTTATCTATTATTTAACGGGAGGAAATAATTCTA  
 TGAGTCGCTTTTGTAAATTTGGAAAGTTACACGTTACTAAAGGGAATGTGTTT

**FIGURA 58****SEQ\_ID No. 83:**

AAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGA  
GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTA  
ATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAA  
GAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT  
GTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACA  
TACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTT  
ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGG  
GGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAG  
CGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTA  
AGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTAT  
CTTTATAGTCCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCAATTTTTGTGATGCTCG  
TCAGGGGGGGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCC  
TTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAAC  
CGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCGAACGACCGAGCGCAGC  
GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGAGGGCCCCCTGCAGGATAAAA  
AAATTGTAGATAAAATTTATAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTTTATCAGGAAACAGCT  
ATGACCGCGGCCGCAATATGATATTTATGTCCATTGTGAAAGGATTATATTCAACTATT  
ATTCCAGTTACGTTATAGAAAATTTCTTTCTAAAATATTTTATCCATGTCAAGAACT  
CTGTTTATTTCAATTAAGAAGTATAAGTACAAAAGTATAAGGCATTTGAAAAATAGGCTA  
GTATATTGATTGATTATTTATTTAAAATGCCTAAGTGAATATATACATATTATAACAA  
TAAAATAAGTATTAGTGTAGGATTTTTAAATAGAGTATCTATTTTCAGATTAAATTTTTG  
ATTATTTGATTACATTATATAATATTGAGTAAAGTATTGACTAGCAAAATTTTTTGATA  
CTTTAATTTGTGAAATTTCTTATCAAAAAGTTATATTTTTGAATAATTTTTATTGAAAAAT  
ACAACAAAAAGGATTATAGTATAAGTGTGTGTAATTTTGTGTTAAATTTAAAGGGAGGA  
AATGAACATGAAACATATGTATACAGTTGGTGATTATTTACTTGATAGATTACATGAAC  
TGGAATAGAAGAAATTTTGGTGTACCAGGTGATTACAATCTTCAATTCCTAGATCAAAT  
AATATCACATAAGGATATGAAATGGGTTGGTAATGCTAATGAATTAATGCATCATATAT  
GGCAGACGGATATGCAAGAACTAAAAAGGCAGCAGCATTCTTACTACATTTGGTGTGG  
TGAATTAAGTGCAGTAAATGGATTAGCTGGAAGTTACGCAGAAAACCTACCAGTTGTTGA  
AATAGTTGGATCTCCTACTAGTAAAGTACAAAATGAAGGTAATTTGTACATCACACTCT  
TGCAGATGGTGATTTTAAGCATTATGAAAATGCATGAACCTGTTACAGCTGCAAGAAC  
ACTTCTACAGCTGAAAACGCTACTGTAGAAATTGATAGAGTTTTATCTGCTTTACTTAA  
AGAAAGAAAGCCAGTATATTAACCTCCAGTAGATGTAGCAGCAGCAAAAGCTGAGAA  
ACCTTCATTACCACTAAAAAGGAAAATCAACATCAAATACATCTGATCAAGAGATATT  
AAATAAAATTCAGGAAAGTCTTAAAAATGCAAAGAAACCTATAGTAATAACTGGACATGA  
AATAATTAGTTTTGGATTAGAAAAGACAGTTACACAGTTTATAAGTAAAACCTAAGCTTCC  
AATTACAACTTTAAATTTTGGAAAGAGTTCAGTAGATGAGGCACTTCCATCATTCTTAGG  
AATTTATAATGGAACTTATCTGAACCTAATCTTAAAGAATTTGTAGAGAGTGCTGATTT  
TATATTAATGTTAGGTGTAAAACCTACTGATAGTAGTACTGGTGCAATTTACTCATCATCT  
TAACGAAAAAAGATGATATCATTAAATATAGACGAAGGTAATAATTTCAATGAAAGAAT  
ACAGAACTTGATTTTGAATCACTTATATCATCATTACTTGATTTATCAGAGATAGAATA  
CAAAGGAAAATATATAGATAAAAAGCAAGAAGATTTTGTCCATCTAATGCTCTTCTTTC  
TCAAGATAGACTTTGGCAAGCAGTTGAGAATCTTACACAGTCTAATGAAACTATAGTTGC  
TGAGCAAGGAACATCATTTTTCGGTGCATCAAGTATATTTTTAAATCTAAAAGTCACTT  
TATTGGACAACCTCTTTGGGGTCTATTGGATATACTTTCCAGCAGCTTTAGGAAGTCA  
AATAGCTGATAAAGAAAGTAGACATTTATTATTTATTGGTGACGGTTCACCTCAGCTTAC  
AGTACAAGAATTAGGATTAGCTATAAGAGAGAAGATAAATCCTATTTGTTTCATAATAAA  
CAATGATGGATATACTGTAGAAAAGAGAAATTCACGGACCAAATCAGTCATATAATGATAT

**FIGURA 58 CONTINUACIÓN**

TCCAATGTGGAATTATTCAAAGTTACCTGAATCTTTCGGTGCTACTGAAGATAGAGTAGT  
 TTCTAAAATTGTTAGAACAGAGAACGAATTTGTATCTGTTATGAAAGAAGCTCAGGCTGA  
 CCCTAATAGAATGTATTGGATTGAATTAATTTTAGCAAAAAGAAGGTGCTCCTAAAGTACT  
 TAAGAAAATGGGAAAATTTTGCAGAACAAAATAAGTCATAAGAATCCCATAATAAAG  
 AAAGAATTTTAAATAAAGGAGGAACAAAGATGAGTATACCAGAAACACAAAAGCAATTA  
 TATTTTATGAGTCAAATGGAAAATTAGAGCATAAAGATATACCTGTACCAAAACCAAAAC  
 CAAACGAACCTCTATAAATGTTAAGTATTCTGGTGTGGTGCATACTGATCTTCATGCAT  
 GGATGGTATTGGCCTCTCCAATAAATTACCTCTGTAGGTGGTCATGAAGGTGCTG  
 GTGATGTTGTAGGTATGGGTGAAAATGTTAAAGGTTGGAAAATAGGTGATTATGCTGGAA  
 TTAATGGCTTAATGGATCTGTATGGCATGCGAGTATTGTGAATTAGGAAATGAAAGTA  
 ATTGTCCACATGCTGACTTAAGTGGTTATACTCATGATGGATCTTTTCAAGAATATGCTA  
 CTGCAGATGCGATTCAGGCTGCACACATCCACAGGGAAGTATCTTGTGAAGTAGCTC  
 CTATATTATGCGCTGGAATTACAGTATACAAAAGCATTAAAAAGTGCTAATCTTAGAGCAG  
 GACACTGGGCGACTATAAGTGGTGTGCTGCGAGGTGGTTAGGATCTTAGCAGTTCAATATG  
 CTAAGCTATGGGATATAGGATTTAGGAATAGACGGTGGTCCAGGAAAAGAAGAGTTAT  
 TTACATCATTAGGTGGTGAAGTTTTATAGATTTACAAAAGGAAAAGATATTGTTTCAG  
 CTGTAGTAAAGGCAACTAATGGTGGTGCACACGGAATTATAAATGTTTCAGTATCTGAAG  
 CAGCAATAGAAGCAAGTACTAGATATTGTAGAGCAAACGGAACAGTAGTTTTAGTTGGAC  
 TTCCAGCTGGTGCAAAGTGTTCATCTGACGTATTTAACCATGTAGTAAAGAGTATTTCAA  
 TAGTTGGATCTTACGTAGGTAATAGAGCTGATACAAGAGAAGCTTTAGATTTCTTTGCAA  
 GAGGTTTAGTTAAGAGTCTATAAAAAGTAGTAGGACTTTCATCACTTCTGAAATTTATG  
 AAAAGATGGAAAAGGACAAATAGCTGGTAGATATGTTGTAGATACAAGTAAATAAGGTA  
 CCCGGGGATCTCTAGAGTCGACGTCACGCGTCCATGGAGATCTCGAGGCCCTGCAGACAT  
 GCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACC  
 CAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCC  
 CGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTAGCATAAA  
 AATAAGAAGCTGCATTTGCAGGCTTCTATTTTTATGGCGCGCCGCACTTCTTTT  
 CTATATAAATATGAGCGAAGCGAATAAGCGTCGGAAAAGCAGCAAAAAGTTTCTTTTTG  
 CTGTTGGAGCATGGGGGTTGAGGGGTGCAGTATCTGACGTCAATGCCGAGCGAAAGCGA  
 GCCGAAGGGTAGCATTTACGTTAGATAACCCCTGATATGCTCCGACGCTTTATATAGAA  
 AAGAAGATTCAACTTAAATCTTAATATAGGTTGAGATGATAAGGTTTATAAGGAAT  
 TTGTTTGTCTAATTTTCACTAATTTGTTCTAATTTCTTTTAAACAAATGTTCTTTTTT  
 TTTTAGAACAGTTATGATATAGTTAGAATAGTTTAAAATAAGGAGTGAGAAAAAGATGAA  
 AGAAAGATATGGAACAGTCTATAAAGGCTCTCAGAGGCTCATAGACGAAGAAAGTGGAGA  
 AGTCATAGAGGTAGACAAGTTATACCGTAAACAAACGTCCTGGTAACTTCGTAAAGGCATA  
 TATAGTGCAATTAATAAGTATGTTAGATATGATTGGCGGAAAAAACTTAAATCGTTAA  
 CTATATCCTAGATAATGTCCACTAAGTAACAATAAATGATAGCTACAACAAGAGAAAT  
 AGCAAAAGCTACAGGAACAAGTCTACAAACAGTAATAACAACACTTAAATCTTAGAAGA  
 AGGAAATATTATAAAAAGAAAACTGGAGTATTAATGTTAAACCTGAACTACTAATGAG  
 AGGCGACGACCAAAAACAAAATACCTTACTCGAATTTGGGAACCTTGAGCAAGAGGC  
 AAATGAAATAGATTGACCTCCCAATAACACCACGTAGTTATTGGGAGGTCAATCTATGAA  
 ATGCGATTAAGGGCCGGCGAAGCAAACCTAAGAGTGTGTTGATAGTGACGATCTTAAA  
 ATTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTAAGAAGGAG  
 TGATTACATGAACAAAAATATAAAATATTTCAAACTTTTTAACGAGTGAAAAAGTACT  
 CAACCAATAATAAAAATGAATTTAAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATTGGAAC  
 AGGTAAGGGCATTTAACGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGCTATTGA  
 ATTAGACAGTCACTATTCAACTATCGTCAGAAAAATAAAACCTGAATACTCGTGTAC  
 TTTAATTCACCAAGATATTCTACAGTTTCAATCCCTAACAAACAGAGGTATAAAATTGT

**FIGURA 58 CONTINUACIÓN**

TGGGAGTATTCCTTACCATTAAAGCACACAAATTATTAATAAAAGTGGTTTTGAAAGCCA  
 TCGCTGACATCTATCTGATTGTTGAAGAAGGATTCTACAAGCGTACCTGGATATTCA  
 CCGAACACTAGGGTCTCTTGCACACTCAAGTCTCGATTAGCAATTGCTTAAAGCTGCC  
 AGCGGAATGCTTTCATCTAAACCAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAACTTACCCGCCA  
 TACCACAGATGTTCCAGATAAATATTGGAAGCTATATACGTACTTTGTTTCAAATGGGT  
 CAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCAATGAAACACGC  
 CAAAGTAAACAATTAAGTACCGTACTTATGAGCAAGTATTGTCTATTTTAAATAGTTA  
 TCTATTATTAACGGGAGGAAATAATCTATGAGTCGCTTTTGTAATTTGGAAAGTTAC  
 ACGTTACTAAAGGGAATGTGTTT

**FIGURA 59**

**SEQ\_ID No. 84**

AAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGA  
 GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTCTGCGCGTA  
 ATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAA  
 GAGCTACCAACTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT  
 GTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCCTACA  
 TACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTT  
 ACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGG  
 GGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAAGTGAAGTACCTACAG  
 CGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTA  
 AGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTAT  
 CTTTATAGTCCGTGCGGGTTCCGCCACTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCG  
 TCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCTGGCC  
 TTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAAC  
 CGTATTACCGCCTTGTAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGC  
 GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAGGGCCCCCTGCAGGATAAAA  
 AAATTGTAGATAAATTTATAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTTATCAGGAAACAGCT  
 ATGACCCGCGCCGCAATATGATATTTATGTCCATTGTGAAAGGATTATATTCAACTATT  
 ATTCCAGTTACGTTTATAGAAATTTCTTTCTAAAATTTTTATTCCATGTCAAGAACT  
 CTGTTTATTTTCAATTAAGAACTATAAGTACAAAATATAAGGCATTTGAAAAATAGGCTA  
 GTATATTGATTGATTATTTATTTAAAATGCCTAAGTGAATATATACATATTATAACAA  
 TAAAAAAGTATTAGTGTAGGATTTTAAATAGAGTATCTATTTTCAAGTAAATTTTTG  
 ATTATTTGATTTACATTATATAATATTGAGTAAAGTATTGACTAGCAAAATTTTTGATA  
 CTTAATTTGTGAAATTTCTATCAAAGTTATATTTTTGAATAATTTTTATTGAAAAAT  
 ACAACTAAAAAGGATTATAGTATAAGTGTGTGTAATTTTGTGTTAAATTTAAAGGGAGGA  
 AATGAACATGAAACATATGTATACAGTTGGTGATTATTTACTTGATAGATTACATGA  
 TGGAAATAGAAGAAATTTTGGTGTACCAGGTGATTACAATCTTCAATTTAGATCAAAT  
 AATATCACATAAGGATATGAAATGGGTTGGTAATGCTAATGAATTAATGCATCATATAT  
 GGCAGACGGATATGCAAGAACTAAAAAGGCAGCAGCATTCTTACTACATTTGGTGTGG  
 TGAATTAAGTGCAGTAAATGGATTAGCTGGAAGTTACGCAGAAAATTTACCAGTTGTTGA  
 AATAGTTGGATCTCCTACTAGTAAAGTACAAAATGAAGTAAATTTGTACATCACACTCT  
 TGCAGATGGTGATTTTAAAGCATTTTATGAAAATGCATGAACCTGTTACAGCTGCAAGAAC  
 ACTTCTACAGCTGAAAACGCTACTGTAGAAATGATAGAGTTTTATCTGCTTACTTAA  
 AGAAAGAAAGCCAGTATATTAACCTCCAGTAGATGTAGCAGCAGCAAAAGCTGAGAA  
 ACCTTCATTACCACTTAAAAAGGAAAATCAACATCAAATACATCTGATCAAGAGATATT  
 AAATAAAATTCAGGAAAGTCTTAAAAATGCAAAGAAACCTATAGTAATAACTGGACATGA

**FIGURA 59 CONTINUACIÓN**

AATAATTAGTTTTGGATTAGAAAAGACAGTTACACAGTTTATAAGTAAAACTAAGCTTCC  
AATTACAACCTTTAAATTTTGGAAAGAGTTTACAGTAGATGAGGCACCTCCATCATTCTTAGG  
AATTTATAATGGAACATTATCTGAACCTAATCTTAAAGAATTTGTAGAGAGTGCTGATTT  
TATATTAATGTTAGGTGTAACCTTACTGATAGTAGTACTGGTGCATTTACTCATCATCT  
TAACGAAAATAAGATGATATCATTAAATATAGACGAAGGTAATAATTCATGAAAGAAT  
ACAGAACCTTTGATTTTGAATCACTTATATCATCATTACTTGATTTATCAGAGATAGAATA  
CAAAGGAAAATATATAGATAAAAAAGCAAGAAGATTTTGTCCATCTAATGCTCTTCTTTC  
TCAAGATAGACTTTGGCAAGCAGTTGAGAATCTTACACAGTCTAATGAACTATAGTTGC  
TGAGCAAGGAACATCATTTTTCGGTGCATCAAGTATATTTTTAAATCTAAAAGTCACTT  
TATTGGACAACCTCTTTGGGGTCTATTGGATATACTTTCCAGCAGCTTTAGGAAGTCA  
AATAGCTGATAAAGAAAGTAGACATTTATTATTTATTGGTGACGGTCACTTCAGCTTAC  
AGTACAAGAATTAGGATTAGCTATAAGAGAGAAGATAAATCCTATTTGTTTCATAATAAA  
CAATGATGGATATACTGTAGAAAAGAGAAAATCACGGACCAAATCAGTCATATAATGATAT  
TCCAATGTGGAATTATCAAAGTTACCTGAATCTTTCCGGTGTACTGAAGATAGAGTAGT  
TTCTAAAATTGTTAGAACAGAGAACGAATTTGTATCTGTTATGAAAGAAGCTCAGGCTGA  
CCCTAATAGAATGTATTGGATTGAATTAATTTTAGCAAAAAGAAGGTGCTCCTAAAGTACT  
TAAGAAAATGGGAAAATTTTGCAGAACAAAATAAGTCATAAGAATTTGTTTGTCTAA  
TTTTCACTCATTTTGTCTAATTTCTTTTAAACAAATGTTCTTTTTTTTTAGAACAGTT  
ATGATATAGTTAGAATAGTTTAAATAAGGAGTGAGAAAAAGATGAAAGAAAGATATGGA  
ACAGTCTATAAAGGCTCTCAGAGGCTCATAGACGAAGAAAGTGGAGAAGTCATAGAGGTA  
GACAAGTTATACCGTAAACAAACGTCTGGTAACTTCGTAAAGGCATATATAGTGCAATTA  
ATAAGTATGTTAGATATGATTGGCGGAAAAAACTTAAATCGTTAACTATATCCTAGAT  
AATGTCCACTTAAGTAAACAATACAATGATAGCTACAACAAGAGAAAATAGCAAAAGCTACA  
GGAACAAGTCTACAACAGTAATAACAACACTTAAATCTTAGAAGAAGGAAATATTATA  
AAAAGAAAACTGGAGTATTAATGTTAAACCCTGAACTACTAATGAGAGGCGACGACCAA  
AAACAAAAATACCTCTTACTCGAATTTGGGAACCTTGAGCAAGAGGCAAATGAAATAGAT  
TGACCTCCCAATAACACCACGTAGTTATTGGGAGGTCAATCTATGAAATGCGATTAAGGG  
CCGGCCGAAGCAAACTTAAGAGTGTGTTGATAGTGCAATCTTAAATTTTGTATAATA  
GGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTAAGAAGGAGTGATTACATGAAC  
AAAAATATAAAATATTCTCAAACTTTTTAACGAGTGAAAAAGTACTCAACCAAATAATA  
AAACAATTGAATTTAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGCAT  
TTAACGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGTCTATTGAATTAGACAGTCAT  
CTATTCACCTTATCGTCAGAAAAATTAACACTGAATACTCGTGCTACTTTAATTCACCAA  
GATATTCTACAGTTTCAATTCCTAACAACAGAGGTATAAAATTTGTTGGGAGTATTCTT  
TACCATTTAAGCACACAAATTATTAATAAAAGTGGTTTTTAAAAGCCATGCGTCTGACATC  
TATCTGATTGTTGAAGAAGGATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTCACCGAACACTAGGG  
TTGCTCTTGCACTCAAGTCTCGATTGAGCAATTGCTTAAAGCTGCCAGCGGAATGCTTT  
CATCCTAAACAAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAACTTACCCGCCATACCACAGATGTT  
CCAGATAAATATTGGAAGCTATATACGTACTTTGTTTCAAAATGGGTCAATCGAGAATAT  
CGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCAATGAAACACGCCAAAGTAAACAAT  
TTAAGTACCGTTACTTATGAGCAAGTATTGTCTATTTTAAATAGTTATCTATTATTAAC  
GGGAGGAAATAATTCTATGAGTCGCTTTTGTAAATTTGGAAAGTTACACGTTACTAAAGG  
GAATGTGTTT

**FIGURA 60**

**SEQ\_ID No. 95:**

AAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGA  
 GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTCTGCGCGTA  
 ATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAA  
 GAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT  
 GTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACA  
 TACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTT  
 ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGG  
 GGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAG  
 CGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTA  
 AGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGCGCACAGGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTAT  
 CTTTATAGTCCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCG  
 TCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCC  
 TTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAAC  
 CGTATTACCGCCTTGTAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGC  
 GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAGGCCCTGCAGGGCCGCA  
 GATAGTCATAATAGTTCAGAATAGTTCAATTTAGAAATTAGACTAACTTCAAATGTT  
 TGTTAAATATATACCAACTAGTATAGATATTTTTAAATACTGGACTTAAACAGTAGTA  
 ATTTGCCTAAAAATTTTTCAATTTTTTAAAAAATCCTTTTCAAGTTGTACATTGTT  
 ATGGTAATGTAATTGAAGAAGTTATGTAGTAATATTGTAACGTTTCTTGATTTTTTT  
 ACATCCATGTAGTGCTTAAAAACCAAATATGTACATGCAATTGTATATTTCAAATA  
 CAATATTTATTTCTCGTTAAATTCACAAATAATTTATTAATAATATCAATAACCAAGAT  
 TATACTTAAATGGATGTTATTTTTAACACTTTTATAGTAAATATATTTATTTATGTA  
 GTAAAAAGGTTATAAATTATAATTGTATTTATTACAATTAATTAATAAAAAAATAGGGTT  
 TTAGGTAATAAAGTTATTTAAGAAGTAATTACAATAAAAAATTGAAGTTATTTCTTTA  
 AGGAGGGAATTATTCATATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAGTGCAAGTAAGAACAGCGATTG  
 GATCTTATGAAAGTCTCTTAAGGATGTACCAGCAGTAGATTTAGGAGCTACAGCTATAA  
 AGGAAGCAGTTAAAAAGCAGGAATAAAACCAGAGGATGTTAATGAAGTCATTTTAGGAA  
 ATGTTCTTCAAGCAGGTTTAGGACAGAATCCAGCAAGACAGGCATCTTTAAAGCAGGAT  
 TACCAGTTGAAATTCAGCTATGACTATTAATAAGGTTTGTGGTTCAGGACTTAGAACAG  
 TTAGCTTAGCAGCAAAATATAAAAGCAGGAGATGCTGACGTAATAATAGCAGGTGGTA  
 TGGAAAATATGTCTAGAGCTCCTTACTTAGCGAATAACGCTAGATGGGGATATAGAATGG  
 GAAACGCTAAATTTGTTGATGAAATGATCACTGACGGATTGTGGGATGCATTTAATGATT  
 ACCACATGGGAATAACAGCAGAAAAATAGCTGAGAGATGGAACATTTCAAGAGAAGAAC  
 AAGATGAGTTTGTCTTGCATCACAAAAAAGCTGAAGAAGCTATAAAATCAGGTCAAT  
 TTAAGATGAAATAGTTCCTGTAGTAATTAAGGCAGAAAGGGAGAAAAGTGTAGTTGATA  
 CAGATGAGCACCTAGATTTGGATCAACTATAGAAGGACTTGCAAAATTAACCTGCCT  
 TCAAAAAAGATGGAACAGTTACAGCTGGTAATGCATCAGGATTAATGACTGTGCAGCAG  
 TACTTGTAATCATGAGTGCAGAAAAAGCTAAAGAGCTTGGAGTAAACCACTTGCTAAGA  
 TAGTTTCTTATGGTTCAGCAGGAGTTGACCCAGCAATAATGGGATATGGACCTTCTATG  
 CAACAAAAGCAGCTATTGAAAAAGCAGGTTGGACAGTTGATGAATTAGATTTAATAGAAT  
 CAAATGAAGCTTTTGCAGCTCAAAGTTAGCAGTAGCAAAAGATTTAAATTTGATATGA  
 ATAAAGTAAATGTAATGGAGGAGCTATTGCCCTTGGTCATCCAATTGGAGCATCAGGTG  
 CAAGAATACTCGTTACTCTGTACACGCAATGCAAAAAAGAGATGCAAAAAAGGCTTAG  
 CACTTTATGTATAGGTGGCGGACAAGGAACAGCAATATTGCTAGAAAAGTGTAGGAAT  
 TCGAGCTCGGTACCAGGGAGATATTAATGAATAAATTAGTAAATTAACAGATTTAAA  
 GCGCATTTTCAAAGATGGCATGACAATTATGGTTGGGGTTTTTTAGATTGTGGAACCTC  
 TGAAAATATTATAGATATGCTAGTTGATTTAAATATAAAAAATCTGACTATTATAAGCAA  
 TGATACAGCTTTTCTAATAAAGGAATAGGAAAACCTATTGTAATGGTCAAGTTTCTAA

**FIGURA 60 CONTINUACIÓN**

AGTAATTGCTTCACATATTGGAACATACTCTGAACTGGAAAAAATGAGCTCTGGAGA  
 ACTTAAAGTTGAGCTTTCCCAACAAGGAACACTGATTGAAAGAATTCGTGCAGCTGGATC  
 TGGACTCGGAGGTGTATTAACCTCAACTGGACTTGGAACTATCGTTGAAGAAGGTAAGAA  
 AAAAGTTACTATCGATGGCAAAGAATATCTATTAGAATTCCTTTATCTGCTGATGTTTC  
 ATTAATAAAAGGTAGCATTGTAGATGAATTTGGAAATACCTTCTATAGGGCTGCTACTAA  
 AAATTTCAATCCATATATGGCAATGGCTGCAAAAACAGTTATAGTTGAAGCAGAAAAATTT  
 AGTTAAATGTGAAGATTTAAAAAGAGATGCCATAATGACTCCTGGCGTATTAGTAGATTA  
 TATCGTTAAGGAGGCGCTTAATTGATTGTAGATAAAGTTTTAGCAAAAGAGATAATTGC  
 CAAAAGAGTTGCAAAAGAACTAAAAAAGACCAACTCGTAAACCTTGGAAATAGGACTTCC  
 AACTTTAGTAGCAAAATTATGTACAAAAGAAATGAACATTACTTTTGAATCAGAAAATGG  
 CATGGTTGGTATGGCACAATGGCATCATCAGGTGAAAATGACCCAGATATAATAAATGC  
 TGGCGGGGAATATGTAACATTATACCTCAAGGTTCATTTTTGATAGTTCAATGCTTTT  
 CGCACTAATACGAGGAGGACATGTTGATGTTGCTGTTCTTGGTGCTCTAGAAGTTGATGA  
 AAAAGGTAATTTAGCTAAGCTGGATTGTTCCAATAAAATTTGCCAGGTATGGGTGGCGC  
 TATGGATTTAGCAATAGGCGCAAAAAAATAATAGTGGCAATGCAACATACAGGAAAAAG  
 TAAACCTAAAATCGTTAAAAAATGTACTCTCCACTACTGCTAAGGCTCAAGTGGATTT  
 AATTGTCACAGAACTTTGTGAATTGATGTAACAAATGACGGCTTACTTTTAAAAGAAAT  
 TCATAAAGATACAACATTGATGAAATTAATTTTTAACAGATGCAGATTTAATTATTCC  
 AGATAACTTAAAGATTATGGATATATGAATCGCGGCCGAATATGATTTTTATGTCCATT  
 GTGAAAGGGATTATATCAACTATTATCCAGTTACGTTATAGAAAATTTTCTTTCTAA  
 AATATTTTATCCATGTCAAGAACTCTGTTATTTTATTAAAGAACTATAAGTACAAAGT  
 ATAAGGCATTTGAAAAAATAGGCTAGTATATTGATTGATTATTTATTTTAAAATGCCTAA  
 GTGAAATATATACATATTATAACAATAAAATAAGTATTAGTGTAGGATTTTAAATAGAG  
 TATCTATTTTCAAGATTAATTTTTGATTATTTGATTACATTATATAATATTGAGTAAAG  
 TATTGACTAGCAAAATTTTTGATACTTTAATTTGTGAAATTTCTATCAAAAGTTATAT  
 TTTTGAATAATTTTTATTGAAAAATACAACAAAAAGGATTATAGTATAAGTGTGTGTAA  
 TTTTGTGTTAAATTTAAAGGGAGGAAATGAACATGAAACATATGTATACAGTTGGTGATT  
 ATTTACTTGATAGATTACATGAACCTGGAATAGAAGAAATTTTTGGTGTACCAGGTGATT  
 ACAATCTTCAATCTTAGATCAAATAATATCACATAAGGATATGAAATGGGTTGGTAATG  
 CTAATGAATTAATGCATCATATATGGCAGACGGATATGCAAGAACTAAAAAGGCAGCAG  
 CATTTCTACTACATTTGGTGGTGAATTAAGTGCAGTAAATGGATTAGCTGGAAGTT  
 ACGCAGAAAACTACCAGTTGTTGAAATAGTTGGATCCTACTAGTAAAGTACAAAATG  
 AAGGTAATTTGTACATCACACTCTTGCAGATGGTGATTTTAAAGCATTATGAAAAATGC  
 ATGAACCTGTTACAGCTGCAAGAACACTTCTTACAGCTGAAAACGCTACTGTAGAAATTG  
 ATAGAGTTTTATCTGCTTTACTTAAAGAAAGAAAGCCAGTATATATTAACCTTCCAGTAG  
 ATGTAGCAGCAGCAAAAGCTGAGAAACCTTCAATACCCTTAAAAAGGAAAAATCAACAT  
 CAAATACATCTGATCAAGAGATATTAATAAAATTCAGGAAAGTCTTAAAAATGCAAAGA  
 AACCTATAGTAATAACTGGACATGAAATAATTAGTTTTGGATTAGAAAAGACAGTTACAC  
 AGTTTATAAGTAAAACTAAGCTTCCAATTACAACCTTAAATTTTGGAAAGAGTTCAAGTAG  
 ATGAGGCATTTCCATCATTCTTAGGAATTTATAATGGAACATTATCTGAACCTAATCTTA  
 AAGAATTTGTAGAGAGTGCTGATTTTATATTAATGTTAGGTGTAACCTTACTGATAGTA  
 GTACTGGTGCAATTTACTCATCTTAAACGAAAATAAGATGATATCATTAAATATAGACG  
 AAGGTAATTAATCAATGAAAGAATACAGAACCTTGTATTTGAAATCACTTATATCATCAT  
 TACTTGATTTATCAGAGATAGAATACAAAGGAAAATATATAGATAAAAAGCAAGAAGATT  
 TTGTTCCATCTAATGCTCTTCTTCTCAAGATAGACTTTGGCAAGCAGTTGAGAATCTTA  
 CACAGTCTAATGAAACTATAGTTGCTGAGCAAGGAACATCATTTTTCGGTGCATCAAGTA  
 TATTTTTAAAATCTAAAAGTCACTTTATTGGACAACCTCTTTGGGGTCTATTGGATATA  
 CTTTTCCAGCAGCTTTAGGAAGTCAAATAGCTGATAAAGAAAGTAGACATTTATTATTTA

**FIGURA 60 CONTINUACIÓN**

TTGGTGACGGTTCACCTTCAGCTTACAGTACAAGAATTAGGATTAGCTATAAGAGAGAAGA  
TAAATCCTATTTGTTTCATAATAAACAATGATGGATATACTGTAGAAAGAGAAATTCACG  
GACCAAATCAGTCATATAATGATATTCGAATGTGGAATTATTCAAAGTTACCTGAATCTT  
TCGGTGCTACTGAAGATAGAGTAGTTTCTAAAATTGTTAGAACAGAGAACGAATTTGTAT  
CTGTTATGAAAGAAGCTCAGGCTGACCCTAATAGAATGTATTGGATTGAATTAATTTTATG  
CAAAAGAAGGTGCTCCTAAAGTACTTAAGAAAATGGGAAAATTTTGCAGAACAAAATA  
AGTCATAAGAATTTGTTTGTCTAATTTTCACTCATTGTTCTAATTTCTTTTAACAA  
ATGTTCTTTTTTTTAGAACAGTTATGATATAGTTAGAATAGTTTAAAATAAGGAGTGA  
GAAAAAGATGAAAGAAAGATATGGAACAGTCTATAAAGGCTCTCAGAGGCTCATAGACGA  
AGAAAGTGGAGAAGTCATAGAGGTAGACAAGTTATACCGTAAACAAACGTCTGGTAACTT  
CGTAAAGGCATATATAGTGCAATTAATAAGTATGTTAGATATGATTGGCGGAAAAAACT  
TAAAATCGTTAACTATATCCTAGATAAATGTCCACTTAAGTAACAATACAATGATAGCTAC  
AACAAGAGAAATAGCAAAAGCTACAGGAACAAGTCTACAAACAGTAATAACAACACTTAA  
AATCTTAGAAGAAGGAAATATTATAAAAAGAAAACTGGAGTATTAATGTTAAACCCTGA  
ACTACTAATGAGAGGCGACGACCAAAAACAAAAATACCTCTTACTCGAATTTGGGAACTT  
TGAGCAAGAGGCAAATGAAATAGATTGACCTCCAATAACACCACGTAGTTATTGGGAGG  
TCAATCTATGAAATGCGATTAAGGGCCGCGCAAGCAAACCTAAGAGTGTGTTGATAGTG  
CAGTATCTTAAAATTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTA  
ATTAAGAAGGAGTGATTACATGAACAAAAATATAAAATATTCTCAAAACTTTTTAACGAG  
TGAAAAAGTACTCAACCAATAATAAAACAATTGAATTTAAAAGAAACCGATACCGTTTA  
CGAAATTTGGAACAGGTAAGGGCATTTAACGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGT  
AACGTCTATTGAATTAGACAGTCACTATTCAACTTATCGTCAGAAAAATTTAAACTGAA  
TACTCGTGCCTTTAATTACCAAGATATTCTACAGTTTCAATTCCTAACAAACAGAG  
GTATAAAATTTGGGAGTATTCCTTACCATTTAAGCACACAAATTTAAAAAAGTGGT  
TTTTGAAAGCCATGCGTCTGACATCTATCGATTGTTGAAGAAGGATTCTACAAGCGTAC  
CTTGATATTACCCGAACACTAGGGTTGCTCTTGCACTCAAGTCTCGATTACAGCAATT  
GCTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATCCTAAACCAAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAA  
ACTTACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAATATTGGAAGCTATATACGTACTTTGT  
TTCAAAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGC  
AATGAAACACGCCAAAGTAAACAATTTAAGTACCGTACTTATGAGCAAGTATTGTCTAT  
TTTTAATAGTTATCTATTATTTAACGGGAGGAAATAATTCTATGAGTCGCTTTTGTAAAT  
TTGGAAGTTACACGTTACTAAAGGGAATGTGTTT

**FIGURA 61**

**SEQ\_ID No. 98**

CCAGTGGGCAAGTTGAAAAATTCACAAAAATGTGGTATAATATCTTTGTTTCATTAGAGCG  
ATAAACTTGAATTTGAGAGGGAACTTAGATGGTATTTGAAAAAATTGATAAAAAATAGTTG  
GAACAGAAAAGAGTATTTTGACCACTACTTTGCAAGTGTACCTTGACCTACAGCATGAC  
CGTTAAAGTGGATATCACACAATAAAGGAAAAGGGAATGAACTATATCCTGCAATGCT  
TTATTATATTGCAATGATTGTAACCCGCAATTCAGAGTTTAGGACGGCAATCAATCAAGA  
TGGTGAATTTGGGATATATGATGAGATGATACCAAGCTATACAATTTTACAATGATAC  
TGAAACATTTCCAGCCTTTGGACTGAGTGTAAAGTCTGACTTTAAATCATTTTTAGCAGA  
TTATGAAAGTGATACGCAACGGTATGGAACAATCATAGAATGGAAGGAAAGCCAAATGC  
TCCGGAAAAATTTTTAATGTATCTATGATACCGTGGTCAACCTTCGATGGCTTTAATCT  
GAATTTGCAGAAAGGATATGATTATTGATTCTATTTTACTATGGGGAAATATTATAA  
AGAAGATAACAAAATTATACTTCTTTGGCAATTCAGTTCATCACGCAGTATGTGACGG  
ATTTACATTTGCCGTTTTGTAACGAATTGCAGGAATTGATAAATAGTTAACTTCAGGT  
TTGTCTGTAACAAAAACAAGTATTTAAGCAAAAACATCGTAGAAATACGGTGTTTTTTG

**FIGURA 61 CONTINUACIÓN**

TTACCCTAAGTTTAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTT  
 TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTT  
 TTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC AAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTG  
 TTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCA  
 GATACCAAACTAGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGT  
 AGCACCGCTACATACCTCGCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGA  
 TAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTC  
 GGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACT  
 GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGGAGAAAGGCGGA  
 CAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG  
 AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTTGACTTGAGCGTCGATT  
 TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTT  
 ACGGTTCTGGCCTTTTGTGCGCTTTTGTCTACATGTTCTTCTCGGTTATCCCCTGA  
 TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAAC  
 GACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAGGGCCCC  
 CTGCAGGATAAAAAATTGTAGATAAAATTTATAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTTTA  
 TCAGGAAACAGCTATGACCGCGGCCGAGATAGTCATAATAGTCCAGAATAGTTCAATT  
 TAGAAATTAGACTAACTTCAAATGTTTGTTAAATATATACCAAAGTATAGATATT  
 TTTTAAATACTGGACTTAAACAGTAGTAATTTGCCTAAAAATTTTTCAATTTTTTTTA  
 AAAAATCCTTTTCAAGTTGTACATTGTTATGGTAATATGTAATTGAAGAAGTTATGTAGT  
 AATATTGTAACGTTTCTTGATTTTTTACATCCATGTAGTGCTTAAAAACCAAATAT  
 GTCACATGCAATTGTATATTTCAAATAACAATATTTATTTTCTGTTAAATTCACAAATA  
 ATTTATTAATAATATCAATAACCAAGATTATACTTAAATGGATGTTATTTTTTAACACT  
 TTTATAGTAAATATATTTTATGTAGTAAAAAGTTATAATTATAATTGTATTTATT  
 ACAATTAATTAATAAAAAATAGGGTTTTAGGTAATAAAGTTATTTTAAGAAAGTAAT  
 TACAATAAAATGAAGTTATTTCTTTAAGGAGGGAATTATTCATATGAAAGAAGTTGTA  
 ATAGCTAGTGCAGTAAGAACAGCGATTGGATCTTATGGAAAGTCTCTTAAGGATGTACCA  
 GCAGTAGATTTAGGAGCTACAGCTATAAAGGAAGCAGTAAAAAAGCAGGAATAAAACCA  
 GAGGATGTTAATGAAGTCATTTTAGGAAATGTTCTTCAAGCAGGTTTAGGACAGAATCCA  
 GCAAGACAGGCATCTTTAAAGCAGGATTACAGTTGAAATCCAGCTATGACTATTAAT  
 AAGGTTTGTGGTTACAGACTTAGAACAGTTAGCTTAGCAGCACAAATTATAAAGCAGGA  
 GATGCTGACGTAATAATAGCAGGTGGTATGGAAAATATGTCTAGAGCTCCTTACTTAGCG  
 AATAACGCTAGATGGGGATATAGAATGGGAAACGCTAAATTTGTTGATGAAATGATCACT  
 GACGGATTGTGGGATGCATTTAATGATTACCACATGGGAATAACAGCAGAAAACATAGCT  
 GAGAGATGGAACATTTCAAGAGAAGAACAAGATGAGTTTGCTCTTGCATCACAAAAAAA  
 GCTGAAGAAGCTATAAAATCAGGTCAATTTAAAGATGAAATAGTTCTGTAGTAATTA  
 GGCAGAAAGGGAGAACTGTAGTTGATACAGATGAGCACCCCTAGATTTGGATCAACTATA  
 GAAGGACTTGCAAAATTAACCTGCCTTCAAAAAGATGGAACAGTTACAGCTGGTAAT  
 GCATCAGGATTAATGACTGTGCAGCAGTACTTGAATCATGAGTGCAGAAAAAGCTAAA  
 GAGCTTGGAGTAAACCCTTCTAAGATAGTTTCTTATGGTTACGACAGGAGTTGACCCA  
 GCAATAATGGGATATGGACCTTTCTATGCAACAAAAGCAGCTATTGAAAAAGCAGGTTGG  
 ACAGTTGATGAATTAGATTTAATAGAATCAAATGAAGCTTTTGCAGCTCAAAGTTAGCA  
 GTAGCAAAAGATTTAAATTTGATATGAATAAAGTAAATGTAATGGAGGAGCTATTGCC  
 CTTGGTCATCCAATTGGAGCATCAGGTGCAAGAATACTCGTACTCTTGTACACGCAATG  
 CAAAAAAGAGATGCAAAAAAGGCTTAGCACTTTATGTATAGGTGGCGGACAAGGAACA  
 GCAATATTGCTAGAAAAGTGTAGGAATTCGAGCTCGGTACCAGGGAGATATTAATGA  
 ATAAATTAGTAAATTAACAGATTTAAAGCGCATTTTCAAGATGGCATGACAATTATGG  
 TTGGGGGTTTTTTAGATTGTGGAACCTCCTGAAAATATTATAGATATGCTAGTTGATTTAA  
 ATATAAAAAATCTGACTATTATAAGCAATGATACAGCTTTTCTAATAAAGGAATAGGAA  
 AACTTATTGTAATGGTCAAGTTTCTAAAGTAATTGCTTCACATATTGGAACATACTCTG

**FIGURA 61 CONTINUACIÓN**

AAACTGGAAAAAATGAGCTCTGGAGAACTTAAAGTTGAGCTTTCCCAAGGAACAC  
 TGATTGAAAGAATTCGTGCAGCTGGATCTGGACTCGGAGGTGATTAACCTCAACTGGAC  
 TTGGAACATATCGTTGAAGAAGGTAAGAAAAAGTACTATCGATGGCAAAGAATATCTAT  
 TAGAACTTCCTTATCTGCTGATGTTTCATTAATAAAAGGTAGCATTGTAGATGAATTTG  
 GAAATACCTTCTATAGGGCTGCTACTAAAAATTTCAATCCATATATGGCAATGGCTGCAA  
 AACAGTTATAGTTGAAGCAGAAAAATTTAGTTAAATGTGAAGATTTAAAAAGAGATGCCA  
 TAATGACTCCTGGCGTATTAGTAGATTATATCGTTAAGGAGGCGGCTTAATTGATTGTAG  
 AATAAGTTTTAGCAAAAGAGATAATTGCCAAAAGAGTTGCAAAAGAACTAAAAAAGACC  
 AACTCGTAAACCTTGGAAATAGGACTTCCAACCTTTAGTAGCAAATTATGTACCAAAAGAAA  
 TGAACATTACTTTTGAATCAGAAAAATGGCATGGTTGGTATGGCACAAATGGCATCATCAG  
 GTGAAAATGACCCAGATATAATAAATGCTGGCGGGGAATATGTAACATTATTACCTCAAG  
 GTTCATTTTTGATAGTTCAATGTCTTTGCACTAATACGAGGAGGACATGTTGATGTTG  
 CTGTTCTGGTGCTCTAGAAGTTGATGAAAAAGGTAATTTAGCTAACTGGATTGTTCCAA  
 AATAAATGTCCAGGTATGGGTGGCGCTATGGATTTAGCAATAGCGCAAAAAAATAA  
 TAGTGGAATGCAACATACAGGAAAAAGTAAACCTAAAATCGTTAAAAAATGTACTCTCC  
 CACTACTGCTAAGGCTCAAGTGGATTTAATTGTCACAGAACTTTGTGTAATTGATGTAA  
 CAAATGACGGCTTACTTTAAAAGAAATTCATAAAGATACAACCTATTGATGAAATTAAT  
 TTTAACAGATGCAGATTTAATTATCCAGATAACTTAAAGATTATGGATATATGAATCA  
 TTCTATTTAAATATATAACTTTAAAATCTTATGTATTTAACTAAGAAAAGAGGTTG  
 ATTGTTTTATGTTAGAAAGTGAAGTATCTAAACAATTACAACCTCACTTGCTGCTCCAG  
 CGTTTCTAGAGGACCATATAGGTTTCACAATAGAGAATATCTAAACATTATTTATCGAA  
 CTGATTTAGATGCTCTTCGAAAAATAGTACCAGAGCCACTTGAATTAGATAGAGCATATG  
 TTAGATTTGAAATGATGGCTATGCCTGATACAACCGGACTAGGCTCATATACAGAATGTG  
 GTCAAGCTATCCAGTAAAATATAATGGTGTTAAGGGTACTACTTGCATATGATGTATC  
 TAGATAATGAACCTGCTATTGCTGTTGGAAGAGAAAGTAGCGCTTATCCAAAAAAGCTTG  
 GCTATCCAAAGCTATTTGTTGATTCAGATACTTTAGTTGGGACACTTAAATATGGTACAT  
 TACCAGTAGCTACTGCAACAATGGGATATAAGCACGAGCCTCTAGATCTTAAAGAAGCCT  
 ATGCTCAAATGCAAGACCCAATTTATGCTAAAAATCATTCAAGTTACGATGGTAAGC  
 CAAGAATTTGTAACATAATATGTGCAGAAAACTGATATAACTATTACGGTGCTTGGG  
 CTGGAAGTGCACGCTCACTAATTTAGCCATGCCTACTGCTCTTGTGATTTACCTG  
 TATTAGAGATTGATCAGCATCTCATATCCTCACAGATTTAACTCTTGGAACACCTAAGG  
 TTGTACATGATTATCTTTCAGTAAAATAAAGCAATATAGAGGATCCAGGAGGAACAAG  
 ATGAGTATACCAGAAACACAAAAGCAATTATATTTTATGAGTCAAATGGAAAATTAGAG  
 CATAAAGATACCTGTACCAAAACCAAAACCAACGAACCTTATAAATGTTAAGTAT  
 TCTGGTGTGTCATACTGATCTTCATGCATGGCATGGTATTGGCCTCTTCCAACATAA  
 TTACCTCTTGTAGGTGGTCATGAAGGTGCTGGTGTAGTTGTAGGTATGGGTGAAAATGTT  
 AAAGGTTGGAAAATAGGTGATTATGCTGGAATTAATGGCTTAAATGGATCTTGTATGGCA  
 TGCGAGTATTGTGAATTAGGAAATGAAAGTAATTGTCCACATGCTGACTTAAAGTGGTTAT  
 ACTCATGATGGATCTTTCAAGAATATGCTACTGCAGATGCAGTTCAAGGCTGCACACATT  
 CCACAGGGAACCTGATCTTGCTGAAGTAGCTCCTATATTATGCGCTGGAATTACAGTATAC  
 AAAGCATTAAAAAGTGCTAATCTTAGAGCAGGACACTGGGCAGCTATAAGTGGTGCTGCA  
 GGTGGTTTAGGATCTTTAGCAGTTCAATATGCTAAAGCTATGGGATATAGAGTATTAGGA  
 ATAGACGGTGGTCCAGGAAAAGAGGTTATTTACATCATTAGGTGGTGAAGTTTTTATA  
 GATTTACAAAAGGAAAAGATATTGTTTCAGCTGTAGTAAAGGCACTAATGGTGGTGCA  
 CACGGAATTATAAATGTTTCAGTATCTGAAGCAGCAATAGAAGCAAGTACTAGATATTGT  
 AGAGCAAACGGAACAGTAGTTTTAGTTGGACTTCCAGCTGGTGCAAAAGTTCATCTGAC  
 GTATTTAACCATGTAGTAAAGAGTATTTCAATAGTTGGATCTTACGTAGGTAATAGAGCT  
 GATACAAGAGAAGCTTTAGATTTCTTTCGAAAGGTTAGTTAAGAGTCTATAAAAAGTA  
 GTAGGACTTTTCATCCTTCTGAAATTTATGAAAAGATGAAAAGGGACAAATAGCTGGT  
 AGATATGTTGTAGATACAAGTAAATAAGGCCATGGAGATCTCGAGGCTGCAGACATGCA

**FIGURA 61 CONTINUACIÓN**

AGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAA  
 CTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGC  
 ACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTAGCATAAAAAAT  
 AAGAAGCCTGCATTGTCAGGCTTCTATTTTTATGGCGCGCCGCAATTATTTTTTGAAC  
 AATTGACAATTCATTTCTATTTTTTATTAAGTGATAGTCAAAGGCATAACAGTGCTGA  
 ATAGAAAAGAAATTTACAGAAAAGAAAATTATAGAATTTAGTATGATTAATTATACTCATT  
 TATGAATGTTAATTGAATACAAAAAAAATACTTGTTATGTATTCAATTACGGGTAAA  
 ATATAGACAAGTTGAAAAATTTAATAAAAAAATAAGTCCTCAGCTCTTATATATTAAGCT  
 ACCAACTTAGTATATAAGCCAAAACCTAAATGTGCTACCAACACATCAAGCCGTTAGAGA  
 ACTCTATCTATAGCAATATTTCAAATGTACCGACATACAAGAGAAAACATTAECTATATAT  
 ATTCAATTTATGAGATTATCTTAACAGATATAAATGTAAATTGCAATAAGTAAGATTTAG  
 AAGTTTATAGCCTTTGTGATTGGAAGCAGTACGCAAAGGCTTTTTTATTTGATAAAAAAT  
 TAGAAGTATATTTATTTTTCATAATTAATTTATGAAAATGAAAGGGGGTGAAGCAAGTG  
 ACAGAGGAAAGCAGTATCTTATCAAATAACAAGGTATTAGCAATATCATTATTGACTTTA  
 GCAGTAAACATTATGACTTTTATAGTGCTTGTAGCTAAGTAGTACGAAAAGGGGGAGCTTT  
 AAAAAAGCTCCTTGGAAATACATAGAATTCATAAAATTAATTTATGAAAAGAGGGCGTATAT  
 GAAAACCTGTAAAAATTGCAAAGAGTTTATTAAGATACTGAAATATGCAAAATACATTC  
 GTTGATGATTCATGATAAAACAGTAGCAACCTATTGCAGTAAATACAATGAGTCAAGATG  
 TTTACATAAAGGGAAAAGTCCAATGTATTAATTGTTCAAAGATGAACCGATATGGATGGTG  
 TGCCATAAAAAATGAGATGTTTTACAGAGGAAGAACAAGAAAAGAACGTACATGCATTAA  
 ATATTATGCAAGGAGCTTTAAAAAAGCTCATGTAAAGAAGAGTAAAAAGAAAAAATAATT  
 TATTTATTAATTTAATATTGAGAGTGCCGACACAGTATGCACTAAAAAATATATCTGTGG  
 TGTAGTGAGCCGATACAAAAGGATAGTCACTCGCATTTCATAATACATCTTATGTTATG  
 ATTATGTGTCGGTGGGACTTCACGACGAAAACCCACAATAAAAAAAGAGTTCGGGGTAGG  
 GTTAAGCATAGTTGAGGCACTAAACAATCAAGCTAGGATATGCAGTAGCAGACCGTAAG  
 GTCGTTGTTTAGGTGTGTTGTAATACATACGCTATTAAGATGTAAAAATACGGATACCAA  
 TGAAGGGAAAAGTATAATTTTTGGATGTAGTTGTTTGTTCATCTATGGGCAAACACGT  
 CCAAAGCCGTTTCCAAATCTGCTAAAAAGTATATCCTTTCTAAAATCAAAGTCAAGTATG  
 AAATCATAAATAAAGTTAATTTTGAAGTTATTATGATATTATGTTTTCTATTTAAATA  
 AATTAAGTATATAGAATAGTTTAAATAAGTATATACTTAATGTGATAAGTGTCTGACAG  
 TGTCACAGAAAAGGATGATTGTTATGGATTATAAGCGGCCGG

**FIGURA 62**

**SEQ\_ID No. 101**

CCAGTGGGCAAGTTGAAAAATTCACAAAAATGTGGTATAATATCTTTGTTTCATTAGAGCG  
 ATAAACTTGAATTTGAGAGGGAACCTTAGATGGTATTTGAAAAATTGATAAAAAATAGTTG  
 GAACAGAAAAGAGTATTTTGACCACTACTTTGCAAGTGACCTTGTACCTACAGCATGAC  
 CGTTAAAGTGGATATCACACAAATAAAGGAAAAGGGAATGAACTATATCCTGCAATGCT  
 TTATTATTTGCAATGATTGTAACCCGCAATTCAGAGTTTAGGACGGCAATCAATCAAGA  
 TGGTGAATTGGGGATATATGATGAGATGATACCAAGCTATACAATTTTACAATGATAC  
 TGAAACATTTTCAGCCTTTGGACTGAGTGAAGTCTGACTTTAAATCATTITTTAGCAGA  
 TTATGAAAGTGATACGCAACGGTATGGAAACAATCATAGAATGGAAGGAAAAGCCAAATGC  
 TCCGGAAAACATTTTAAATGTATCTATGATACCGTGGTCAACCTTCGATGGCTTTAATCT  
 GAATTTGCAGAAAGGATATGATTATTTGATTCCTATTTTACTATGGGGAAATATTATAA  
 AGAAGATAACAAAATTATACTTCTTTGGCAATCAAGTTCATCACGCAGTATGTGACGG  
 ATTTACATTTGCCGTTTTGTAACGAATTGCAGGAATTGATAAATAGTTAACTTCAGGT  
 TTGCTGTAACATAAAAAAGTATTTAAGCAAAAACATCGTAGAAATACGGGTGTTTTTTG  
 TTACCCTAAGTTTAAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTT  
 TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTT

**FIGURA 62 CONTINUACIÓN**

TTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTG  
 TTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCA  
 GATACCAAACTAGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT  
 AGCACCGCTACATACCTCGCTCTGTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGA  
 TAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT  
 GGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT  
 GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGA  
 CAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG  
 AAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT  
 TTTGTGATGCTCGTACGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTT  
 ACGGTTCTGGCCTTTTGTGCGCTTTTGTCCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGA  
 TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAAC  
 GACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGAGGGCCCC  
 CTGCAGGATAAAAAAATTGATAGATAAAATTTATAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTTA  
 TCAGGAAACAGCTATGACCGCGGCCGAGATAGTCATAATAGTTCAGAATAGTTCAATT  
 TAGAAATTAGACTAAACTTCAAAATGTTTGTAAATATATACCAAAGTATAGATATT  
 TTTAAATACTGGACTTAAACAGTAGTAAATTTGCCTAAAAAATTTTTCAATTTTTTTTA  
 AAAAACTCTTTCAAGTTGTACATTGTTATGGTAATATGTAATTGAAGAAGTTATGTAGT  
 AATATTGTAACGTTTCTTGATTTTTTACATCCATGTAGTGCTTAAAAAACCAAAATAT  
 GTCACATGCAATTGTATATTTCAAATAACAATATTTATTTTTCTCGTTAAATTCACAAATA  
 ATTTATTAATAATATCAATAACCAAGATTATACTTAAATGGATGTTATTTTTTAACACT  
 TTTATAGTAAATATATTTATTTATGTAGTAAAAAGGTTATAATTATAATTGTATTTATT  
 ACAATTAATTAATAAAAAAATAGGGTTTTAGGTAATAAAGTTATTTAAGAAGTAAT  
 TACAATAAAAAATGAAGTTATTTCTTAAAGGAGGGAATTATTCATATGAAAGAAGTTGTA  
 ATAGCTAGTGACGTAAGAACAGCGATTGGATCTTATGGAAAGTCTCTTAAGGATGTACCA  
 GCAGTAGATTTAGGAGCTACAGCTATAAAGGAAGCAGTTAAAAAGCAGGAATAAAACCA  
 GAGGATGTTAATGAAGTCATTTTAGGAAATGTTCTTCAAGCAGGTTTAGGACAGAATCCA  
 GCAAGACAGGCATCTTTAAAGCAGGATTACCAGTTGAAATCCAGCTATGACTATTAAT  
 AAGGTTTGTGGTTTCAGGACTTAGAACAGTTAGCTTAGCAGCACAAATTAAAAAGCAGGA  
 GATGCTGACGTAATAATAGCAGGTGGTATGGAAAATATGTCTAGAGCTCCTTACTTAGCG  
 AATAACGCTAGATGGGGATATAGAATGGGAAACGCTAAATTTGTTGATGAAATGATCACT  
 GACGGATTGTGGGATGCATTTAATGATTACCACATGGGAATAACAGCAGAAAACATAGCT  
 GAGAGATGGAACATTTCAAGAGAAGAACAAGATGAGTTTCTTGCATCACAAAAAAA  
 GCTGAAGAAGCTATAAAATCAGGTCAATTTAAAGATGAAATAGTCTCTGATGATTAATA  
 GGCAGAAAAGGAGAACTGTAGTTGATACAGATGAGCACCTAGATTTGGATCAACTATA  
 GAAGGACTTGCAAAATTAACCTGCCTTCAAAAAAGATGGAACAGTTACAGCTGGTAAT  
 GCATCAGGATTAATGACTGTGCAGCAGTACTTGAATCATGAGTGAGAAAAAGCTAAA  
 GAGCTTGGAGTAAACCACTTGCTAAGATAGTTCTTATGGTTCAGCAGGAGTTGACCCA  
 GCAATAATGGGATATGGACCTTTCTATGCAACAAAAGCAGCTATTGAAAAAGCAGGTTGG  
 ACAGTTGATGAATTAATAGAATCAATGAAGCTTTTGCAGCTCAAAGTTTAGCA  
 GTAGCAAAAAGATTTAAATTTGATATGAATAAAGTAAATGAAATGGAGGAGCTATTGCC  
 CTTGGTCATCCAATTGGAGCATCAGGTGCAAGAATACTCGTTACTCTGTACACGCAATG  
 CAAAAAGAGATGCAAAAAAGGCTTAGCACTTTATGTATAGGTGGCGGACAAGGAACA  
 GCAATATTGCTAGAAAAGTCTAGGAATTCGAGCTCGGTACCAGGGAGATATTAATGA  
 ATAAATTAGTAAATTAACAGATTTAAAGCGCATTTTCAAAGATGGCATGACAATTATGG  
 TTGGGGTTTTTTAGATTGTGGAACTCCTGAAAATATTATAGATATGCTAGTTGATTTAA  
 ATATAAAAAATCTGACTATTATAAGCAATGATACAGCTTTTCTAATAAAGGAATAGGAA  
 AACTTATTGTAATGGTCAAGTTTCTAAAGTAATTGCTTCACATATTGGAACAACTCTG  
 AAAGTGGAAAAAATGAGCTCTGGAGAACTTAAAGTTGAGCTTTCCCAAGGAACAC  
 TGATTGAAAGAATTCGTGCAGCTGGATCTGGACTCGGAGGTGATTAACCTCAACTGGAC

**FIGURA 62 CONTINUACIÓN**

TTGGAACATATCGTTGAAGAAGGTAAGAAAAAGTTACTATCGATGGCAAAGAATATCTAT  
 TAGAACTTCCTTATCTGCTGATGTTTCATTAATAAAAGGTAGCATTGTAGATGAATTTG  
 GAAATACCTTCTATAGGGCTGCTACTAAAAATTTCAATCCATATATGGCAATGGCTGCAA  
 AACAGTTATAGTTGAAGCAGAAAAATTTAGTTAAATGTGAAGATTTAAAAAGAGATGCCA  
 TAATGACTCCTGGCGTATTAGTAGATTATATCGTTAAGGAGGCGGCTTAATTGATTGTAG  
 ATAAAGTTTTAGCAAAGAGATAATTGCCAAAAGAGTTGCAAAGAAGTAAAAAGACC  
 AACTCGTAAACCTTGAATAGGACTTCCAACCTTTAGTAGCAAATTATGTACAAAAGAAA  
 TGAACATTACTTTTGAATCAGAAAATGGCATGGTTGGTATGGCACAATGGCATCATCAG  
 GTGAAAAAGACCCAGATATAATAAATGCTGGCGGGGAATATGTAACATTATTACCTCAAG  
 GTTCATTTTTGATAGTTCAATGTCTTTGCGACTAATACGAGGAGGACATGTTGATGTTG  
 CTGTTCTGGTCTCTAGAAGTTGATGAAAAAGGTAATTTAGCTAACTGGATTGTTCCAA  
 ATAAATTTGCCAGGTATGGGTGGCGCTATGGATTTAGCAATAGGCGCAAAAAAATAA  
 TAGTGGCAATGCAACATACAGGAAAAAGTAAACCTAAAATCGTTAAAAATGTACTCTCC  
 CACTTACTGCTAAGGCTCAAGTGGATTTAATTGTACAGAACCTTTGTGAATTGATGTAA  
 CAAATGACGGCTTACTTTTAAAAAGAAATTCATAAAGATACAACCTATTGATGAAATTAAT  
 TTTTAAACAGATGCAGATTTAATTTATCCAGATAACTTAAAGATTATGGATATATGAATCA  
 TTCTATTTTAAATATATAACTTTAAAAATCTTATGTATTAAAAACTAAGAAAAGAGGTTG  
 ATTGTTTTATGTTAGAAAGTGAAGTATCTAAACAAATTACAACCTCACTTGTCTCCAG  
 CGTTTCTAGAGGACCATATAGGTTTCCACAATAGAGAATATCTAACATTATTTATCGAA  
 CTGATTTAGATGCTCTTCGAAAAATAGTACCAGAGCCACTTGAAATTAGATAGAGCATATG  
 TTAGATTTGAAATGATGGCTATGCCTGATACAACCGGACTAGGCTCATATACAGAATGTG  
 GTCAAGCTATCCAGTAAAATATAATGGTGTAAAGGGTACTACTTGCATATGATGTATC  
 TAGATAATGAACCTGCTATTGCTGTTGGAAGAGAAAGTAGCGCTTATCCAAAAAGCTTG  
 GCTATCCAAAGCTATTTGTTGATTGAGATACTTTAGTTGGGACACTTAAATATGGTACAT  
 TACCAGTAGCTACTGCAACAATGGGATATAAGCACGAGCCTTAGATCTTAAAGAAGCCT  
 ATGCTCAAATTTGCAAGACCAATTTTATGCTAAAAATCATTCAAGGTTACGATGGTAAGC  
 CAAGAATTTGTGAACATAATATGTGCAGAAAATCTGATATAACTATTCACGGTGTGGTGA  
 CTGGAAGTGCACGTCTACAATTTTAGCCATGCTAGCTCCTCTGCTGATTTACCTG  
 TATTAGAGATTGTATCAGCATCTCATATCCTCACAGATTTAACTCTTGAACACCTAAGG  
 TTGTACATGATTATCTTTTCAAGTAAAATAAAAGCAATATAGAGGATCCACAGCTATGACCG  
 CGGCCGCAATATGATATTTTATGTCATTGTGAAAGGGATTATTTCAACTATTATTCCAG  
 TTACGTTTATAGAAATTTCTTTCTAAAATATTTTATTCCATGTCAAGAACTCTGTTTA  
 TTTTATTAAGAACTATAAGTACAAAAGTATAAGGCATTTGAAAAATAGGCTAGTATATT  
 GATTGATTATTTATTTTAAATGCCTAAGTGAATATATACATATTATAACAATAAAATA  
 AGTATTAGTGTAGGATTTTAAATAGAGTATCTATTTTCAAGTAAATTTTGTATTATT  
 GATTTACATTATATAATATTGAGTAAAGTATTGACTAGCAAATTTTTTGTACTTTAAT  
 TTGTGAAATTTCTTATCAAAGTTATATTTTGAATAATTTTATTGAAAAATACAACCTA  
 AAAAGGATTATAGTATAAGTGTGTGTAATTTTGTGTTAAATTTAAAGGGAGGAAATGAAC  
 ATGAAACATATGTATACAGTTGGTGAATTTTACTTGTAGATTACATGAACCTTGAATA  
 GAAGAAATTTTGGTGTACCAGGTGATTACAATCTTCAATCTTAGATCAAATAATATCA  
 CATAAGGATATGAAATGGGTTGGTAATGCTAATGAATTAATGCATCATATATGGCAGAC  
 GGATATGCAAGAACTAAAAAGGCAGCAGCATTCTTACTACATTTGGTGTGGTGAATTA  
 AGTGCAGTAAATGGATTAGCTGGAAGTTACGCAGAAAACCTACCAGTTGTTGAAATAGTT  
 GGATCTCTACTAGTAAAGTACAAAATGAAGGTAAATTTGTACATCACACTCTTGCAGAT  
 GGTGATTTTAAAGCATTTATGAAAATGCATGAACCTGTTACAGCTGCAAGAACACTTCTT  
 ACAGCTGAAAACGCTACTGTGAAAATTTGATAGATTTTATCTGCTTACTTAAAGAAAGA  
 AAGCCAGTATATATAACCTTCCAGTAGATGTAGCAGCAGAAAAGCTGAGAAACCTTCA  
 TTACCACTTAAAAAGGAAAATCAACATCAAATACATCTGATCAAGAGATATTAATAAA  
 ATTACAGGAAAGTCTTAAAAATGCAAAGAAACCTATAGTAATAACTGGACATGAAATAATT  
 AGTTTTGGATTAGAAAAGACAGTTACACAGTTTATAAGTAAAACTAAGCTTCCAATTACA

**FIGURA 62 CONTINUACIÓN**

ACTTTAAATTTTGGAAAGATTTCAGTAGATGAGGCACTTCCATCATTCTTAGGAATTTAT  
 AATGGAACATTATCTGAACCTAATCTTAAAGAATTTGTAGAGAGTGCTGATTTTATATTA  
 ATGTTAGGTGTAAAACCTACTGATAGTAGTACTGGTGCATTTACTCATCATCTTAACGAA  
 AATAAGATGATATCATTAAATATAGACGAAGGTAATAATTTCAATGAAAGAATACAGAAC  
 TTTGATTTTGAATCACTTATATCATCTTACTTGATTTATCAGAGATAGAATACAAAGGA  
 AAATATATAGATAAAAAGCAAGAAGATTTTGTCCATCTAATGCCTTCTTTCTCAAGAT  
 AGACTTTGGCAAGCAGTTGAGAATCTTACACAGTCTAATGAAACTATAGTTGCTGAGCAA  
 GGAACATCATTTTTCCGGTGCATCAAGTATATTTTTAAAATCTAAAAGTCACITTTATTGGA  
 CAACCTCTTTGGGGTCTATTGGATATACTTTCCAGCAGCTTTAGGAAGTCAATAGCT  
 GATAAAGAAAGTAGACATTTATTTTATTGGTGACGGTTCACCTCAGCTTACAGTACAA  
 GAATTAGGATTAGCTATAAGAGAGAAGATAAATCCTATTTGTTTCATAATAACAATGAT  
 GGATATACTGTAGAAAGAGAAATTCACGGACCAATCAGTCATATAATGATATTCCAATG  
 TGGAATTATTCAAAGTTACCTGAATCTTTCCGGTGTACTGAAGATAGAGTAGTTTCTAAA  
 ATTGTTAGAACAGAGAACGAATTTGTATCTGTTATGAAAGAAGCTCAGGCTGACCCTAAT  
 AGAATGTATTGGATTGAATTAATTTTAGCAAAAGAAGGTGCTCCTAAAGTACTTAAGAAA  
 ATGGGAAAATTTTGCAGAACAAAATAAGTCATAAGAATTTCCATAATAAAGAAAAGAAAT  
 TTTAAATAAAGGAGGAACAAAGATGAGTATACCAGAAAACAAAAAGCAATTTATTTTTA  
 TGAGTCAAATGGAAAATTAGAGCATAAAGATATACCTGTACCAAAACCAAAACCAAAACGA  
 ACTTCTTATAAATGTTAAGTATTCTGGTGTGTCATACTGATCTTCATGCATGGCATGG  
 TGATTGGCCTCTTCAACTAAATTACCTCTGTAGGTGGTCATGAAGGTGCTGGGTGAGT  
 TGAGGTATGGGTGAAAATGTTAAAGGTTGAAAATAGGTGATTATGCTGGAATTAATG  
 GCTTAATGGATCTGTATGGCATGCGAGTATTGTGAATAGGAAATGAAAGTAATTGTCC  
 ACATGCTGACTTAAGTGGTTATACTCATGATGGATCTTTTCAAGAATATGCTACTGCAGA  
 TGCAGTTCAGGCTGCACACATCCACAGGGAAGTCTGCTGAAGTAGCTCCTATATT  
 ATGCGCTGGAATTCAGATATAAAGCATTAAAAAGTCTAATCTTAGAGCAGGACACTG  
 GGCAGCTATAAGTGGTGTGTCAGGTTTGGGATCTTTAGCAGTTCAATATGCTAAAAGC  
 TATGGGATATAGAGTATTAGGAATAGACGGTGGTCCAGGAAAAGAAGAGTTATTTACATC  
 ATTAGGTGGTGAAGTTTTATAGATTTACAAAAGGAAAAGATATTGTTTCAGCTGTAGT  
 AAAGGCAACTAATGGTGGTGCACACGGAATTATAAATGTTTCAGTATCTGAAGCAGCAAT  
 AGAAGCAAGTACTAGATATTGTAGAGCAAACGGAACAGTAGTTTTAGTTGGACTTCCAGC  
 TGGTGCAAAGTGTTCATCTGACGTATTTAACCATGTAGTAAAGAGTATTTCAATAGTTGG  
 ATCTTACGTAGGTAATAGAGCTGATACAAGAGAAGCTTTAGATTTCTTTGCAAGAGGTTT  
 AGTTAAGAGTCTATAAAAAGTAGTAGGACTTTTATCACTTCTGAAATTTATGAAAAGAT  
 GGAAAAGGGACAAATAGCTGGTAGATATGTTGTAGATACAAGTAAATAAGGCCATGGAGA  
 TCTCGAGCCTGCAGACATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG  
 GGAAAACCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTG  
 GCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG  
 CGAATGGCGCTAGCATAAAAATAAGAAGCCTGCATTTGCAGGCTTCTATTTTTATGGCG  
 CGCCGCCATTATTTTTTGAACAATTGACAATTCATTTCTATTTTTTATTAAGTGATAG  
 TCAAAAGGCATAACAGTGTGAATAGAAAGAAATTTACAGAAAAGAAAATTTATAGAATTT  
 AGTATGATTAATTAATCACTTATGAATGTTAATGAAATACAAAAAAATACTTGT  
 ATGTATCAATTACGGGTTAAAATATAGACAAGTTGAAAAATTAATAAAAAATAAGTC  
 CTCAGCTTTATATTAAGTACCAACTTAGTATATAAGCCAAAACCTAATGTGCTAC  
 CAACACATCAAGCCGTTAGAGAAGCTTATCTATAGCAATATTTCAAATGTACCGACATAC  
 AAGAGAAACATTAATAATATATTCAATTTATGAGATTATCTAACAGATATAAATGTA  
 AATTGCAATAAGTAAGATTTAGAAGTTTATAGCCTTTGTGATTGGAAGCAGTACGCAA  
 GGCTTTTTATTTGATAAAAATAGAAGTATATTTATTTTTCATAATTAATTTATGAAA  
 ATGAAAGGGGGTGAGCAAAGTGACAGAGGAAAGCAGTATCTTATCAAATAACAAGGTATT  
 AGCAATATCATTATTGACTTTAGCAGTAAACATTATGACTTTTATAGTGCTTGTAGCTAA  
 GTAGTACGAAAGGGGAGCTTTAAAAGCTCCTTGGAAATACATAGAATTCATAAAATTAAT  
 TTATGAAAAGAAGGGCGTATATGAAAACCTTGAAAATTTGCAAAGAGTTTATTAAGATA

CTGAAATATGCAAATACATTGTTGATGATTCATGATAAACAGTAGCAACCTATTGCA  
 GTAAATACAATGAGTCAAGATGTTTACATAAAGGGAAAAGTCCAATGTATTAATTGTTCAA  
 AGATGAACCGATATGGATGGTGTGCCATAAAAATGAGATGTTTTACAGAGGAAGAACAGA  
 AAAAAGAACGTACATGCATTAATATTATGCAAGGAGCTTTAAAAAGCTCATGTAAAGA  
 AGAGTAAAAAGAAAAATAATTTATTTATTAATTTAATATTGAGAGTGCCGACACAGTAT  
 GCACTAAAAAATATATCTGTGGTGTAGTGAGCCGATACAAAAGGATAGTCACTCGCATT  
 TCATAATACATCTTATGTTATGATTATGTGTCGGTGGGACTTCACGACGAAAACCCACAA  
 TAAAAAAGAGTTCCGGGTAGGGTTAAGCATAGTTGAGGCAACTAAACAATCAAGCTAGG  
 ATATGCAGTAGCAGACCGTAAGGTCGTTGTTAGGTGTGTTGTAATACATACGCTATTAA  
 GATGTAAAAATACGGATACCAATGAAGGGAAAAGTATAATTTTTGGATGTAGTTTGTG  
 TTCATCTATGGGCAAACCTACGTCCAAGCCGTTTCAAATCTGCTAAAAAGTATATCCTT  
 TCTAAAATCAAAGTCAAGTATGAAATCATAAATAAAGTTTAAATTTGAAGTTATTATGAT  
 ATTATGTTTTCTATTAATAAATAAAGTATATAGAATAGTTTAATAATAGTATATACT  
 TAATGTGATAAGTGTCTGACAGTGTACAGAAAAGGATGATTGTTATGGATTATAAGCGGC  
 CGG

FIGURA 63

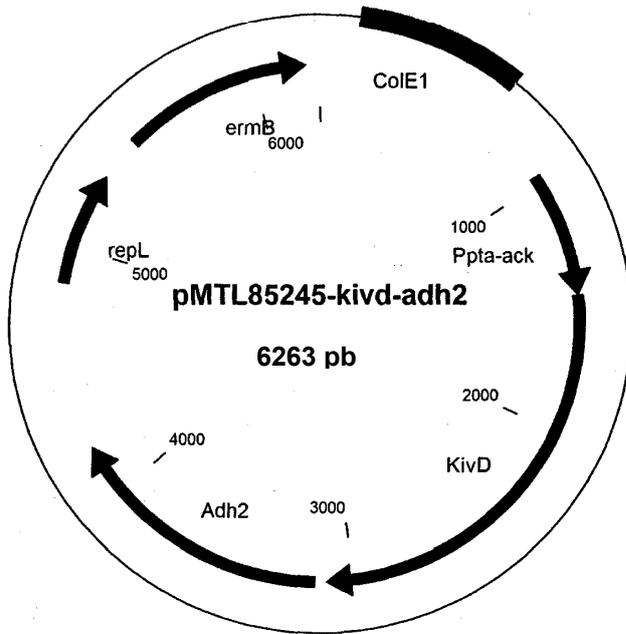


FIGURA 64

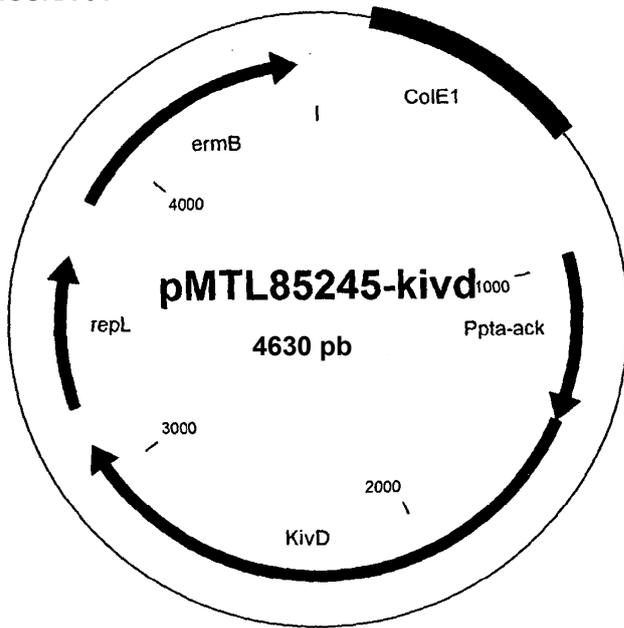


FIGURA 65

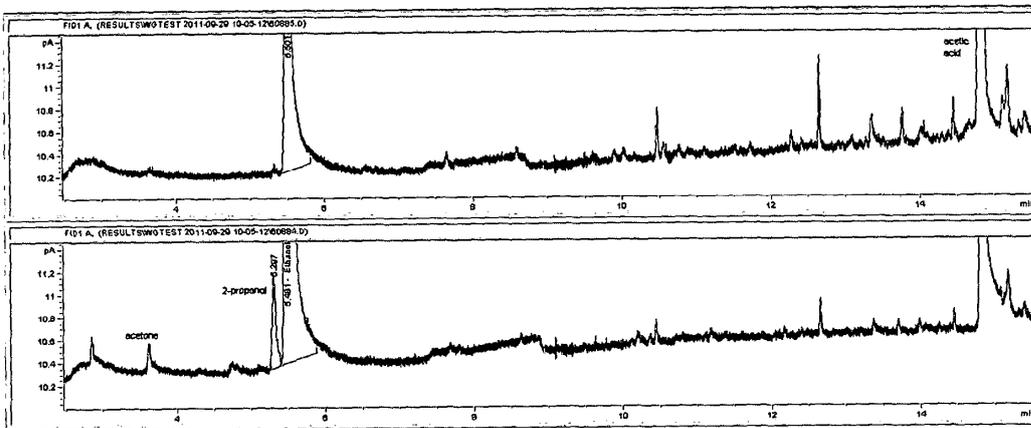


FIGURA 66

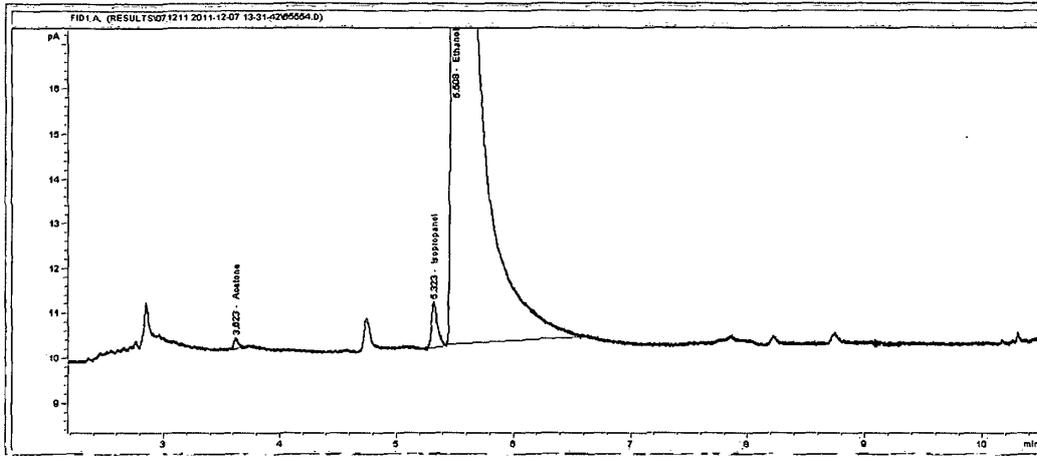


FIGURA 67

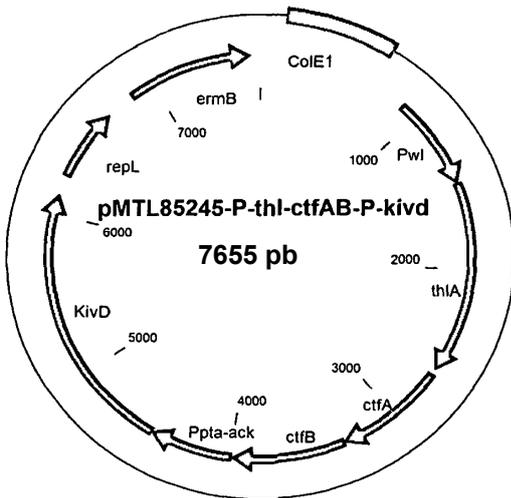


FIGURA 68

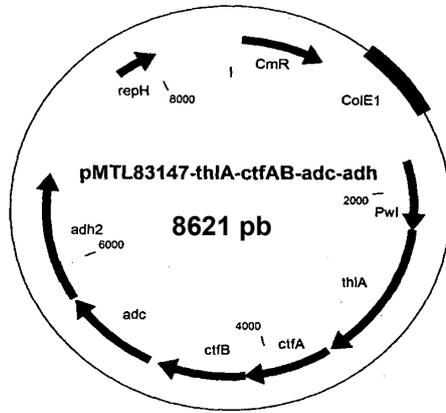


FIGURA 69

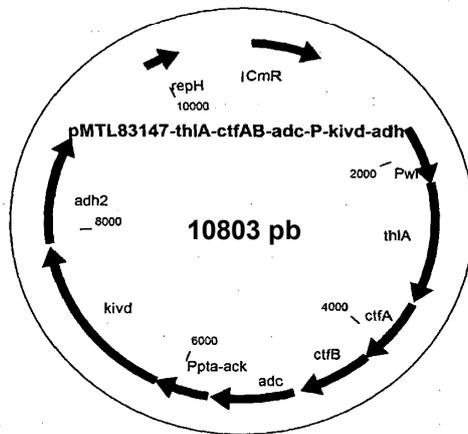


FIGURA 70

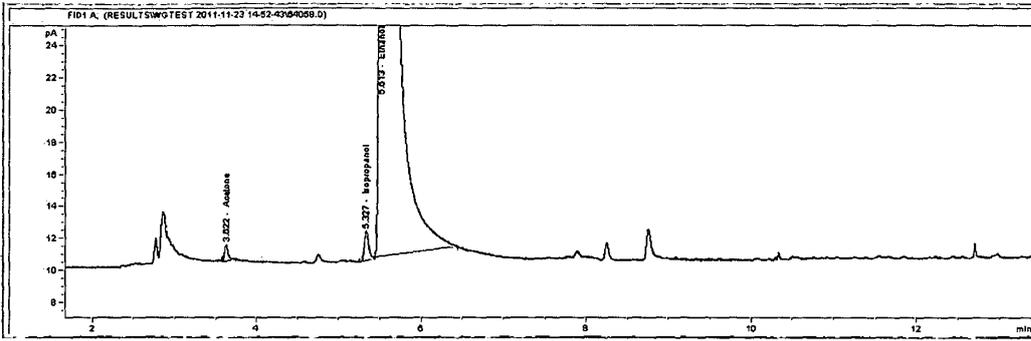


FIGURA 71

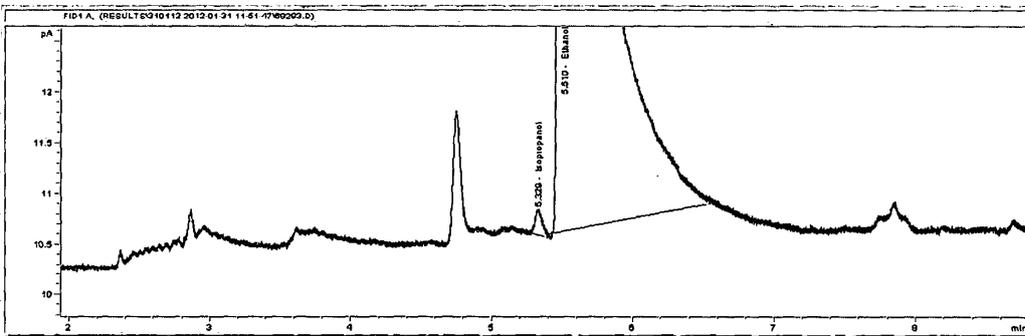


FIGURA 72

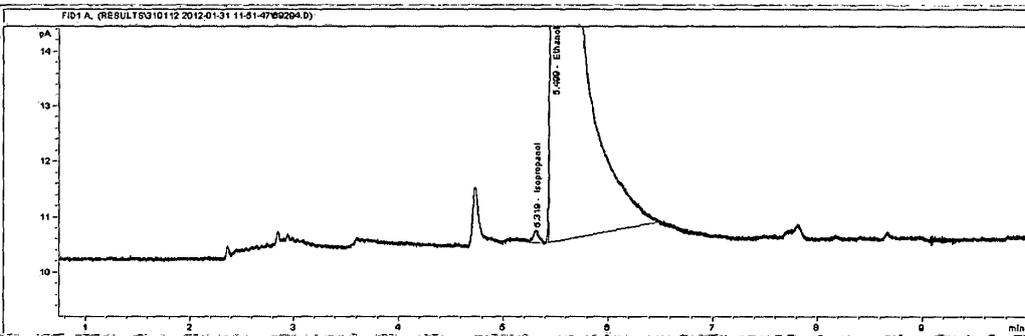


FIGURA 73

Combinaciones de cepas	<i>C. autoethanogenum</i>		<i>E. coli</i>	
	Acetona	Isopropanol	Acetona	Isopropanol
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>C. acetobutylicum</i></p> <p><input type="checkbox"/> <i>C. beijerinckii</i></p> <p><input type="checkbox"/> <i>D. lactis</i></p> <p><input type="checkbox"/> <i>S. cerevisiae</i></p> </div> <div style="width: 50%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>adh2</i></p> <p><input type="checkbox"/> <i>adc</i></p> </div> </div>	✓	✓	✓	x
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>adh2</i></p> </div> <div style="width: 50%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>adc</i></p> </div> </div>	✓	✓	x	x
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>adh2</i></p> <p><input type="checkbox"/> <i>adc</i></p> </div> <div style="width: 50%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>adh2</i></p> <p><input type="checkbox"/> <i>adc</i></p> </div> </div>	✓	✓	x	x
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>adh2</i></p> </div> <div style="width: 50%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>adc</i></p> </div> </div>	✓	✓	x	x
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>adh2</i></p> <p><input type="checkbox"/> <i>adc</i></p> </div> <div style="width: 50%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>adh2</i></p> <p><input type="checkbox"/> <i>adc</i></p> </div> </div>	✓	✓	x	x
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>adh2</i></p> <p><input type="checkbox"/> <i>adc</i></p> </div> <div style="width: 50%;"> <p><input type="checkbox"/> <i>adh2</i></p> <p><input type="checkbox"/> <i>adc</i></p> </div> </div>	✓	✓	x	x

FIGURA 74

