

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 312**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/62** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 9/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2013** **E 13192425 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 2730658**

54 Título: **Procedimiento para la conversión de un éster de ácido carboxílico usando células deficientes para BioH**

30 Prioridad:

**12.11.2012 EP 12007663**

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

**28.11.2019**

73 Titular/es:

**EVONIK OPERATIONS GMBH (100.0%)  
Rellinghauser Straße 1-11  
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**SCHAFFER, STEFFEN;  
ANDREA, HEIKO;  
WESSEL, MIRJA;  
HENNEMANN, HANS-GEORG y  
HÄGER, HARALD**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 733 312 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

Procedimiento para la conversión de un éster de ácido carboxílico usando células deficientes para BioH

5 La invención se refiere a un procedimiento para la conversión de un éster de ácido carboxílico de fórmula (I)



10 seleccionándose  $R^1$  del grupo que consiste en hidrógeno,  $-CH_2OH$ ,  $-CHO$ ,  $-COOR^3$ ,  $-CH_2SH$ ,  $-CH_2OR^3$  y  $-CH_2NH_2$ ,  
seleccionándose  $R^2$  del grupo que consiste en alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

seleccionándose  $R^3$  del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

15 y tratándose en el caso de A de un resto alquileo o alquenileo, lineal, no sustituido, con al menos 4, más preferiblemente 6, aún más preferiblemente 8 átomos de carbono,

por medio de una célula, que comprende la etapa de

20 a) poner en contacto la célula con el éster de ácido carboxílico en una disolución acuosa, tratándose en el caso de la célula de una célula recombinante, en la que la actividad de un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo, presentando la variante esencialmente la misma actividad enzimática del polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 y presentando la variante una homología con SEQ ID NO 2 de al menos el 90%, está reducida con respecto al tipo silvestre de la célula.

25 La biotecnología se encarga de la producción entre otros de productos químicos finos utilizando diferentes organismos, que presentan capacidades de síntesis interesantes. Con respecto a los procedimientos químicos convencionales, los procedimientos biotecnológicos presentan una serie de ventajas. En primer lugar prescinden por regla general completamente de sustancias peligrosas para la salud, tales como catalizadores a base de metales pesados, y condiciones de reacción con valores de pH, presión y temperatura extremos. Además, durante la construcción de la infraestructura necesaria para el procedimiento biotecnológico es suficiente en múltiples ocasiones con pocas inversiones y medidas de seguridad. La selectividad y especificidad de enzimas biotecnológicamente relevantes supera a menudo considerablemente la de catalizadores químicos, de modo que puede reducirse la formación de subproductos no deseados y a menudo difíciles de separar del producto, que necesariamente se generarían durante una síntesis usando procedimientos de síntesis orgánica. Finalmente, los organismos biotecnológicamente relevantes aceptan como eductos en muchos casos compuestos, tales como hidratos de carbono complejos, que pueden obtenerse de materias primas renovables. Por consiguiente puede reducirse la dependencia de una empresa de producción de materias primas fósiles, tales como petróleo y gas natural.

40 Sin embargo, el establecimiento de procedimientos biotecnológicos está asociado con dificultades considerables, que conducen a que hoy en día solo se produzcan muy pocas sustancias a escala industrial. El problema principal consiste en que una célula con una actividad de síntesis deseada no solo presenta la enzima responsable de esa actividad de síntesis, sino más bien miles de enzimas, que coexisten en la misma célula y compiten entre sí por sustratos o incluso catalizan reacciones completamente opuestas. Así, solo en el genoma de *Escherichia coli* están codificadas aproximadamente 80 polipéptidos identificados con procedimientos bioinformáticos como hidrolasas, es decir enzimas, que escinden determinados enlaces consumiendo una molécula de agua. En qué condiciones una enzima se produce por la célula y qué reacciones con qué sustratos cataliza, solo está realmente aclarado exhaustivamente en pocos casos. Por tanto, la selección dirigida de una enzima para la catálisis de una determinada reacción no es posible en muchos casos.

55 En consecuencia, en el caso de utilizar células como biocatalizadores en lugar de catalizadores biológicos aislados o químicos existe también siempre el peligro de que un producto o producto intermedio producido por una enzima dotada de una actividad no deseada o ya el educto original se convierta por otra enzima en un subproducto no deseado. Si esto tiene lugar y cuál de las numerosas enzimas presenta en este caso la actividad no deseada, no puede preverse a pesar de los avances técnicos en el campo de la bioinformática.

60 Precisamente en el caso de sustancias químicamente reactivas, que están demandada industrialmente como eductos reactivos para la producción de productos más complejos, no es improbable que reaccionen en el interior de la célula con componentes esenciales del organismo y por consiguiente actúen tóxicamente. Si este es el caso, entonces se ve perjudicada la capacidad de crecimiento y de síntesis del organismo hasta la muerte de la célula, sin que el desarrollador pueda reconocer directamente la toxicidad. Qué organismo tolera qué concentración de una sustancia químicamente reactiva igualmente tampoco es previsible.

65 En el caso de procedimientos con varias reacciones, en cada caso catalizada por una enzima, la complejidad del sistema dificulta la búsqueda de factores que limitan el rendimiento o la pureza. Si el rendimiento de producto es

demasiado bajo, entonces esto puede deberse a que una de las enzimas está presente en una concentración demasiado baja, sin que se conozca de cuál de las enzimas en cuestión se trata a este respecto, es decir el educto no se convierte en el periodo de tiempo previsto o antes de la degradación por enzimas competidoras debido a una capacidad de síntesis insuficiente. Alternativamente, es absolutamente posible que una enzima esté presente de manera detectable en la célula en forma de un polipéptido, pero precisamente en esta célula no presente el plegado esencial para la actividad o se carezca de un cofactor desconocido hasta la fecha, pero esencial para la actividad. Igualmente, como ya se ha mencionado, el producto metabólico puede ser tóxico para la célula o degradarse.

El experto en la técnica, que desea establecer o mejorar un procedimiento biotecnológico, se ve entonces confrontado con numerosos puntos de partida posibles, pero en la mayoría de los casos no obtiene del estado de la técnica ninguna indicación concreta y aplicable, sobre de cuál de estos puntos de partida debe partir para llegar al objetivo.

Los ésteres de ácidos carboxílicos representan un grupo de compuestos muy demandados industrialmente, que o bien en sí mismos o bien en forma de productos procesados adicionalmente se usan como compuestos farmacéuticos, cosméticos, plásticos y similares.

Sin embargo, con frecuencia para un procesamiento se necesita no solo una función éster que debe introducirse en primer lugar en un precursor, sino que en el éster tiene que realizarse una derivatización adicional, sin que la función éster se hidrolice a este respecto o posteriormente. Esto último no es fácil de llevar a cabo, dado que muchos ésteres de ácidos carboxílicos en particular en disoluciones acuosas y a valores de pH que difieren mucho del punto neutral tienden ya a la hidrólisis incluso en ausencia de enzimas que catalizan tales reacciones.

Una posibilidad importante de derivatizar adicionalmente ésteres de ácidos carboxílicos consiste en la oxidación de cadenas alquilo contenidas en los mismos. A este respecto, en primer lugar se produce un alcohol, que o bien puede utilizarse como tal o bien se oxida adicionalmente para dar el aldehído o la cetona. El aldehído o la cetona puede o bien aminarse de manera reductora u oxidarse adicionalmente para dar ácido carboxílico, que en caso necesario puede a su vez esterificarse de nuevo.

Estas múltiples posibilidades de conversión, de las que muchas se catalizan por enzimas endógenas, es decir presentes de manera natural en un organismo, muestran que el problema de la formación de subproductos o metabolización incontrolada durante la conversión de ésteres de ácidos carboxílicos por medio de procedimientos biotecnológicos es especialmente grave.

Un ejemplo de un éster de ácido carboxílico muy demandado industrialmente, que se produce convencionalmente partiendo de hidrocarburos contenidos en el petróleo, es el éster metílico del ácido 12-aminoláurico (ALSME). El ALSME es un producto de partida importante en la producción de polímeros, por ejemplo, para la producción de sistemas de conducción a base de nailon. Hasta la fecha se produce ALSME en un proceso con bajo rendimiento partiendo de materias primas fósiles.

Una nueva vía muy prometedora para la producción biotecnológica de ALS o ALSME se describe en el documento WO 2009/077461.

Se convierte un éster de ácido carboxílico de fórmula (I) por medio de una célula en un procedimiento, que comprende la etapa de

a) poner en contacto la célula con el éster de ácido carboxílico en una disolución acuosa.

A este respecto, se oxida éster metílico del ácido láurico en una primera etapa por una monooxigenasa, y el aldehído generado se convierte por medio de una transaminasa en el ALSME. Una desventaja de este procedimiento consiste en que se generan subproductos, por ejemplo, los ácidos dicarboxílicos, que solo pueden separarse del producto deseado ALSME con dificultades. Esto reduce el rendimiento y dificulta el reciclado de disolventes hidrófobos e intercambiadores catiónicos líquidos hidrófobos, que según el documento WO 2012/110124 pueden usarse para la separación del producto de la mezcla de reacción acuosa, a costa de la eficiencia en el aprovechamiento de recursos.

El documento WO 2007/139871 da a conocer un procedimiento para la conversión del éster de ácido carboxílico dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato (DMB-S-MMP) por medio de una célula, que comprende la etapa de

a) poner en contacto la célula con el éster de ácido carboxílico en una disolución acuosa,

tratándose en el caso de la célula de una célula recombinante, en la que la actividad de un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 está reducida con respecto al tipo silvestre de la célula.

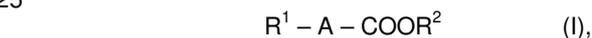
Ante este trasfondo, el objetivo en el que se basa la invención consiste en proporcionar un procedimiento biotecnológico lo más eficiente posible en cuanto al rendimiento, al balance de carbono y/o de nitrógeno y/o a la pureza para la conversión de ésteres de ácidos carboxílicos.

5 Un objetivo adicional en el que se basa la invención consiste en proporcionar un procedimiento biotecnológico lo más eficiente posible en cuanto al rendimiento, al balance de carbono y/o de nitrógeno, a la capacidad de reutilización de los agentes usados y/o a la pureza del producto para la conversión de ésteres de ácidos carboxílicos en ésteres de ácidos carboxílicos aminados. En este contexto, por un balance de carbono y/o de nitrógeno eficiente se entiende que un porcentaje lo más alto posible del carbono y/o nitrógeno alimentado para la conversión de un  
10 éster de ácido carboxílico en forma de sustratos adecuados a una célula se encuentra en el producto final deseado, en lugar de, por ejemplo, convertirse en otros productos distintos al deseado.

Un objetivo adicional en el que se basa la invención consiste en mejorar la capacidad de procesamiento de una  
15 mezcla de reacción de múltiples fases de la conversión de un éster de ácido carboxílico, especialmente en cuanto a la capacidad de reutilización para el procesamiento de disolventes hidrófobos usados e intercambiadores catiónicos líquidos, así como en cuanto a la formación y separación de fases en un sistema bifásico que comprende una fase acuosa, en la que transcurre la conversión del éster de ácido carboxílico, y una fase orgánica con disolventes orgánicos y/o intercambiadores catiónicos líquidos.

20 Estos y otros objetivos se alcanzan mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas, obteniéndose formas de realización de las reivindicaciones dependientes.

En un primer aspecto, el problema en el que se basa la invención se soluciona mediante un procedimiento para la  
25 conversión de un éster de ácido carboxílico de fórmula (I)



seleccionándose  $R^1$  del grupo que consiste en hidrógeno,  $-CH_2OH$ ,  $-CHO$ ,  $-COOR^3$ ,  $-CH_2SH$ ,  $-CH_2OR^3$  y  $-CH_2NH_2$ ,

30 seleccionándose  $R^2$  del grupo que consiste en alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

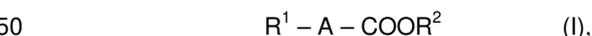
seleccionándose  $R^3$  del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

35 y tratándose en el caso de A de un resto alquileno o alquenileno, lineal, no sustituido, con al menos 4, más preferiblemente 6, aún más preferiblemente 8 átomos de carbono,

por medio de una célula, que comprende la etapa de

40 a) poner en contacto la célula con el éster de ácido carboxílico en una disolución acuosa, tratándose en el caso de la célula de una célula recombinante, en la que la actividad de un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo, presentando la variante esencialmente la misma actividad enzimática del polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 y presentando la variante una homología con SEQ ID NO 2 de al menos el 90%, está reducida con respecto al tipo silvestre de la célula.

45 En un segundo aspecto, el problema en el que se basa la invención se soluciona mediante un uso de una desactivación de un gen que codifica para un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo como parte de la dotación genética de una célula recombinante para aumentar la producción de un éster de ácido carboxílico de fórmula (I)



seleccionándose  $R^1$  del grupo que consiste en hidrógeno,  $-CH_2OH$ ,  $-CHO$ ,  $-COOR^3$ ,  $-CH_2SH$ ,  $-CH_2OR^3$  y  $-CH_2NH_2$ ,

55 seleccionándose  $R^2$  del grupo que consiste en alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

seleccionándose  $R^3$  del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

60 y tratándose en el caso de A de un resto alquileno o alquenileno, lineal, no sustituido, con al menos 4, más preferiblemente 6, aún más preferiblemente 8 átomos de carbono,

y presentando la variante esencialmente la misma actividad enzimática del polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 y presentando la variante una homología con SEQ ID NO 2 de al menos el 90%.

65 En un tercer aspecto, el problema en el que se basa la invención se soluciona mediante el uso de una célula recombinante, en la que la actividad de un polipéptido con SEQ ID NO 2 o de una variante del mismo, presentando la variante esencialmente la misma actividad enzimática del polipéptido que comprende SEQ ID NO 2, y

presentando la variante una homología con SEQ ID NO 2 de al menos el 90%, está reducida con respecto al tipo silvestre de la célula, para la conversión de un éster de ácido carboxílico de fórmula (I)



seleccionándose  $R^1$  del grupo que consiste en hidrógeno,  $-CH_2OH$ ,  $-CHO$ ,  $-COOR^3$ ,  $-CH_2SH$ ,  $-CH_2OR^3$  y  $-CH_2NH_2$ ,

seleccionándose  $R^2$  del grupo que consiste en alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

seleccionándose  $R^3$  del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

y tratándose en el caso de A de un resto alquileo o alquenileno, lineal, no sustituido, con al menos 4, más preferiblemente 6, aún más preferiblemente 8 átomos de carbono.

En una forma de realización del primer, segundo o tercer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento o un uso, tratándose en el caso de A de un resto alquileo saturado, preferiblemente de un resto alquileo de fórmula  $-(CH_2)_n$ , siendo n al menos 4.

En una forma de realización adicional del primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento, seleccionándose  $R^1$  del grupo que consiste en hidrógeno,  $-CH_2OH$ ,  $-CHO$  y  $-CH_2NH_2$ .

En una forma de realización preferida del primer al tercer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento o un uso, expresando la célula además una transaminasa.

En una forma de realización preferida del primer al tercer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento o un uso, expresando la célula además una alanina deshidrogenasa.

En una forma de realización preferida del primer al tercer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento o un uso, presentando la célula además una proteína de la familia AlkL.

En una forma de realización preferida del primer al tercer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento o un uso, presentando la célula una actividad reducida con respecto a su tipo silvestre de al menos una enzima, que catalizada una de las reacciones de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, tratándose preferiblemente de una enzima del grupo que comprende ácido graso-CoA-ligasa, acil-CoA-deshidrogenasa, 2,4-dienoil-CoA-reductasa, enoil-CoA-hidratasa and 3-cetoacil-CoA-tiolasa, un importador de ácidos grasos o variantes de los mismos, presentando las variantes esencialmente la misma actividad enzimática de la ácido graso-CoA-ligasa, de la acil-CoA-deshidrogenasa, de la 2,4-dienoil-CoA-reductasa, de la enoil-CoA-hidratasa, de la 3-cetoacil-CoA-tiolasa o del importador de ácidos grasos, de manera especialmente preferible de FadL o una variante del mismo, presentando la variante esencialmente la misma actividad enzimática del FadL.

En una forma de realización preferida del primer al tercer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento o un uso, presentando y/o sobreexpresando la célula al menos una enzima del grupo que consiste en alcano hidroxilasa, alcohol deshidrogenasa, transaminasa, alanina deshidrogenasa y proteína de la familia AlkL en forma recombinante.

En una forma de realización preferida del primer al tercer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento o un uso, estando reducida la actividad de un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo con respecto al tipo silvestre de la célula mediante la desactivación de un gen que codifica para un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo.

La invención se basa en el conocimiento sorprendente de los inventores que una célula recombinante, en la que la actividad de un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 especialmente o de una variante del mismo está reducida con respecto al tipo silvestre de la célula, es adecuada para la conversión de ésteres de ácidos carboxílicos en el sentido de que el rendimiento, el balance de carbono y/o de nitrógeno y la pureza de los productos que se derivan de la misma es sorprendentemente mayor que en una célula, que en cuanto al polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 presenta la misma actividad que el tipo silvestre de la célula. Esto es aplicable, por ejemplo, a reacciones, en las que el éster de ácido carboxílico se oxida usando al menos una alcano hidroxilasa y opcionalmente enzimas adicionales.

Un conocimiento sorprendente adicional de los inventores es que una célula recombinante, en la que la actividad de un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o de una variante del mismo está reducida con respecto al tipo silvestre de la célula, es adecuada para la conversión de ésteres de ácidos carboxílicos especialmente en el sentido de que los disolventes orgánicos e intercambiadores catiónicos líquidos usados para el procesamiento del producto de reacción de la conversión del éster de ácido carboxílico pueden recuperarse de manera especialmente eficiente y/o frecuencia mediante reciclado para un nuevo uso, y que la separación de la mezcla de reacción acuosa de una disolución hidrófoba que comprende disolvente orgánico y/o intercambiador catiónico líquido está mejorada.

La invención se refiere a un procedimiento para la conversión de un éster de ácido carboxílico por medio de una célula, pudiendo tratarse en el caso de la conversión de cualquier reacción química, que hace uso del éster de ácido carboxílico de interés como educto, y en la que la hidrólisis o hidrólisis prematura del éster de ácido carboxílico o un compuesto derivado del mismo podría perjudicar el rendimiento, el balance de carbono y/o de nitrógeno y/o la pureza del producto que debe producirse a partir de la misma. El procedimiento según la invención es especialmente adecuado para conversiones, en las que se convierte una función química distinta al grupo éster de ácido carboxílico, por ejemplo, un grupo alquilo terminal, y en las que hay que obtener el grupo éster de ácido carboxílico. Sin embargo, según la invención también pueden realizarse reacciones tales como transesterificaciones del grupo éster de ácido carboxílico, en las que hay que evitar una reacción prematura e inespecífica del grupo éster de ácido carboxílico. Igualmente, la enseñanza según la invención es adecuada para reacciones, en las que un compuesto que contiene el grupo éster de ácido carboxílico no es en sí mismo el educto que debe convertirse, sino que únicamente es necesaria su presencia y estabilidad a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, para el caso en el que se trate de un inductor o activador de una enzima con una actividad esencial para el procedimiento.

Para la realización de la invención es esencial que la célula usada en un procedimiento según la invención sea una célula recombinante, en la que la actividad de un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo está reducida con respecto al tipo silvestre de la célula. Esta secuencia codifica para BioH, una enzima, que es conocida por su capacidad, como parte de la biosíntesis de biotina con la enzima adicional BioC transformar alanina y/o acetato en pimeloil-CoA (Barker, D. F. y Campbell, A. M. (1980) J. Bacteriol. 143, 789-800). BioH se codifica en *Escherichia coli* por una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO 1. En una forma de realización preferida, la actividad del polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 está reducida por desactivación, por ejemplo, delección parcial, u otras medidas para la reducción de la expresión de una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO 1 o una variante del mismo.

Con el desarrollo de métodos genéticos, microbiológicos y de biología molecular modernos, el experto en la técnica tiene a disposición numerosas herramientas, con las que puede medir e influir de manera rutinaria en la actividad de polipéptidos presentes en células vivas. Para la determinación de la actividad de una enzima, que se encuentra en forma de una suspensión, de un pellet o puede haberse extraído en forma procesada de un cultivo celular, pueden usarse y evaluarse pruebas enzimáticas convencionales, tal como se describe en manuales, por ejemplo, Cornish-Bowden, 1995. Un ensayo para la determinación de la actividad del polipéptido que comprende SEQ ID NO 1 o una variante del mismo se describe en X. Xie *et al.* (2007) *Metabolic Engineering* 9; 379-386.

También se describen en el estado de la técnica procedimientos que pueden emplearse de manera rutinaria para la reducción de la actividad de una enzima en una célula, por ejemplo, mediante mutagénesis no dirigida de células mediante exposición a radiación radiactiva seguida de enriquecimiento o selección de los mutantes, mediante la introducción dirigida al sitio de mutaciones puntuales o mediante la interrupción del marco de lectura o la delección de una parte del marco de lectura de un gen cromosómico integrado en una célula que codifica para una enzima activa, por ejemplo, en Maniatis *et al.* (1989) o en Fuchs & Schlegl (2007), y los puede realizar de manera rutinaria el experto en la técnica. También es posible una reducción de la actividad basada en la interferencia de ARN (Tuschl, 2001) o usando inhibidores específicos. La formulación "presentando la célula una actividad reducida con respecto a su tipo silvestre" de un polipéptido significa, tal como se usa en el presente documento, que la actividad del polipéptido en la célula modificada está reducida con respecto a la actividad de la misma enzima en una célula de tipo silvestre. Por ejemplo, la reducción relativa asciende al 5, 10, 20, 40, 50, 75, 90, 95, 99 o más por ciento de la actividad. O ya no puede detectarse ninguna actividad de la enzima con respecto a la referencia.

Por ejemplo, se da a conocer la reducción de la actividad del polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo mediante una desactivación. Por el término "desactivación", tal como se usa en el presente documento, se entiende cualquier medida, que reduzca la actividad del polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo de manera duradera e irreversible, en particular también en la descendencia de células correspondientes, por ejemplo, mediante la interrupción del marco de lectura de la secuencia que codificada para SEQ ID NO 2 o una variante de la misma, mediante la delección de al menos una parte de la secuencia que codifica para SEQ ID NO 2 o de una variante de la misma, que condiciona una pérdida de la actividad enzimática del polipéptido codificado, pero no interrumpe el marco de lectura, o mediante la mutación de una secuencia de nucleótidos esencial para la expresión, por ejemplo, de un promotor, de un sitio de unión al ribosoma o similar. Las medidas para la producción de células con actividades reducidas de polipéptidos específicos son procedimientos rutinarios accesibles para el experto en la técnica y se describen suficientemente en el estado de la técnica, por ejemplo, en Kamionka *et al.* (2005) *Appl Environ Microbiol.* febrero de 2005; 71(2): 728-733, Geng *et al.* (2009), *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2009, Article ID 646380, doi:10.1155/2009/646380, y Murphy (2009) *Methods Mol Biol.* 2011;765:27-42. También son adecuados kits que pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, el sistema de desactivación génica TargeTron™ de Sigma Aldrich.

La invención se refiere a la conversión de un éster de ácido carboxílico de fórmula (I)



seleccionándose R<sup>1</sup> del grupo que comprende hidrógeno, -CH<sub>2</sub>OH, -CHO, -COOR<sup>3</sup>, -CH<sub>2</sub>SH, -CH<sub>2</sub>OR<sup>3</sup> y -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, seleccionándose R<sup>2</sup> del grupo que comprende alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo, seleccionándose R<sup>3</sup> del grupo que comprende hidrógeno y alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo, y tratándose en el caso de A de un resto alquileo o alquilenilo lineal, no sustituido, con al menos 4, más preferiblemente 6, aún más preferiblemente 8 átomos de carbono. En el caso del resto alquileo A puede tratarse, con la condición previa de que comprenda al menos cuatro átomos de carbono, de cualquier resto alquileo lineal. Por ejemplo, en el caso de A se trata de una cadena de alquileo de fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, pudiendo ser n 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30. Por ejemplo, A representa un resto alquileo de fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, siendo n de 4 a 24, por ejemplo, de 4 a 22 o de 4 a 10, siendo R<sub>1</sub> hidrógeno, -CH<sub>2</sub>OH, -CHO o -COOH, por ejemplo, hidrógeno, y siendo R<sup>2</sup> metilo o etilo.

En relación con eductos de los ésteres de ácidos carboxílicos convertidos según la invención así como todos los demás compuestos descritos en el presente documento, es aplicable que un compuesto designado con características estructurales, por ejemplo, una fórmula química, designa igualmente compuestos protonados así como desprotonados u otros compuestos disociados. Por ejemplo, por el término "acetato" se entiende igualmente la forma protonada, es decir ácido acético, así como la forma disociada, es decir CH<sub>3</sub>-COO<sup>-</sup>.

En el caso de la célula que debe utilizarse según la invención se trata, por ejemplo, de un catalizador de célula completa en forma de una célula metabólicamente activa, que presenta una actividad enzimática necesaria para la conversión del éster de ácido carboxílico, por ejemplo, mediante la expresión de una enzima recombinante.

En cuanto a la elección del organismo, la célula que puede usarse según la invención no está sujeta a ninguna limitación, siempre que se cultivable, estable y esté accesible un procedimiento para el debilitamiento de actividades enzimáticas, por ejemplo, desactivaciones. Así, puede tratarse igualmente de una célula procariota o eucariota. En el caso de una célula eucariota puede tratarse de eucariotas unicelulares, por ejemplo, de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* y *Pichia pastoris*. En el caso de células procariotas puede tratarse, por ejemplo, de una bacteria, que se selecciona del grupo que comprende *Magnetococcus*, *Mariprofundus*, *Acetobacter*, *Acetobacterium*, *Acidiphilium*, *Afiplia*, *Ahrensia*, *Asticcacaulis*, *Aurantimonas*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bartonella*, *tribocorum*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *subvibrioides*, *Brucella*, *Caulobacter*, *Chelativorans*, *Citricella*, *Citromicrobium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Dinoroseobacter*, *Erythrobacter*, *Fulvimarina*, *Gluconacetobacter*, *Granulibacter*, *Hirschia*, *Hoefflea*, *Hyphomicrobium*, *Hyphomonas*, *Ketogulonicigenium*, *Labrenzia*, *Loktanella*, *Magnetospirillum*, *Maricaulis*, *Maritimibacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Nitrobacter*, *Novosphingobium*, *Oceanibulbus*, *Oceanicaulis*, *Oceanicola*, *Ochrobactrum*, *Octadecabacter*, *Oligotropha*, *Paracoccus*, *Parvibaculum*, *Parvularcula*, *Pelagibaca*, *Phaeobacter*, *Phenylobacterium*, *Polymorphum*, *Pseudovibrio*, *Rhodobacter*, *Rhodocyclomicrobium*, *Rhodospseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Roseibium*, *Roseobacter*, *Roseomonas*, *Roseovarius*, *Ruegeria*, *Sagittula*, *Silicibacter*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Starkeya*, *Sulfitobacter*, *Thalassiomicrobium*, *Xanthobacter*, *Zymomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Orientia*, *Rickettsia*, *Wolbachia*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Taiwanensis*, *Lautropia*, *Limnobacter*, *Polynucleobacter*, *Ralstonia*, *Chromobacterium*, *Eikenella*, *corrodens*, *Basfia*, *Kingella*, *Laribacter*, *Lutiella*, *Neisseria*, *Simonsiella*, *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Alicyclophilus*, *Aromatoleum*, *Azoarcus*, *Comamonas*, *Dechloromonas*, *Delftia*, *Gallionella*, *Herbaspirillum*, *Hermineimonas*, *Hylemonella*, *Janthinobacterium*, *Leptothrix*, *Methylilium*, *Methylobacterium*, *Methylophilales*, *Methyloversatilis*, *Methylovorus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Oxalobacter*, *Parasutterella*, *Polaromonas*, *Polaromonas*, *Pusillimonas*, *Rhodoferax*, *Rubrivivax*, *Sideroxydans*, *Sutterella*, *wadsworthensis*, *Taylorella*, *Thauera*, *Thiobacillus*, *Thiomonas*, *Variovorax*, *Verminephrobacter*, *Anaeromyxobacter*, *Bdellovibrio*, *bacteriovorus*, *Bilophila*, *Desulfarculus*, *Desulfatibacillum*, *Desulfobacca*, *Desulfobacterium*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfobalobium*, *Desulfotobacterium*, *Desulfomicrobium*, *Desulfonatronospira*, *Desulfotalea*, *Desulfovibrio*, *Desulfuromonas*, *Geobacter*, *Haliangium*, *Hippea*, *Lawsonia*, *Myxococcus*, *Pelobacter*, *Plesiocystis*, *Sorangium*, *Stigmatella*, *Syntrophobacter*, *Syntrophus*, *Arcobacter*, *Caminibacter*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Nitratifactor*, *Nitratiruptor*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurospirillum*, *Sulfurovum*, *Wolinella*, *Buchnera*, *Blochmannia*, *Hamiltonella*, *Regiella*, *Riesia*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Sodalis*, *Wigglesworthia*, *Glossina*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, *Acidithiobacillus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcanivorax*, *Alkalilimnicola*, *Allochromatium*, *Alteromonadales*, *Alteromonas*, *Baumannia*, *Beggiatoa*, *Bermanella*, *Carsonella*, *Ruthia*, *Vesicomyosocius*, *Cardiobacterium*, *Chromohalobacter*, *Colwellia*, *Congregibacter*, *Coxiella*, *Dichelobacter*, *Endoriftia*, *Enhydrobacter*, *Ferrimonas*, *Francisella*, *Glaciecola*, *Halomonas*, *Halorhodospira*, *Halothiobacillus*, *Idiomarina*, *Kangiella*, *Legionella*, *Marinobacter*, *Marinomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomicrobium*, *Methylophaga*, *Moraxella*, *Moritella*, *Neptuniibacter*, *Nitrococcus*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Psychromonas*, *Reinekea*, *Rickettsiella*, *Saccharophagus*, *Shewanella*, *Succinatimonas*, *Teredinibacter*, *Thioalkalimicrobium*, *Thioalkalivibrio*, *Thiomicrospira*, *Tolumonas*, *Vibrionales*, *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Gallibacterium*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Mannheimia*, *Pasteurella*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Pseudomonas*, *Allivibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium*, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Borrelia*, *Brachyspira*, *Leptospira*, *Spirochaeta*, *Treponema*, *Hodgkinia*, *Puniceispirillum*, *Liberibacter*, *Pelagibacter*, *Odyssella*, *Accumulibacter*, en particular *B. subtilis*, *B. megaterium*, *C. glutamicum*, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*,

*Acinetobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Burkholderia thailandensis*, cianobacterias, *Klebsiella* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella* sp., *Rhizobium* sp. y *Rhizobium meliloti*. Por ejemplo, se trata de una enterobacteria, por ejemplo, de *Escherichia coli*.

5 El procedimiento según la invención requiere que la célula se ponga en contacto con el éster de ácido carboxílico en una disolución acuosa. Por ejemplo, por el término “poner en contacto”, tal como se usa en el presente documento, se entiende que la célula entra en contacto directo con el respectivo agente, por ejemplo, el éster de ácido carboxílico o un intercambiador catiónico líquido, por ejemplo, sin que estén intercaladas barreras físicas tales como membranas porosas o similares. La puesta en contacto tiene lugar en el caso más sencillo porque el agente, por ejemplo, el éster de ácido carboxílico o el intercambiador catiónico líquido, se añade a una disolución acuosa, en la que se encuentra la célula.

10 Como disolución acuosa pueden usarse todas las disoluciones a base de agua, que son adecuadas para la obtención o el cultivo de la célula y/o su actividad necesaria para la conversión del éster de ácido carboxílico. Entre ellas se encuentran igualmente medios de cultivo para microorganismos, entre ellos medios completos tales como medios LB, medios mínimos tales como medios M9, así como medios selectivos, por ejemplo, aquellos que presenta una alta concentración de sal y por tanto solo posibilitan el crecimiento de organismos halófilos o al menos halotolerantes. Por ejemplo, este es un medio mínimo, que contiene el menor número posible de componentes que pueden separarse fácilmente del producto de la conversión del éster de ácido carboxílico, para facilitar el procesamiento del producto.

15 Siempre que el producto de la conversión prevista presente una hidrofobicidad suficiente y una carga adecuada, resulta apropiada una extracción en una etapa b) mediante la puesta en contacto de la disolución acuosa con una disolución orgánica hidrófoba que comprende un intercambiador catiónico. Modos de proceder adecuados se describen en la solicitud de patente internacional WO 2012/110124 o en la solicitud de patente europea EP12181153.3. Resumiendo, la disolución acuosa puede ponerse en contacto durante o tras la conversión con una disolución hidrófoba que comprende un éster de ácido graso como disolvente y un ácido graso, preferiblemente un ácido graso insaturado.

20 Durante el ajuste de la temperatura y de las condiciones en la etapa a) deben tenerse en cuenta las demandas de la célula, de la reacción de conversión y de las enzimas necesarias. Las demandas de temperatura de diferentes células importantes desde el punto de vista biotecnológico pueden extraerse de manuales de microbiología y de biología molecular, por ejemplo, Fuchs/Schlegel, Allgemeine Mikrobiologie, 2008, o determinarse mediante ensayos de crecimiento en el marco de trabajos rutinarios. En una forma de realización preferida, el valor de pH del medio de cultivo acuoso en el momento de la puesta en contacto se encuentra a entre 4 y 9, por ejemplo, entre 4,5 y 8,5, o entre 6,5 y 7,5. Por ejemplo, la temperatura se encuentra a entre 0 y 45°C, por ejemplo, entre 15 y 40°C, o entre 20 y 37°C.

25 Preferiblemente, para el procedimiento según la invención se usa una célula, que expresa una alcano hidroxilasa recombinante, estando reducida la actividad de un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo con respecto al tipo silvestre de la célula. Por ejemplo, en el caso de la alcano hidroxilasa se trata de una citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153. Por ejemplo, por el término “citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153” se entiende una oxidasa citosólica, que forma parte de un sistema de 3 componentes, que comprende además una ferredoxina y una ferredoxina reductasa, con un sitio de unión a alcano y la capacidad de hidroxilar alcanos. Por ejemplo, se trata de una enzima, que presenta en al menos el 80, por ejemplo el 90, o el 95 o el 99 por ciento una identidad de secuencia con la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código de base de datos YP\_691921) o de una enzima, que comprende una secuencia de polipéptidos, que presenta al menos el 80, por ejemplo, el 90 o 95 o 99 por ciento de identidad de secuencia con la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código de base de datos YP\_691921) y además presenta actividad alcano hidroxilasa. A este respecto, dichos códigos de base de datos se refieren, tal como en toda esta solicitud, a las bases de datos del NCB (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EE. UU.)l, más exactamente la versión disponible en línea el 8 de noviembre de 2012. Por ejemplo, por el término “actividad alcano hidroxilasa”, tal como se usa en el presente documento debe entenderse la capacidad de catalizar la hidroxilación de alcanos o restos alquilo lineales no sustituidos que comprenden al menos seis, por ejemplo, doce restos hidrocarbonados. Por ejemplo, por el término “citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153” se entiende una oxidasa no unida a membrana, que comprende un sitio de unión para alcanos, restos alquilo lineales no sustituidos que comprenden al menos cinco, por ejemplo, doce restos hidrocarbonados o alcanos monohidroxilados y su cadena polipeptídica el motivo LL(I/L)(V/I)GGNDTTRN. Por ejemplo, en el caso de una “citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153”, tal como se usa en el presente documento, se trata de una citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código de base de datos YP\_691921) o una variante que presenta, por ejemplo, actividad alcano hidroxilasa.

30 En el caso de las enzimas usadas según la invención se trata, por ejemplo, de enzimas recombinantes. Por ejemplo, por el término “recombinante”, tal como se usa en el presente documento, se entiende que la molécula de ácido nucleico correspondiente no aparece en la célula natural y/o se ha producido usando métodos de técnica genética. Se habla de una proteína recombinante, cuando el polipéptido correspondiente se codifica por un ácido nucleico

recombinante. Por ejemplo, por una célula recombinante, tal como se usa en el presente documento, se entiende una célula que presenta al menos un ácido nucleico recombinante o un polipéptido recombinante. El experto en la técnica conoce procedimientos adecuados para la producción de células o moléculas recombinantes, por ejemplo, los descritos en Sambrook/Fritsch/Maniatis (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición. Las enzimas recombinantes, por ejemplo, se sobreexpresan usando, por ejemplo, sistemas de vectores pET o pGEX, que el experto en la técnica conoce. Para el abastecimiento óptimo de la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 con electrones del agente reductor, por ejemplo, NADH, la célula puede expresar la monooxigenasa junto con ferredoxina reductasa que interacciona funcionalmente con la misma y ferredoxina que interacciona funcionalmente con la misma. A este respecto, puede tratarse de polipéptidos aislados o en el caso de usar un catalizador de célula completa de polipéptidos coexpresados o de polipéptidos fusionados de manera N- o C-terminal con la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153. Si una ferredoxina reductasa o una ferredoxina interaccionan funcionalmente entre sí con una citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 dada lo puede establecer el experto en la técnica fácilmente en función de si el agente reductor se oxida en presencia de un sustrato de alcano y de los tres polipéptidos. Alternativamente puede usarse la prueba enzimática descrita por Scheps, D., Malca, H., Hoffmann, B., Nestl, B. M. y Hauer, B. (2011) *Org. Biomol. Chem.*, 9, 6727, que en el caso de polipéptidos que interaccionan funcionalmente muestra un claro aumento de la velocidad de reacción. Por ejemplo, la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153, la ferredoxina y la ferredoxina reductasa proceden del mismo organismo. Por ejemplo, se trata de la ferredoxina reductasa de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código de base de datos YP\_691923) o una variante de la misma, la ferredoxina de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código de base de datos YP\_691920) o una variante de la misma y la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código de base de datos YP\_691921) o una variante de la misma.

En un ejemplo adicional, en el caso de la alcano hidroxilasa se trata de una AlkB-monooxigenasa. AlkB representa una oxidorreductasa dada a conocer en primer lugar por el sistema AlkBGT de *Pseudomonas putida* Gpo1, que depende de dos polipéptidos adicionales, AlkG y AlkT. AlkT se caracteriza como rubredoxina reductasa dependiente de FAD, que transmite electrones de NADH a AlkG. En el caso de AlkG se trata de una rubredoxina, una proteína redox que contiene hierro, que actúa como donador de electrones directo para AlkB. Por ejemplo, por el término "AlkB-monooxigenasa" se entiende un polipéptido con una homología de secuencia de al menos el 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98 o 99% con la secuencia del AlkB de *Pseudomonas putida* Gpo1 (código de base de datos: CAB54050.1; este código de base de datos procede como todos los demás usados en la solicitud del estado de la técnica, concretamente de la base de datos del NCBI, más exactamente de la versión disponible en línea el 15 de octubre de 2012) con la capacidad de oxidar alcanos. Por ejemplo, en el caso de la AlkB-monooxigenasa se trata de una oxidorreductasa que oxida alcanos, que actúa conjuntamente desde el punto de vista funcional con los polipéptidos AlkG (CAB54052.1) y AlkT (CAB54063.1) de *Pseudomonas putida* Gpo1. Para el abastecimiento óptimo de la AlkB-alcano hidroxilasa con electrones, la célula puede expresar la monooxigenasa junto con proteínas auxiliares que interaccionan funcionalmente con la misma, por ejemplo, AlkG y/o AlkT o en cada caso variantes de las mismas, tratándose, por ejemplo, a su vez de polipéptidos AlkG (CAB54052.1) y AlkT (CAB54063.1) de *Pseudomonas putida* Gpo1.

La capacidad de la célula usada en el procedimiento según la invención para la oxidación de sustratos puede reforzarse al expresar la célula alternativa o adicionalmente a la alcano hidroxilasa una alcohol deshidrogenasa.

Por ejemplo, por el término "alcohol deshidrogenasa", tal como se usa en el presente documento, se entiende una enzima, que oxida un aldehído o cetona para dar el alcohol primario o secundario correspondiente. Los ejemplos comprenden las alcohol deshidrogenasas de *Ralstonia eutropha* (ACB78191.1), *Lactobacillus brevis* (YP\_795183.1), *Lactobacillus kefirii* (ACF95832.1), de hígado de caballo, de *Paracoccus pantotrophus* (ACB78182.1) y *Sphingobium yanoikuyae* (EU427523.1) así como las respectivas variantes de los mismos.

En el caso de usar un catalizador de célula completa puede plantearse el problema de que un sustrato tenga que ponerse en contacto con una enzima localizada intracelularmente, para que se produzca la reacción deseada. En el caso de alcanos de cadena larga y derivados de los mismos se prefiere que el catalizador de célula completa presente un polipéptido de la familia AlkL. Por ejemplo, en el caso del "polipéptido de la familia AlkL", tal como se usa en el presente documento, se trata de un polipéptido, que a lo largo de una longitud de 230 aminoácidos consecutivos presenta al menos el 80, por ejemplo 90, o el 90% de identidad de secuencia con AlkL de *Pseudomonas putida* (código de base de datos CAB69081) o una variante de AlkL de *Pseudomonas putida* y, por ejemplo, presenta la capacidad de respaldar la importación de alcanos de cadena larga al interior de una célula. En un ejemplo adicional, en el caso de un "polipéptido de la familia AlkL", tal como se usa en el presente documento, se trata de un polipéptido localizado en la membrana externa de una bacteria Gram-negativa, que presenta el motivo de secuencia DXWAPAXQ(V/A)GXR, representando X un aminoácido proteinogénico, y es, por ejemplo, adicionalmente AlkL de *Pseudomonas putida* (código de base de datos CAB69081) o una variante del mismo. Miembros a modo de ejemplo de la familia AlkL comprenden AlkL de *Pseudomonas putida* (código de base de datos CAB69081), *Marinobacter aquaeolei* VT8 (código de base de datos YP\_957722), *Oceanicaulis alexandrii* HTCC2633 (código de base de datos ZP\_00953584), *Marinobacter manganoxydans* Mnl7-9 (código de base de datos ZP\_09158756), *Caulobacter* sp. K31 (código de base de datos YP\_001672217), *Pseudomonas oleovorans* (código de base de datos Q00595) y variantes de los mismos.

La enseñanza de la presente invención puede implementarse no solo usando macromoléculas con la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico exacta, a la que se hace referencia en el presente documento, o no solo usando una célula con una actividad reducida relativamente con respecto al respectivo tipo silvestre de un polipéptido con la secuencia de aminoácidos exacta, a la que se hace referencia en el presente documento, sino también usando una variante de tales macromoléculas o una célula con una actividad reducida relativamente con respecto al respectivo tipo silvestre de la respectiva célula de una variante del polipéptido, que puede obtenerse mediante delección, adición o sustitución de uno o más de un aminoácido o ácido nucleico.

Según la invención, el término “variante” de una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos, usada en lo sucesivo con el mismo significado y de manera intercambiable con el término “homólogo”, tal como se usa en el presente documento, significa otra secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos, que en cuanto a la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de tipo silvestre original correspondiente presenta una homología, usada en el presente documento con el mismo significado que identidad, del 90, 92, 94, 96, 98, 99% o más por ciento, estando delecionados o sustituidos también otros aminoácidos distintos a los que configuran el centro catalíticamente activo o los aminoácidos esenciales para la estructura o el plegado o aquellos están sustituidos únicamente de manera conservativa, por ejemplo, un glutamato en lugar de un aspartato o una leucina en lugar de una valina. El estado de la técnica describe algoritmos, que pueden usarse para calcular el grado de homología de dos secuencias, por ejemplo, Arthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, 3ª edición. Según la invención, la variante de una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico, además de la homología de secuencia mencionada anteriormente, presenta esencialmente la misma actividad enzimática de la molécula de tipo silvestre o de la molécula original. Por ejemplo, una variante de un polipéptido activo enzimáticamente como proteasa presenta la misma o esencialmente la misma actividad proteolítica que la enzima polipeptídica, es decir la capacidad de catalizar la hidrólisis de un enlace peptídico. Por ejemplo, el término “esencialmente la misma actividad enzimática” significa una actividad en cuanto a los sustratos del polipéptido de tipo silvestre, que se encuentra claramente por encima de la actividad básica de referencia y/o se diferencia en menos de 3, por ejemplo, 2, o un orden de magnitud de los valores de  $K_M$  y/o  $k_{cat}$ , que presenta el polipéptido de tipo silvestre en cuanto a los mismos sustratos. Por ejemplo, el término “variante” de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos comprende al menos una parte/fragmento activo de la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos. Por ejemplo, el término “parte activa”, tal como se usa en el presente documento, significa una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico, que presenta una longitud menor que la completa de la secuencia de aminoácidos o codifica para una longitud menor que la completa de la secuencia de aminoácidos, presentando la secuencia de aminoácidos o la secuencia de aminoácidos codificada con menor longitud que la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre esencialmente la misma actividad enzimática que el polipéptido de tipo silvestre o una variante del mismo, por ejemplo, como proteasa. Por ejemplo, el término “variante” de un ácido nucleico comprende un ácido nucleico, cuya hebra complementaria, por ejemplo, en condiciones rigurosas, se une al ácido nucleico de tipo silvestre. La rigurosidad de la reacción de hibridación puede determinarse fácilmente el experto en la técnica y depende en general de la longitud de la sonda, las temperaturas durante el lavado y la concentración de sal. En general, sondas más largas necesitan mayores temperaturas para la hibridación, mientras que sondas más cortas tienen suficiente con menores temperaturas. Si la hibridación tiene lugar o no depende en general de la capacidad del ADN desnaturalizado de hibridarse con hebras complementarias, que están presentes en su entorno, concretamente por debajo de la temperatura de fusión. La rigurosidad de la reacción de hibridación y condiciones correspondientes se describen más detalladamente en F M Ausubel (1995), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. Instrucciones para la identificación de secuencias de ADN por medio de hibridación las encuentra el experto en la técnica, entre otros, en el manual “The DIG System Users Guide for Filter Hybridization” de la empresa Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en Liebl *et al.* (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar, por ejemplo, en condiciones rigurosas, es decir, solo se forman híbridos, en los que la sonda y la secuencia diana, es decir los polinucleótidos tratados con la sonda, son idénticos en al menos el 70%. Se conoce que la rigurosidad de la hibridación incluyendo las etapas de lavado puede verse influenciada o determinarse mediante la variación de la composición de tampón, de la temperatura y de la concentración de sal. La reacción de hibridación se realiza en general a una rigurosidad relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, R. U., 1996). Para la reacción de hibridación puede utilizarse, por ejemplo, un tampón correspondiente al tampón 5x SSC a una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C. A este respecto, las sondas también pueden hibridarse con polinucleótidos, que presentan una identidad de menos del 70% con la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables y se eliminan mediante lavado en condiciones rigurosas. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la disminución de la concentración de sal hasta 2x SSC y dado el caso a continuación 0,5x SSC (The DIG System User’s Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C, aproximadamente 52°C - 68°C, aproximadamente 54°C - 68°C, aproximadamente 56°C - 68°C, aproximadamente 58°C - 68°C, aproximadamente 60°C - 68°C, aproximadamente 62°C - 68°C, aproximadamente 64°C - 68°C, aproximadamente 66°C - 68°C. Los intervalos de temperatura pueden ser de aproximadamente 64°C - 68°C o aproximadamente 66°C - 68°C. Dado el caso es posible disminuir la concentración de sal hasta una concentración correspondiente a 0,2 x SSC o 0,1 x SSC. Mediante el aumento por etapas de la temperatura de hibridación en etapas de aproximadamente 1 - 2°C desde 50°C hasta 68°C pueden aislarse fragmentos de polinucleótidos, que presentan una identidad de, por ejemplo, al menos el 70% o al menos el 80% o al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al

menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% con la secuencia de la molécula de ácido nucleico utilizada. Instrucciones adicionales para la hibridación pueden obtenerse en forma de denominados kits en el mercado (por ejemplo, DIG Easy Hyb de la empresa Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n.º de catálogo 1603558). Por ejemplo, el término "variante" de un ácido nucleico, tal como se usa en el presente documento, comprende cualquier secuencia de ácido nucleico, que codifica para la misma secuencia de aminoácidos que el ácido nucleico original o una variante de esta secuencia de aminoácidos en el marco de la capacidad de degeneración del código genético.

En una forma de realización preferida, la célula usada según la invención presenta una actividad reducida con respecto a su tipo silvestre de al menos una enzima, que cataliza una de las reacciones de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, tratándose preferiblemente de una enzima del grupo que comprende ácido graso-CoA-ligasa, acil-CoA-deshidrogenasa, 2,4-dienoil-CoA-reductasa, enoil-CoA-hidratasa y 3-cetoacil-CoA-tiolasa, un importador de ácidos grasos o variantes de los mismos, de manera especialmente preferible de FadL o una variante del mismo. La  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos es una ruta metabólica muy extendida, que permite igualmente a organismos procariontes y eucariotas oxidar ácidos grasos y poner a disposición la energía química contenida en los mismos para el metabolismo. En un sentido adicional, comienza con la absorción de un ácido graso en la célula, en el caso de *E. coli* mediante el transpondedor FadL, que la hace pasar a través de la membrana externa o interna de la célula bacteriana Gram-negativa y el producto génico FadD, que libera el ácido graso en forma del éster de CoA al citosol. Allí se oxida el ácido graso, siempre que las condiciones lo requieran, en primer lugar en la posición  $\beta$  del éster de ácido graso de CoA mediante una acil-CoA-deshidrogenasa, en el caso de *E. coli* FadE. Una molécula similar puede formarse alternativamente también a partir de un ácido graso insaturado doblemente mediante la reducción por medio de una 2,4-dienoil-CoA-reductasa, en el caso de *E. coli* FadH. Una enzima multifuncional, la enoil-CoA-hidratasa/3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa, en el caso de *E. coli* FadB, cataliza a continuación la hidratación con la formación del alcohol secundario y su oxidación posterior para dar cetona. En la última etapa, una 3-cetoacil-CoA-tiolasa, en el caso de *E. coli* FadA, cataliza la escisión de la cetoacil-CoA con el resultado de que se liberan acetil-CoA y un éster de CoA del ácido graso acortado en dos átomos de carbono en comparación con la molécula de partida. Siempre que no se trata igualmente de acetil-CoA, está última puede alimentarse de nuevo al ciclo de  $\beta$ -oxidación y acortarse con oxidación. En la regulación de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos también está implicado FadR, un regulador del operón Fad, que comprende los genes necesarios para la degradación de ácidos grasos, sin que FadR catalice una reacción de la  $\beta$ -oxidación. Por ejemplo, por el término "enzima, que cataliza una de las reacciones de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos" se entiende cualquier enzima, que interacciona directamente con el sustrato de ácido graso o una molécula generada a partir del mismo en la ruta a la acetil-CoA, por ejemplo, lo reconoce como sustrato, y cataliza su conversión para dar un producto metabólico que se encuentra en esta ruta de degradación más cerca de la acetil-CoA, por ejemplo, incluyendo el importador de ácidos grasos, que lleva a cabo la absorción del ácido graso en la célula. Por ejemplo, según la definición anterior, a estas enzimas pertenece la acil-CoA-deshidrogenasa, dado que interacciona con el éster de ácido graso-CoA y cataliza su conversión para dar enoil-CoA, que en la ruta metabólica de la  $\beta$ -oxidación se encuentra más cerca de la acetil-CoA que el éster de ácido graso-CoA. Por ejemplo, por el término "enzima, que cataliza una de las reacciones de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos", tal como se usa en el presente documento, se entiende cualquier enzima del grupo que comprende los productos génicos FadA, FadB, FadD, FadL y FadE de *E. coli* y/o sus variantes u homólogos de otros organismos. Los productos génicos FadA, FadB, FadD, FadL y FadE de *E. coli* así como variantes y homólogos de numerosos organismos útiles en biotecnología adicionales y sus secuencias de ácido nucleico y de polipéptidos se describen en el estado de la técnica, por ejemplo, FadA con el número de registro AP009048.1, FadB con el número de registro BAE77457.1, FadD con el número de registro BAA15609.1, FadE con el número de registro BAA77891.2 y FadL con el número de registro BAA 16205.1.

En una forma de realización preferida adicional, la célula según la invención o usada en el procedimiento según la invención expresa una transaminasa. Por ejemplo, por el término "transaminasa", tal como se usa en el presente documento, se entiende una enzima, que cataliza la transmisión de grupos  $\alpha$ -amino de una molécula donadora, por ejemplo, un aminoácido, a una molécula aceptora, preferiblemente un ácido  $\alpha$ -cetocarboxílico. Por ejemplo, puede usarse una transaminasa del grupo que comprende 3HMU\_A, AAD41041.1, AAK15486.1, ABE03917.1, ADR60699.1, ADR61066.1, ADR62525.1, AEL07495.1, CAZ86955.1, EFW82310.1, EFW87681.1, EGC99983.1, EGD03176.1, EGE58369.1, EGH06681.1, EGH08331.1, EGH24301.1, EGH32343.1, EGH46412.1, EGH55033.1, EGH62152.1, EGH67339.1, EGH70821.1, EGH71404.1, EGH78772.1, EGH85312.1, EGH97105.1, EGP57596.1, NP\_102850.1, NP\_106560.1, NP\_248912.1, NP\_248990.1, NP\_354026.2, NP\_421926.1, NP\_637699.1, NP\_642792.1, NP\_744329.1, NP\_744732.1, NP\_747283.1, NP\_795039.1, NP\_901695.1 (, XP\_002943905.1, YP\_001021095.1, YP\_001059677.1, YP\_001061726.1, YP\_001066961.1, YP\_001074671.1, YP\_001120907.1, YP\_001140117.1, YP\_001170616.1, YP\_001185848.1, YP\_001188121.1, YP\_001233688.1, YP\_001268866.1, YP\_001270391.1, YP\_001345703.1, YP\_001412573.1, YP\_001417624.1, YP\_001526058.1, YP\_001579295.1, YP\_001581170.1, YP\_001668026.1, YP\_001669478.1, YP\_001671460.1, YP\_001685569.1, YP\_001747156.1, YP\_001749732.1, YP\_001765463.1, YP\_001766294.1, YP\_001790770.1, YP\_001808775.1, YP\_001809596.1, YP\_001859758.1, YP\_001888405.1, YP\_001903233.1, YP\_001977571.1, YP\_002229759.1, YP\_002231363.1, YP\_002280472.1, YP\_002297678.1, YP\_002543874.1, YP\_002549011.1, YP\_002796201.1, YP\_002801960.1, YP\_002875335.1, YP\_002897523.1, YP\_002912290.1, YP\_002974935.1, YP\_003060891.1, YP\_003264235.1, YP\_003552364.1, YP\_003578319.1, YP\_003591946.1, YP\_003607814.1, YP\_003641922.1, YP\_003674025.1, YP\_003692877.1, YP\_003755112.1, YP\_003896973.1, YP\_003907026.1, YP\_003912421.1, YP\_004086766.1,

YP\_004142571.1, YP\_004147141.1, YP\_004228105.1, YP\_004278247.1, YP\_004305252.1, YP\_004356916.1,  
 YP\_004361407.1, YP\_004378186.1, YP\_004379856.1, YP\_004390782.1, YP\_004472442.1, YP\_004590892.1,  
 YP\_004612414.1, YP\_004676537.1, YP\_004693233.1, YP\_004701580.1, YP\_004701637.1, YP\_004704442.1,  
 5 YP\_108931.1, YP\_110490.1, YP\_168667.1, YP\_237931.1, YP\_260624.1, YP\_262985.1, YP\_271307.1,  
 YP\_276987.1, YP\_334171.1, YP\_337172.1, YP\_350660.1, YP\_351134.1, YP\_364386.1, YP\_366340.1,  
 YP\_369710.1, YP\_370582.1, YP\_426342.1, YP\_440141.1, YP\_442361.1, YP\_468848.1, YP\_521636.1,  
 YP\_554363.1, YP\_608454.1, YP\_610700.1, YP\_614980.1, YP\_622254.1, YP\_625753.1, YP\_680590.1,  
 YP\_751687.1, YP\_767071.1, YP\_774090.1, YP\_774932.1, YP\_788372.1, YP\_858562.1, YP\_928515.1,  
 YP\_983084.1, YP\_995622.1, ZP\_00948889.1, ZP\_00954344.1, ZP\_00959736.1, ZP\_00998881.1, ZP\_01011725.1,  
 10 ZP\_01037109.1, ZP\_01058030.1, ZP\_01076707.1, ZP\_01103959.1, ZP\_01167926.1, ZP\_01224713.1,  
 ZP\_01442907.1, ZP\_01446892.1, ZP\_01550953.1, ZP\_01625518.1, ZP\_01745731.1, ZP\_01750280.1,  
 ZP\_01754305.1, ZP\_01763880.1, ZP\_01769626.1, ZP\_01865961.1, ZP\_01881393.1, ZP\_01901558.1,  
 ZP\_02145337.1, ZP\_02151268.1, ZP\_02152332.1, ZP\_02167267.1, ZP\_02190082.1, ZP\_02242934.1,  
 ZP\_02360937.1, ZP\_02367056.1, ZP\_02385477.1, ZP\_02456487.1, ZP\_02883670.1, ZP\_03263915.1,  
 15 ZP\_03263990.1, ZP\_03400081.1, ZP\_03452573.1, ZP\_03456092.1, ZP\_03517291.1, ZP\_03529055.1,  
 ZP\_03571515.1, ZP\_03572809.1, ZP\_03587785.1, ZP\_03588560.1, ZP\_03697266.1, ZP\_03697962.1,  
 ZP\_04521092.1, ZP\_04590693.1, ZP\_04890914.1, ZP\_04891982.1, ZP\_04893793.1, ZP\_04902131.1,  
 ZP\_04905327.1, ZP\_04941068.1, ZP\_04944536.1, ZP\_04945255.1, ZP\_04959332.1, ZP\_04964181.1,  
 ZP\_05053721.1, ZP\_05063588.1, ZP\_05073059.1, ZP\_05077806.1, ZP\_05082750.1, ZP\_05091128.1,  
 20 ZP\_05095488.1, ZP\_05101701.1, ZP\_05116783.1, ZP\_05121836.1, ZP\_05127756.1, ZP\_05637806.1,  
 ZP\_05742087.1, ZP\_05783548.1, ZP\_05786246.1, ZP\_05843149.1, ZP\_05945960.1, ZP\_06459045.1,  
 ZP\_06487195.1, ZP\_06492453.1, ZP\_06493162.1, ZP\_06703644.1, ZP\_06731146.1, ZP\_06839371.1,  
 ZP\_07007312.1, ZP\_07266194.1, ZP\_07374050.1, ZP\_07662787.1, ZP\_07778196.1, ZP\_07797983.1,  
 ZP\_08099459.1, ZP\_08138203.1, ZP\_08141719.1, ZP\_08142973.1, ZP\_08177102.1, ZP\_08185821.1,  
 25 ZP\_08186468.1, ZP\_08208888.1, ZP\_08266590.1, ZP\_08402041.1, ZP\_08406891.1, ZP\_08522175.1,  
 ZP\_08527488.1, ZP\_08631252.1, ZP\_08636687.

En una forma de realización preferida adicional, la célula usada en el procedimiento según la invención expresa una  
 30 alanina deshidrogenasa. Por ejemplo, por el término "alanina deshidrogenasa", tal como se usa en el presente  
 documento, se entiende una enzima, que cataliza la transformación de L-alanina consumiendo agua y NAD<sup>+</sup> para  
 dar piruvato, amoníaco y NADH. Por ejemplo, pueden usarse las alanina deshidrogenasas del grupo que comprende  
 la alanina deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* (código de base de datos L20916), *Rhizobium leguminosarum* (código  
 de base de datos CP001622), *Vibrio proteolyticus* (código de base de datos AF070716), *Mycobacterium tuberculosis*  
 (código de base de datos X63069), *Enterobacter aerogenes* (código de base de datos AB013821), EGR93259.1,  
 35 YP\_003654745.1, YP\_003651439.1, YP\_003637111.1, YP\_003631815.1, YP\_001327051.1, YP\_001262560.1,  
 YP\_886996.1, YP\_882850.1, YP\_704410.1, YP\_703508.1, ZP\_08624689.1, YP\_001230376.1, P17557.1, P17556.1,  
 CCB94892.1, CCB73698.1, YP\_001168635.1, YP\_004668736.1, YP\_004569425.1, YP\_003513168.1,  
 YP\_004561169.1, ZP\_08554945.1, YP\_400777.1, ZP\_08311476.1, ZP\_08310170.1, ZP\_08267322.1,  
 ZP\_08263846.1, ZP\_07898723.1, YP\_149301.1, YP\_148605.1, YP\_004340432.1, EFT09946.1, EFS80513.1,  
 40 EFS51332.1, EFS42459.1, YP\_003060895.1, YP\_003059033.1, ZP\_03305373.1, YP\_847214.1, YP\_004095847.1,  
 YP\_003338282.1, YP\_003337256.1, YP\_355846.1, YP\_253131.1, ZP\_08197563.1, ZP\_08196283.1, ADW06447.1,  
 YP\_734091.1, NP\_372233.1, NP\_102173.1, ZP\_08170259.1, EGD36706.1, EGD32748.1, ZP\_08155540.1,  
 YP\_004142849.1, YP\_002417649.1, YP\_001301040.1, YP\_002992892.1, YP\_081348.1, YP\_080482.1,  
 YP\_002476349.1, ZP\_08115025.1, ZP\_08114403.1, YP\_003552869.1, YP\_002358112.1, YP\_575010.1,  
 45 YP\_477594.1, YP\_474564.1, YP\_130399.1, YP\_129373.1, YP\_123314.1, NP\_810467.1, NP\_646469.1,  
 NP\_626044.1, NP\_391071.1, ZP\_08086822.1, ZP\_08084776.1, ZP\_08083119.1, ZP\_08020768.1, ZP\_08013590.1,  
 ZP\_08011832.1, YP\_003783744.1, YP\_002781576.1, YP\_002780533.1, ZP\_02195873.1, NP\_797482.1,  
 ZP\_07645051.1, ZP\_07643260.1, ZP\_06611917.1, AAT40119.1, ZP\_07864946.1, YP\_004068409.1,  
 YP\_002796203.1, YP\_002774420.1, YP\_003600348.1, YP\_003599946.1, YP\_003565624.1, YP\_003565223.1,  
 50 YP\_335198.1, YP\_423850.1, YP\_155059.1, ZP\_07843538.1, ZP\_07841226.1, ZP\_06928932.1, ZP\_05692073.1,  
 ZP\_05687006.1, ZP\_04867480.1, YP\_775531.1, CBE70214.1, ZP\_07721182.1, ZP\_04302850.1, ZP\_04298961.1,  
 ZP\_04287684.1, ZP\_04277177.1, ZP\_04248389.1, ZP\_04235899.1, ZP\_02159718.1, ZP\_02152178.1,  
 YP\_003974610.1, YP\_003546595.1, YP\_002317127.1, ZP\_07313778.1, ZP\_07302778.1, ZP\_07298850.1,  
 CBK69442.1, YP\_003413835.1, YP\_003595089.1, ZP\_06807811.1, YP\_003582455.1, YP\_003464731.1,  
 55 YP\_003496397.1, YP\_003421918.1, CBL07274.1, CBK64956.1, YP\_003508515.1, AAL87460.1, AAC23579.1,  
 AAC23578.1, AAC23577.1, ACU78652.1, YP\_003471439.1, YP\_003452777.1, ZP\_06384971.1, ACY25368.1,  
 ABC26869.1, AAP44334.1, EEZ80018.1, ZP\_05110458.1, 1PJB\_A, ZP\_04717201.1, ZP\_04689103.1, CAO90307.1,  
 CAM75354.1, CAA44791.1, BAA77513.1, EGR96638.1, EGL90046.1, YP\_004510847.1, ZP\_08450330.1,  
 YP\_003387804.1, YP\_003058152.1, EFS74272.1, EFS67128.1, ZP\_06844564.1, YP\_826658.1, YP\_001195249.1,  
 60 YP\_003095978.1, YP\_469292.1, YP\_004442054.1, YP\_004461174.1, YP\_004055616.1, YP\_003576656.1,  
 YP\_003094537.1, YP\_001295973.1, AEE71143.1, YP\_004447480.1, YP\_003761844.1, YP\_040853.1,  
 YP\_003154888.1, YP\_003142045.1, YP\_002280953.1, NP\_371963.1, NP\_422368.1, EGC98966.1, EGC76398.1,  
 YP\_004263661.1, YP\_004252039.1, YP\_679036.1, YP\_499973.1, ZP\_08054972.1, ZP\_08053009.1,  
 ZP\_04067276.1, ZP\_03968868.1, ZP\_03963857.1, ZP\_03933079.1, ZP\_03497046.1, ZP\_06668924.1,  
 65 ZP\_06667106.1, ZP\_06324464.1, ZP\_06196777.1, ZP\_05114159.1, ZP\_05083968.1, ZP\_05070370.1,  
 ZP\_05030022.1, ZP\_04673064.1, ZP\_03517011.1, ZP\_03505783.1, XP\_001310698.1, ABK27691.1 o CAB59281.2.

Para el caso en el que la célula expresa una alanina deshidrogenasa, resulta ventajoso añadir una fuente de nitrógeno inorgánico, preferiblemente una sal de amonio tal como cloruro de amonio o sulfato de amonio, en una cantidad suficiente a la disolución acuosa. Un procedimiento para aumentar la concentración de alanina se describe en el documento EP12162846.5.

Un aspecto de la presente invención prevé el uso de una desactivación de un gen que codifica para un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo como parte de la dotación genética de una célula recombinante para aumentar la producción de un éster de ácido carboxílico de fórmula (I). Esto significa que la desactivación de un gen que codifica para un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo como característica de la célula se llevó a cabo con el propósito de aumentar el rendimiento, el balance de carbono y/o de nitrógeno y/o la pureza del producto de la conversión del éster de ácido carboxílico de fórmula (I).

Se da a conocer una célula, en cuyo caso se trata de una célula de *E. coli*, que presenta una desactivación del polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o de una variante así como del polipéptido FadL en el genoma de la célula, expresando la célula además una alcano hidroxilasa, preferiblemente AlkB de *Pseudomonas putida*, una transaminasa, preferiblemente la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, una alanina deshidrogenasa, por ejemplo, la alanina deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*, y AlkL de *Pseudomonas putida*. Esta célula se pone en contacto, por ejemplo, en una disolución acuosa con un éster de ácido graso, por ejemplo, éster metílico del ácido láurico.

Figuras:

La figura 1 muestra la productividad de ácido omega-aminoláurico de diferentes cepas

### Ejemplo 1 (no según la invención)

Inactivación de *bioH* en *E. coli* W3110 y BW25113

Para la desactivación dirigida del gen *bioH* (b3412, SEQ ID 1) con el vector de base pKO3\_E933 se necesitó un nuevo plásmido. La base es el vector pKO3\_E933 (SEQ ID 14), se utilizaron 500 pb en el sentido de 5' (SEQ ID 3) o 500 pb en el sentido de 3' del gen *bioH* (SEQ ID 4), que se encuentran separados de un sitio de corte *PspXI* (CCTCGAGG). El plásmido acabado porta la denominación interna AHp-LL-42 (SEQ ID 5). Para la fabricación se usaron los siguientes oligonucleótidos:

o-LL-314, SEQ ID 6 5'-CCGGGGATCGCGGCCCGGCTTCGCTATCCCATTGGCAGT-3'

o-LL-315, SEQ ID 7 5'-CCTCTGCTTCAACGCCCTCGAGGCATCCGCTATTGTTCTCTTTTGACTTACAAGGATG-3'

o-LL-316, SEQ ID 8 5'-GCGTTGAAGCAGAGGGTGTAGGTG-3'

o-LL-317, SEQ ID 9 5'-TAGAGGATCGCGGCCCAAAGTGGCAAGGCAGCTTTATGC-3'

Las regiones de 500 pb se pusieron a disposición con los cebadores anteriores a partir de ADN cromosómico existente de *E. coli* W3110 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se usaron o-LL-314 + o-LL-315 para la región en el sentido de 5' (SEQ ID 3) y o-LL-316 + o-LL-317 para la región en el sentido de 3' (SEQ ID 4). Se emplearon los siguientes parámetros para la PCR:

Desnaturalización inicial: 98°C, 10 s

30 x desnaturalización: 98°C, 10 s

30 x hibridación: 57,9/58,8/59,7/60,6/61,4/62,3/63,2/64,1°C (gradiente de temperatura)

30 x elongación: 72°C, 20 s

Elongación final: 72°C, 4 min

Para la multiplicación se usó la mezcla maestra 2x Phusion HF de New England Biolabs (NEB, M0531S) según las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR se purificaron en columna directamente en función de su grado de pureza (*QiaQuick PCR Purification Kit*, Qiagen, Hilden) o se purificaron a través de un gel de agarosa y se extrajeron (*QiaQuick Gel Extraction Kit*, Qiagen, Hilden). La realización de la PCR, de la electroforesis en gel de agarosa, la tinción con bromuro de etidio del ADN y la determinación de los tamaños de fragmentos de PCR tuvo lugar de la manera conocida por el experto en la técnica. En ambos casos pudieron proporcionarse fragmentos de PCR del tamaño esperado.

Los productos de PCR purificados se clonaron en el vector pKO3\_E933 cortado con *NotI* (SEQ ID 14) por medio de recombinación usando el kit de clonación In-Fusion HD según las instrucciones del fabricante (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, EE. UU.). La transformación de *E. coli* DH10 $\beta$  químicamente competente (New England Biolabs, Frankfurt) tuvo lugar de la manera conocida por el experto en la técnica. La inserción correcta de las secuencias diana se comprobó mediante análisis de restricción y se confirmó la autenticidad de las secuencias introducidas mediante secuenciación de ADN. El vector generado se designó con AHp-LL-42 (SEQ ID 5).

La construcción de la cepa *E. coli* W3110  $\Delta$ *bioH* tuvo lugar con ayuda del vector AHp-LL-42 (SEQ ID 5) con métodos conocidos por el experto en la técnica (véase Link AJ, Phillips D, Church GM. J.Bacteriol. 1997. 179(20).). Las cepas usadas en los experimentos BW25113 así como BW25113  $\Delta$ *bioH* (JW3375) se adquirieron comercialmente como parte de la colección Keio (véase Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, Tomoya Baba, Takeshi Ara, Miki Hasegawa, Yuki Takai, Yoshiko Okumura, Miki Baba, Kirill A Datsenko, Masaru Tomita, Barry L Wanner y Hirotsada Mori, Molecular Systems Biology (2006), 2006 EMBO and Nature Publishing Group). La cepa construida se siguió usando con la siguiente denominación:

Cepa	Descripción
AHs-LL-56	<i>E. coli</i> W3110 $\Delta$ <i>bioH</i> , clon 1.1

La secuencia de ADN de *bioH* tras la delección en W3110 se reproduce en SEQ ID 10.

## Ejemplo 2

**Producción de éster metílico del ácido aminoláurico mediante *E. coli* W3110 con delección en el gen *bioH* mediante la utilización de vectores de expresión para los genes *ald* de *Bacillus subtilis* y *Cv\_2025* de *Chromobacterium violaceum* en combinación con un vector de expresión para los genes *alkB*, *alkG*, *alkT* y *alkL* del operón *alk* de *Pseudomonas putida*.**

Para la generación de las cepas de *E. coli* con vectores de expresión para los genes *ald* de *Bacillus subtilis* (que codifica para una alanina deshidrogenasa, optimizada por codón para *E. coli*), *Cv\_2025* de *Chromobacterium violaceum* (que codifica para una transaminasa, optimizada por codón para *E. coli*) en combinación con un vector de expresión para los genes *alkB*, *alkG*, *alkT* (que codifican para una alcanos monooxigenasa, una rubredoxina y una rubredoxina reductasa) y *alkL* (que codifica para una proteína de membrana/de transporte) del operón *alk* de *Pseudomonas putida* se produjeron células electrocompetentes de *E. coli* W3110  $\Delta$ *bioH* así como la cepa de control correspondiente *E. coli* W3110. Esto tuvo lugar de manera conocida por el experto en la técnica. Las cepas se produjeron como se describen en el ejemplo 1. Estas se transformaron con los plásmidos pBT10\_alkL (SEQ ID 11 o documento WO/2011/131420 y la Seq ID NO: 8 expuesta en el mismo) y pJ294[alaDH\_Bs(co)TA\_Cv(co)] (SEQ ID 12 o ejemplo 1 del documento WO/2013/024114 y la SEQ ID NO. 17 expuesta en el mismo) y se sembraron en placas de LB-agar con kanamicina (50  $\mu$ g/ml) y ampicilina (100  $\mu$ g/ml). Los transformantes se comprobaron mediante preparación de plásmidos y análisis de restricción analítico de la presencia de los plásmidos correctos. De esta manera se construyeron las siguientes cepas:

Referencia de cepa	Plásmidos presentes
W3110	pBT10_alkL pJ294[alaDH_Bs(co)TA_Cv(co)]
W3110 $\Delta$ <i>bioH</i>	pBT10_alkL pJ294[alaDH_Bs(co)TA_Cv(co)]

Las cepas se sometieron a una fermentación alimentada por lotes, para analizar la capacidad para la producción de éster metílico del ácido hidroxiláurico, éster metílico del ácido oxoláurico, éster metílico del ácido carboxiláurico y éster metílico del ácido aminoláurico de éster metílico del ácido láurico. Esto se realizó con un sistema de fermentación paralela en 8 veces de la empresa DASGIP.

Para la fermentación se usaron reactores de 1 l. Las sondas de pH se calibraron por medio de una calibración de dos puntos con disoluciones de medida de pH 4,0 y pH 7,0. Los reactores se llenaron con 300 ml de agua potable y se sometieron a autoclave durante 20 min a 121°C, para garantizar la esterilidad. A continuación se polarizaron las sondas de pO<sub>2</sub> durante la noche (al menos durante 6 h) en el sistema DASGIP. A la mañana siguiente se extrajo el agua bajo el Clean Bench y se sustituyó por 300 ml de medio de alta densidad celular con 100 mg/l de ampicilina, 50 mg/l de kanamicina y 5 mg/l de tetraciclina. A continuación se calibraron las sondas de pO<sub>2</sub> con una calibración de un punto (agitador: 400 rpm / gasificación: 10 sl/h de aire) y se purificaron los tramos de alimentación, de agente de corrección y de agente de inducción por medio de Clean-in-Place. Para ello se lavaron los tubos flexibles con etanol al 70%, a continuación con NaOH 1 M, entonces con agua desmineralizada estéril y por último se llenó con los respectivos medios.

Las cepas de *E. coli* que producen ALS y ALSME se extrajeron en primer lugar de los respectivos criocultivos en medio LB (25 ml en un matraz Erlenmeyer de 100 ml) con 100 mg/l de ampicilina durante la noche a 37°C y 200 rpm

durante aproximadamente 18 h. A continuación se inocularon en cada caso 2 ml de los cultivos en medio de alta densidad celular (glucosa 15 g/l (30 ml/l de una disolución de cepa 500 g/l sometida a autoclave por separado con el 1% de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O y el 2,2% de NH<sub>4</sub>Cl), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,76 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 19,08 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12,5 g/l, extracto de levadura 6,66 g/l, citrato de trisodio dihidratado 2,24 g/l, disolución de citrato de amonio-hierro 17 ml/l de una disolución de cepa al 1% sometida a autoclave por separado, disolución de elementos traza 5 ml/l, disolución de cepa sometida a autoclave por separado (HCl (37%) 36,50 g/l, MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O 1,91 g/l, ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1,87 g/l, ácido etilendiaminotetraacético dihidratado 0,84 g/l, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,30 g/l, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0,25 g/l, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 4,70 g/l, FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 17,80 g/l, CuCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0,15 g/l)) (por cada cepa 25 ml en un matraz Erlenmeyer de 100 ml) con 100 mg/l de ampicilina, 50 mg/l de kanamicina y 5 mg/l de tetraciclina y se incubaron a 37°C/200 rpm durante 5,5 h más.

Los reactores se inocularon con una densidad óptica de 0,1 extrayendo un volumen correspondiente del cultivo previo en una jeringa de 5 ml (en condiciones estériles) e inoculando los reactores por medio de cánulas a través de un septo recubierto con etanol al 70%.

Se usó el siguiente programa convencional:

Regulador de DO		Regulador de pH	
Valor preestablecido	0%	Valor preestablecido	0 ml/h
P	0,1	P	5
Ti	300 s	Ti	200 s
Mín.	0%	Mín.	0 ml/h
Máx.	100%	Máx.	40 ml/h

N (rotación)	desde	hasta	XO <sub>2</sub> (mezcla de gases)	desde	hasta	F (flujo de gas)	desde	hasta
		0%		30%			0%	100%
Crecimiento y biotransformación	400 rpm	1500 rpm	Crecimiento y biotransformación	21%	21%	Crecimiento y biotransformación	6 sl/h	72 sl/h

Guion	
Desencadenante intenso	31% DO (1/60 h)
Inducción IPTG	2 h tras el inicio de la alimentación
Desencadenante de la alimentación	50% DO
Tasa de alimentación	3 [ml/h]

El experimento realizado puede dividirse en dos fases, el cultivo, en el que las células deben alcanzar una determinada densidad óptica, y la posterior biotransformación, en la que tras la adición del sustrato éster metílico del ácido láurico debe tener lugar una conversión a éster del ácido aminoláurico por las enzimas formadas en la expresión. Los valores de pH se regularon por un lado con amoníaco (12,5%) hasta pH 6,8. Durante el cultivo y la biotransformación se reguló el oxígeno disuelto (DO, *dissolved oxygen*) en el cultivo a través del número de revoluciones del agitador y la tasa de gasificación al 30%. La fermentación se realizó como alimentada por lotes, desencadenándose el inicio de la alimentación, alimentación de glucosa 5 g/lh (500 g/l de glucosa con el 1% de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O y el 2,2% de NH<sub>4</sub>Cl), a través de un pico de DO. Con el inicio de la alimentación se disminuyó también la temperatura desde 37°C previamente hasta 30°C. La expresión de la transaminasa, alanina deshidrogenasa y ácido graso reductasa se indujo 2 h tras el inicio de la alimentación mediante la adición automática de IPTG (1 mM). La inducción de los genes alk tuvo lugar mediante la adición manual de DCPK (al 0,025% v/v) 10 h tras el inicio de la alimentación. Antes del inicio de la biotransformación se determinó la densidad óptica de los caldos de cultivo.

El inicio de la fase de biotransformación tuvo lugar 14 h tras el inicio de la alimentación. Para ello se añadieron 150 ml de una mezcla de éster metílico del ácido láurico y el intercambiador iónico ácido oleico (técn. 90%) como lote al caldo de fermentación. Para poner a disposición un donador de grupos amino para la transaminasa, se añadieron media hora antes del inicio de la biotransformación 5 ml de una disolución de sulfato de amonio 3 M al caldo de fermentación. Para la toma de muestras se extrajeron 2 ml caldo de fermentación del recipiente y una parte

de los mismos se diluyó 1/20 en una mezcla de acetona-HCl ( $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ ) y se extrajo. Se tomaron muestras a 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 7,5 h, 10,5 h, 19,5 h y 21 h tras el inicio de la biotransformación de todos los reactores. Las tasas de conversión para oxígeno (OTR = *oxygen transfer rate*) y carbono (CTR = *carbon transfer rate*) se determinaron durante la fermentación a través del análisis de los gases de escape en los sistemas DASGIP. La fermentación se finalizó 21 h tras el inicio de la biotransformación. El agitador, la gasificación, la regulación de la temperatura y la regulación del pH se desconectaron y se dejó reposar el recipiente 5-10 minutos.

Para la cuantificación de DDS (ácido dicarboxílico C12), DDSME (éster metílico del ácido dicarboxílico C12), LS (ácido láurico), LSME (éster metílico del ácido láurico), HLS (ácido omega-hidroxi-láurico), HLSME (éster metílico del ácido omega-hidroxi-láurico), OLS (ácido omega-oxo-láurico), OLSME OLS (éster metílico del ácido omega-oxo-láurico), ALS (ácido omega-amino-láurico) y ALSME (éster metílico del ácido omega-amino-láurico) en muestras de fermentación durante el cultivo se extrajeron muestras. Estas muestras se prepararon para el análisis (véase la cuantificación basada en LC-ESI/MS<sup>2</sup> de productos).

#### 15 *Cuantificación basada en LC-ESI/MS<sup>2</sup> de productos*

La cuantificación de ALS, ALSME, DDS, DDSME, LS, LSME, HLS, HLSME, OLS y OLSME en muestras de fermentación tuvo lugar por medio de LC-ESI/MS<sup>2</sup> mediante una calibración externa para todos los analitos (0,1 - 50 mg/l) y usando los patrones internos ácido aminoundecanoico (AUD para HLS, DDS, OLS, HLSME, OLSME), d4-ALSME (para ALSME), <sup>13</sup>C-DDSME (para DDSME), d3-LS (para LS) y d3-LSME (para LSME).

A este respecto, se utilizan los siguientes aparatos:

- Instalación de HPLC 1260 (Agilent; Böblingen) con automuestreador (G1367E), bomba binaria (G1312B) y horno de columna (G1316A)
- Espectrómetro de masas TripelQuad 6410 (Agilent; Böblingen) con fuente de ESI
- Columna de HPLC: Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, tamaño de partícula: 2,6 µm, tamaño de poro 100 Å (Phenomenex; Aschaffenburg)
- Precolumna: filtro en línea KrudKatcher Ultra HPLC; 0,5 µm de profundidad de filtro y 0,004 mm de diámetro interno (Phenomenex; Aschaffenburg)

Las muestras se prepararon pipeteando 1900 µl de disolvente (el 80% (v/v) de ACN, el 20% de H<sub>2</sub>O bidest. (v/v), + el 0,1% de ácido fórmico) y 100 µl de muestra en un recipiente de reacción de 2 ml. La mezcla se sometió a vórtex durante aproximadamente 10 segundos y a continuación se centrifugó a aproximadamente 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante claro se extrajo con una pipeta y tras una dilución correspondiente se analizó con Diluent (el 80% (v/v) de ACN, el 20% de H<sub>2</sub>O bidest. (v/v), + el 0,1% de ácido fórmico). Por cada 900 µl de muestra se añadieron con pipeta 100 µl de ISTD (10 µl en el caso de un volumen de muestra de 90 µl).

La separación de HPLC tuvo lugar con la columna o precolumna mencionada anteriormente. El volumen de inyección asciende a 0,7 µl, la temperatura de columna a 50°C, la tasa de flujo a 0,6 ml/min. La fase móvil está compuesta por eluyente A (ácido fórmico al 0,1% (v/v)) y eluyente B (acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% (v/v)). Se utilizó el siguiente perfil de gradiente:

Tiempo [min]	Eluyente A [%]	Eluyente B [%]
0	77	23
0,3	77	23
0,4	40	60
2,5	40	60
2,6	2	98
5,5	2	98
5,6	77	23
9	77	23

El análisis de ESI-MS<sup>2</sup> tuvo lugar en modo positivo con los siguientes parámetros de la fuente de ESI:

- Temperatura de gas 280°C

- Flujo de gas 11 l/min
- Presión de nebulizador 50 psi
- Tensión capilar 4000 V

La detección y cuantificación de los compuestos ALS, ALSME, DDS, DDSME, HLS, HLSME, OLS, OLSME tuvo lugar con los siguientes parámetros de MRM, utilizándose en cada caso un ion producto como cualificador y uno como cuantificador:

Analito	Ion precursor [m/z]	Ion producto [m/z]	Tiempo de permanencia [ms]	Energía de colisión [eV]
DDSME	245,2	167,1	25	6
DDSME	245,2	149,1	50	8
HLSME	231,3	181,2	15	2
HLSME	231,3	163,2	25	5
DDS	231,2	213,2	50	0
DDS	231,2	149,1	25	9
ALSME	230,3	198,1	25	10
ALSME	230,3	163,2	15	10
OLSME	229,2	197,2	50	0
OLSME	229,2	161,1	25	5
HLS	217,2	181,2	35	0
HLS	217,2	163,1	20	4
OLS	215,2	161,2	25	0
OLS	215,2	95,2	60	13

Los analitos LS y LSME se detectaron en el modo SIM (*m/z* 201 y 215).

Resultados

**Formación reducida de los ácidos libres ácido aminoláurico, ácido dodecanodioico y ácido láurico tras la desactivación de *bioH* en *E. coli* W3110**

La cepa con desactivación de *bioH* mostró una formación claramente reducida de los ácidos libres ácido aminoláurico, ácido dodecanodioico y ácido láurico en comparación con la cepa control con *bioH* intacto. Se calcularon las relaciones de los títulos finales absolutos de ácido dodecanodioico (DDS) y éster metílico del ácido dodecanodioico (DDSME), ácido aminoláurico (ALS) y éster metílico del ácido aminoláurico (ALSME) así como ácido láurico (LS) y éster metílico del ácido láurico (LSME) expresadas en tanto por ciento.

	Título final en g/l					
	ALS	ALSME	DDS	DDSME	LS	LSME
W3110	0,12	11,77	5,02	7,27	0,03	1,91
W3110 $\Delta$ <i>bioH</i>	0,01	11,82	0,23	2,35	0,03	12,92

	Relación de ácido libre/éster metílico en tanto por ciento		
	ALS/ALSME	DDS/DDSME	LS/LSME
W3110	0,98	69,12	1,79
W3110 $\Delta$ <i>bioH</i>	0,10	9,74	0,24

	Relación de ácido libre/éster metílico en tanto por ciento		
	ALS/ALSME	DDS/DDSME	LS/LSME
W3110 con respecto a W3110 $\Delta bioH$	9,75	7,10	7,57

El efecto de la desactivación de *bioH* sobre la formación de ácidos libres se volvió claramente visible y se movía entre una reducción de un factor de 7,10 (DDS/DDSME) y un factor de 9,75 (ALS/ALSME).

5 Relación de producto con respecto a subproducto mejorada tras la desactivación de *bioH* en *E. coli* W3110

Se evaluaron los títulos absolutos alcanzados tras un tiempo fijo (= final de la biotransformación). En este caso se mostró en la referencia de cepa W3110  $\Delta bioH$  una relación claramente mejorada de productos (ALS y ALSME) con respecto a subproductos principales (DDS y DDSME) con un título de producto final constante. La relación aumento del 49,17% de ALS(ME) al 82,10% de ALS(ME).

10

	Concentración en g/l		Relación de ALS(ME) con respecto a ALS(ME) + DDS(ME) en tanto por ciento
	ALS + ALSME	DDS + DDSME	
W3110	11,89	12,29	49,17
W3110 $\Delta bioH$	11,83	2,58	82,10

**Ejemplo 3**

15 **Producción de éster metílico del ácido aminoláurico mediante una cepa de *E. coli* con una delección en el gen *bioH* mediante la utilización de un vector de expresión para los genes *ald* de *Bacillus subtilis* y *Cv\_2025* de *Chromobacterium violaceum* y los genes *alkB*, *alkG*, *alkT* y *alkL* del operón *alk* de *Pseudomonas putida*.**

20 Para la generación de las cepas de *E. coli* con un vector de expresión para los genes *ald* de *Bacillus subtilis* (que codifica para una alanina deshidrogenasa, optimizada por codón para *E. coli*), *Cv\_2025* de *Chromobacterium violaceum* (que codifica para una transaminasa, optimizada por codón para *C. tropicalis*), *alkB*, *alkG*, *alkT* (que codifican para una alcano monooxigenasa, una rubredoxina y una rubredoxina reductasa) y *alkL* (que codifica para una proteína de membrana/de transporte) del operón *alk* de *Pseudomonas putida* se produjeron células electrocompetentes de *E. coli* BW25113  $\Delta bioH$  así como la cepa control correspondiente *E. coli* BW25113. Esto tuvo lugar de manera conocida por el experto en la técnica. Las cepas proceden de la colección Keio que puede obtenerse comercialmente. Estas se transformaron con el plásmido pACYC184{MCS2.0}[*alkST\_BFGL*][*alaDH\_Bs(co)* {PspXI} TAcv(ct)] (SEQ ID 13 o el ejemplo 1 del documento WO/2013/024114 y la SEQ ID NO. 17 expuesta en el mismo) y se sembraron sobre placas de LB-agar con cloranfenicol (50  $\mu$ g/ml). Los transformantes se comprobaron mediante preparación de plásmidos y análisis de restricción analítico con respecto a la presencia de los plásmidos correctos. De esta manera se construyeron las siguientes cepas:

30

Referencia de cepa	Plásmidos presentes
BW25113	pACYC184{MCS2.0}[ <i>alkST_BFGL</i> ][ <i>alaDH_Bs(co)</i> {PspXI} TAcv(ct)]
BW25113 $\Delta bioH$	pACYC184{MCS2.0}[ <i>alkST_BFGL</i> ][ <i>alaDH_Bs(co)</i> {PspXI} TAcv(ct)]

35 Las cepas se sometieron a una fermentación alimentada por lotes, para analizar la capacidad para la producción de éster metílico del ácido hidroxiláurico, éster metílico del ácido oxoláurico, éster metílico del ácido carboxiláurico y éster metílico del ácido aminoláurico a partir de éster metílico del ácido láurico. Esto se realizó con un sistema de fermentación paralela en 8 veces de la empresa DASGIP. La realización experimental adicional tuvo lugar exactamente como se describió en el ejemplo 2.

40 Resultados

**Formación reducida de los ácidos libres ácido aminoláurico, ácido dodecanodioico, ácido láurico y ácido hidroxiláurico tras la desactivación de *bioH* en *E. coli* BW25113**

45 La cepa con desactivación de *bioH* mostró una formación claramente reducida de los ácidos libres ácido aminoláurico, ácido dodecanodioico, ácido láurico y ácido hidroxiláurico en comparación con la cepa control con *bioH* intacto, en parte por debajo del límite de detección. Se calcularon las relaciones de los títulos finales absolutos de ácido dodecanodioico (DDS) y éster metílico del ácido dodecanodioico (DDSME), ácido aminoláurico (ALS) y

éster metílico del ácido aminoláurico (ALSME), ácido hidroxiláurico (HLS) y éster metílico del ácido hidroxiláurico (HLSME) así como ácido láurico (LS) y éster metílico del ácido láurico (LSME) expresadas en tanto por ciento.

	Título en g/l							
	ALS	ALSME	DDS	DDSME	HLS	HLSME	LS	LSME
BW25113	0,16	10,80	2,75	1,40	0,72	15,01	0,48	40,77
BW25113 $\Delta bioH$	n.d.	15,86	0,23	3,95	n.d.	12,32	n.d.	28,49

5 La única relación que puede representar matemáticamente es DDS con respecto a DDSME:

	DDS/DDSME en tanto por ciento
BW25113	196,94
BW25113 $\Delta bioH$	5,87

La desactivación de *bioH* redujo la formación de DDS en un factor de 33,5, todos los demás ácidos libres se encuentran por debajo del límite de detección inferior.

10

Fase de oxidación prolongada tras la desactivación de *bioH* en *E. coli* BW25113

En comparación con la cepa control, se mostró que el rendimiento de oxidación inicial en la cepa con desactivación de *bioH* no pierde intensidad, sino que se mantiene prácticamente constante con respecto a la formación de ALSME a lo largo del transcurso del proceso.

15

	Tiempo de proceso [h]	ALSME [g/l]
BW25113	1	0,26
	2	1,16
	3	2,35
	19	10,51
	21,25	10,80
BW25113 $\Delta bioH$	1	0,38
	2	1,27
	3	2,48
	19	14,94
	21,25	15,86

La figura 1 muestra: La desactivación de *bioH* provocó con respecto al título final con condiciones constantes una productividad aumentada en un 47%.

20

Tasa de formación aumentada de éster metílico del ácido aminoláurico tras la desactivación de *bioH* en *E. coli* BW25113

Se evaluaron los títulos absolutos alcanzados tras un tiempo fijo (= final de la biotransformación). En este caso se mostró en la cepa desactivada una tasa de formación de producto claramente mayor de 0,75 g de ALSME por litro y hora con respecto a 0,51 g de ALSME por litro y hora en la cepa de tipo silvestre.

25

	Tiempo de proceso [h]	ALSME [g/l]
BW25113	21,25	10,80
BW25113 $\Delta bioH$	21,25	15,86

Relación de producto con respecto a subproducto mejorada tras la desactivación de *bioH* en *E. coli* BW25113

30

Se evaluaron los títulos absolutos alcanzados tras un tiempo fijo (= final de la biotransformación). En este caso se mostró en la referencia de cepa desactivada una relación claramente mejorada de producto (ALS y ALSME) con respecto a subproducto principal (DDS y DDSME).

ES 2 733 312 T3

	Título en g/l			
	ALS	ALSME	DDS	DDSME
BW25113	0,16	10,80	2,75	1,40
BW25113 $\Delta bioH$	0,00	15,86	0,23	3,95

	ALS + ALSME [g/l]	DDS + DDSME [g/l]
BW25113	10,96	4,15
BW25113 $\Delta bioH$	15,86	4,18

	ALS(ME)/DDS(ME)
BW25113	2,64
BW25113 $\Delta bioH$	3,80

- 5 La relación aumentó mediante la desactivación de *bioH* en un 43,9%. El título de producto aumentó en un 43,9% con un título de subproducto constante.

Coefficiente de rendimiento de glucosa aumentado ( $Y_{P/S}$ ) en la producción de ácido aminoláurico y éster metílico del ácido aminoláurico tras la desactivación de *bioH* en *E. coli* BW25113

- 10 Se observaron los títulos absolutos acumulados finales de ácido aminoláurico y éster metílico del ácido aminoláurico en comparación con la cantidad utilizada de glucosa.

	ALS + ALSME [g/l]	Consumo de glucosa [g]	g/l de ALS(ME) por g de glucosa
BW25113	10,96	52,95	0,21
BW25113 $\Delta bioH$	15,86	52,55	0,30

- 15 El coeficiente de rendimiento de glucosa aumentó de 0,21 g/l de ALS(ME) por gramo de glucosa en un 46% a 0,30 g/l de ALS(ME) por gramo de glucosa condicionado por la desactivación de *bioH*.

Lista de secuencias

- 20 <110> Evonik Industries AG  
 <120> Procedimiento para la conversión de un éster de ácido carboxílico
- 25 <130> Documento 201200172  
 <160> 14  
 <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1  
 <211> 771  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*
- 35 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(771)
- 40 <400> 1

ES 2 733 312 T3

atg aat aac atc tgg tgg cag acc aaa ggt cag ggg aat gtt cat ctt 48  
Met Asn Asn Ile Trp Trp Gln Thr Lys Gly Gln Gly Asn Val His Leu  
1 5 10 15

gtg ctg ctg cac gga tgg gga ctg aat gcc gaa gtg tgg cgt tgc att 96  
Val Leu Leu His Gly Trp Gly Leu Asn Ala Glu Val Trp Arg Cys Ile  
20 25 30

gac gag gaa ctt agc tcg cat ttt acg ctg cac ctt gtt gac ctg ccc 144  
Asp Glu Glu Leu Ser Ser His Phe Thr Leu His Leu Val Asp Leu Pro  
35 40 45

ggc ttc ggg cgt agc cgg gga ttt ggt gcg ctg tca ctt gct gat atg 192  
Gly Phe Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly Ala Leu Ser Leu Ala Asp Met  
50 55 60

gcc gaa gcc gtg ctg caa cag gca cct gat aaa gcc att tgg tta gcc 240  
Ala Glu Ala Val Leu Gln Gln Ala Pro Asp Lys Ala Ile Trp Leu Gly  
65 70 75 80

tgg agt ctg ggc ggg ctg gtg gca agc cag att gcg tta acc cat ccc 288  
Trp Ser Leu Gly Gly Leu Val Ala Ser Gln Ile Ala Leu Thr His Pro  
85 90 95

gag cgt gtt cag gcg ctg gtc acc gtg gcg tcg tca cct tgt ttt agt 336  
Glu Arg Val Gln Ala Leu Val Thr Val Ala Ser Ser Pro Cys Phe Ser  
100 105 110

gct cgt gac gag tgg ccg ggg ata aaa ccg gac gtg ctg gcg gga ttt 384  
Ala Arg Asp Glu Trp Pro Gly Ile Lys Pro Asp Val Leu Ala Gly Phe  
115 120 125

cag cag caa ctc agt gat gat ttt cag cgt aca gtg gag cgg ttc ctg 432  
Gln Gln Gln Leu Ser Asp Asp Phe Gln Arg Thr Val Glu Arg Phe Leu  
130 135 140

gcg tta caa acc atg ggg act gaa acg gcg cgc cag gat gcg cgg gcg 480  
Ala Leu Gln Thr Met Gly Thr Glu Thr Ala Arg Gln Asp Ala Arg Ala  
145 150 155 160

ttg aag aaa acc gtt ctg gcg tta ccg atg ccg gag gtt gac gtg ctt 528  
Leu Lys Lys Thr Val Leu Ala Leu Pro Met Pro Glu Val Asp Val Leu  
165 170 175

aat ggc ggg ctg gaa atc ctg aaa acg gtc gat ctc cgt cag ccg ctg 576  
Asn Gly Gly Leu Glu Ile Leu Lys Thr Val Asp Leu Arg Gln Pro Leu  
180 185 190

caa aac gtg tcc atg ccg ttt ttg cga ttg tat ggc tat ctc gac ggt 624  
Gln Asn Val Ser Met Pro Phe Leu Arg Leu Tyr Gly Tyr Leu Asp Gly  
195 200 205

ctg gtg ccg cgc aaa gtg gtg ccg atg ctg gat aaa ctt tgg cct cac 672  
Leu Val Pro Arg Lys Val Val Pro Met Leu Asp Lys Leu Trp Pro His  
210 215 220

agc gaa tca tat atc ttc gcc aaa gcg gcc cat gcg cca ttt att tcg 720  
Ser Glu Ser Tyr Ile Phe Ala Lys Ala Ala His Ala Pro Phe Ile Ser  
225 230 235 240

cat ccg gcc gag ttt tgt cac ctg ctg gtg gcg ttg aag cag agg gtg 768  
His Pro Ala Glu Phe Cys His Leu Leu Val Ala Leu Lys Gln Arg Val  
245 250 255

tag 771

5 <210> 2  
<211> 256  
<212> PRT  
<213> *Escherichia coli*

ES 2 733 312 T3

<400> 2

Met Asn Asn Ile Trp Trp Gln Thr Lys Gly Gln Gly Asn Val His Leu  
 1 5 10 15

Val Leu Leu His Gly Trp Gly Leu Asn Ala Glu Val Trp Arg Cys Ile  
 20 25 30

Asp Glu Glu Leu Ser Ser His Phe Thr Leu His Leu Val Asp Leu Pro  
 35 40 45

Gly Phe Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly Ala Leu Ser Leu Ala Asp Met  
 50 55 60

Ala Glu Ala Val Leu Gln Gln Ala Pro Asp Lys Ala Ile Trp Leu Gly  
 65 70 75 80

Trp Ser Leu Gly Gly Leu Val Ala Ser Gln Ile Ala Leu Thr His Pro  
 85 90 95

Glu Arg Val Gln Ala Leu Val Thr Val Ala Ser Ser Pro Cys Phe Ser  
 100 105 110

Ala Arg Asp Glu Trp Pro Gly Ile Lys Pro Asp Val Leu Ala Gly Phe  
 115 120 125

Gln Gln Gln Leu Ser Asp Asp Phe Gln Arg Thr Val Glu Arg Phe Leu  
 130 135 140

Ala Leu Gln Thr Met Gly Thr Glu Thr Ala Arg Gln Asp Ala Arg Ala  
 145 150 155 160

Leu Lys Lys Thr Val Leu Ala Leu Pro Met Pro Glu Val Asp Val Leu  
 165 170 175

Asn Gly Gly Leu Glu Ile Leu Lys Thr Val Asp Leu Arg Gln Pro Leu  
 180 185 190

Gln Asn Val Ser Met Pro Phe Leu Arg Leu Tyr Gly Tyr Leu Asp Gly  
 195 200 205

Leu Val Pro Arg Lys Val Val Pro Met Leu Asp Lys Leu Trp Pro His  
 210 215 220

Ser Glu Ser Tyr Ile Phe Ala Lys Ala Ala His Ala Pro Phe Ile Ser  
 225 230 235 240

His Pro Ala Glu Phe Cys His Leu Leu Val Ala Leu Lys Gln Arg Val  
 245 250 255

5

<210> 3

<211> 500

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

10

<400> 3

ES 2 733 312 T3

cggcttcgct atcccattgg cagtgcaacc agcgtgataa cggctgacac agcaaatcgc 60  
 tctgattaaa tccccgacgc cagtgacgcc gctgccataa cggaacgctg acgatgcgat 120  
 ccggcaattg caaccgggtg gtgcgacgag cgtgtaagac ttccaatagt aacagacgtg 180  
 acagggcgct ggcgatttca ctgcgccggg aaaatttaag ctggtggata agcggactta 240  
 acggcggcgc atagtcggca accgtgacca gtctttgccca gggcggcgggt ttttgcaggc 300  
 agcgaccgca ggaagatgg gagtgtgtgg cgggtaatcc acattgtggg cataacgttt 360  
 tatctgtgcy ggtggcgcgt gaacagaccg aacaaatccc ccaatgacct aacgccagtg 420  
 gcattcggca tagccagcat aatccccgta ctgttagcat atgttcatcc ttgtaagtca 480  
 aaagagaaca atagcggatg 500

<210> 4  
 <211> 500  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 4  
 gcggtgaagc agaggggtgta ggtggctttt gaaatggcga gacagaactt tactgactcg 60  
 ccgcagccaa ctcttcttct gacagcccgg taaagcgcac gatgtctgca agaggaactc 120  
 cggattcaag cattatcttg gctatatgca gggctttgga ttgttcccc tcctgccgca 180  
 atctttccgc aatagtcatt aaactctcct tgtgtttcgg tgaacgttcg gcaacgccgt 240  
 cgataaaatc gttaaaacgt acagcgtcgc cagtttgacg tatgtaatta aacagccctt 300  
 tgatttgtct gtcattagcg tatccactac ttaataagca ggccatttgc tctaccagcc 360  
 ccatcaggtc gcggtgacga atatgttttt gaattaactc cagcagcggc atacgtcggg 420  
 gctgcatgat ttcacatca ggcacgacgg tgacatcaat cagcggaaat gcggaggcat 480  
 aaagctgcct tgccagtttg 500

10

<210> 5  
 <211> 6654  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> vector

<400> 5

ES 2 733 312 T3

gagtcgaccg	gtggcgaatg	ggacgcgcc	tgtagcggcg	cattaagcgc	ggcgggtgtg	60
gtggttacgc	gcagcgtgac	cgctacactt	gccagcgccc	tagcgcccgc	tcctttcgct	120
ttcttcctt	cctttctcgc	cacgttcgcc	ggctttcccc	gtcaagctct	aaatcggggg	180
ctccctttag	ggttccgatt	tagtgcttta	cggcacctcg	accccaaaaa	acttgattag	240
ggtgatggtt	cacgtagtgg	gccatcgccc	tgatagacgg	tttttcgccc	tttgacgttg	300
gagtcacagt	tctttaatag	tggactcttg	ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	360
tcggtctatt	cttttgattt	ataagggatt	ttgccgattt	cggcctattg	gttaaaaaat	420
gagctgattt	aacaaaaatt	taacgcgaat	tttaacaaaa	tattaacgct	tacaatttag	480
gtggcacttt	tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	540
caaatatgta	tccgctcacc	gcgatccttt	ttaaccctac	acatatacct	gccgttcact	600
attathtagt	gaaatgagat	attatgatat	tttctgaatt	gtgattaaaa	aggcaacttt	660
atgcccatgc	aacagaaact	ataaaaaata	cagagaatga	aaagaaacag	atagattttt	720
tagttcttta	ggcccgtagt	ctgcaaatcc	ttttatgatt	ttctatcaaa	caaaagagga	780
aaatagacca	gttgcaatcc	aaacgagagt	ctaatagaat	gaggtcgaaa	agtaaatcgc	840
gcgggtttgt	tactgataaa	gcaggcaaga	cctaaaatgt	gtaaagggca	aagtgtatac	900
tttgcgctca	ccccttacat	atthtaggtc	tttttttatt	gtgcgtaact	aacttgccat	960

ES 2 733 312 T3

ctccaacag gagggctgga agaagcagac cgctaacaca gtacataaaa aaggagacat 1020  
 gaacgatgaa catcaaaaag ttgcaaaaac aagcaacagt attaaccttt actaccgcac 1080  
 tgctggcagg aggcgcaact caagcgtttg cgaaagaaac gaacccaaaag ccatataagg 1140  
 aaacatacgg catttcccat attacacgcc atgatatgct gcaaatccct gaacagcaaa 1200  
 aaaatgaaaa atatcaagtt cctgagttcg attcgtccac aattaaaaat atctcttctg 1260  
 caaaaggcct ggacgtttg gacagctggc cattacaaaa cgctgacggc actgtcgcaa 1320  
 actatcacgg ctaccacatc gtctttgcat tagccggaga tcctaaaaat gcggatgaca 1380  
 catcgattta catgttctat caaaaagtcg gcgaaacttc tattgacagc tggaaaaacg 1440  
 ctggccgcgt ctttaagac agcgcaaat tcgatgcaaa tgattctatc ctaaaagacc 1500  
 aaacacaaga atggtcaggt tcagccacat ttacatctga cggaaaaatc cgtttattct 1560  
 aactgattt ctccggtaaa cattacggca acaaacact gacaactgca caagttaacg 1620  
 tatcagcatc agacagctct ttgaacatca acggtgtaga ggattataaa tcaatctttg 1680  
 acggtgacgg aaaaacgtat caaatgtac agcagttcat cgatgaaggc aactacagct 1740  
 caggcgacaa ccatacgtg agagatcctc actacgtaga agataaaggc cacaaatact 1800  
 tagtatttga agcaaacact ggaactgaag atggctacca aggcgaagaa tctttattta 1860  
 acaaagcata ctatggcaaa agcacatcat tcttccgtca agaaagtcaa aaacttctgc 1920  
 aaagcgataa aaaacgcacg gctgagttag caaacggcgc tctcggtatg attgagctaa 1980  
 acgatgatta cacactgaaa aaagtgatga aaccgctgat tgcactaac acagtaacag 2040  
 atgaaattga acgcgcgaac gtctttaaaa tgaacggcaa atggtacctg ttcactgact 2100  
 ccccgggatc aaaaatgacg attgacggca ttacgtctaa cgatatttac atgcttggtt 2160  
 atgtttctaa ttctttaact ggcccataca agccgctgaa caaaactggc cttgtgttaa 2220  
 aatggatct tgatcctaac gatgtaacct ttacttactc aacttcgct gtacctcaag 2280  
 cgaaaggaaa caatgtcgtg attacaaagt atatgacaaa cagaggatc tacgcagaca 2340  
 aacaatcaac gtttgcgcca agcttctgc tgaacatcaa aggcaagaaa acatctgtt 2400  
 tcaaagacag catcctttaa caaggacaat taacagttaa caaataaaaa cgcaaaagaa 2460  
 aatgccgata ttgactaccg gaagcagtg gaccgtgtgc ttctcaaatg cctgattcag 2520  
 gctgtctatg tgtgactgtt gagctgtaac aagttgtctc aggtgttcaa tttcatgtc 2580  
 tagttgctt gtttactgg tttcacctgt tctattaggt gttacatgct gttcatctgt 2640  
 tacattgtcg atctgttcat ggtgaacagc tttaaatgca ccaaaaactc gtaaaagctc 2700  
 tgatgtatct atctttttta caccgttttc atctgtgcat atggacagtt ttcctttga 2760  
 tatgtaacgg tgaacagttg ttctactttt gtttgtagt cttgatgctt cactgataga 2820  
 tacaagagcc ataagaacct cagatccttc cgtatttagc cagtatgttc tctagtgtgg 2880

ES 2 733 312 T3

ttcgttggtt ttgcgtgagc catgagaacg aaccattgag atcataactta ctttgcatgt	2940
cactcaaaaa ttttgcctca aaactggtga gctgaatfff tgcagttaaa gcatcgtgta	3000
gtgtttttct tagtccgtta tglaggtagg aatctgatgt aatggttggt ggtatfffgt	3060
caccattcat ttttatctgg ttgttctcaa gttcggttac gagatccatt tgtctatcta	3120
gttcaacttg gaaaatcaac gtatcagtcg ggcggcctcg cttatcaacc accaatttca	3180
tattgctgta agtgtttaaa tctttactta ttggtttcaa aaccattgg ttaagccttt	3240
taaactcatg gtagttatff tcaagcatta acatgaactt aaattcatca aggctaact	3300
ctatatffgc cttgtgagtt ttctfffgtg ttagttctff taataaccac tcataaatcc	3360
tcatagagta tttgffffca aaagacttaa catgttccag attatattff atgaattfff	3420
ttaactggaa aagataaggc aatatctctt cactaaaaac taattctaaf ttttcgcttg	3480
agaacttggc atagfffgtc cactggaaaa tctcaaagcc tttaaccaaa ggattcctga	3540
ttccacagt tctcgtcctc agctctctgg ttgctfftagc taatacacca taagcattff	3600
ccctactgat gttcatcctc tgaacgtatt ggttataagt gaacgatacc gtccgttctt	3660
tcctttagg gttffcaatc gtggggttga gtagtgccac acagcataaa attagcttgg	3720
tttcatgctc cgffaagtca tagcactaa tgcctagttc atttgctffg aaaacaacta	3780
attcagacat acatctcaaf tggcttaggt gattffaatc actataccaa ttgagatggg	3840
ctagtcaatg ataattacta gtcctffttcc tttgagttgt gggatctctg aaattctgct	3900
agacctffgc tggaaaaact gtaaattctg ctagaccctc tgtaaattcc gctagacctt	3960
tgtgtgffff ttttgtffat attcaagtgg ttataattta tagaataaag aaagaataaa	4020
aaaagataaa aagaatagat cccagccctg tgtataactc actactffag tcagttccgc	4080
agtattacaa aaggatgtcg caaacgctgt ttgctcctct acaaaacaga ccttaaaacc	4140
ctaaaggctt aagtagcacc ctgcgaagct cgggcaaatc gctgaatatt cctffftgtct	4200
ccgaccatca ggcacctgag tgcctgtctt tttcgtgaca ttcagttcgc tgcgctcacg	4260
gctctggcag tgaatggggg taaatggcac tacaggcgc ttttatggat tcatgcaagg	4320
aaactacceca taatacaaga aaagcccgtc acgggcttct cagggcgfff tatggcgggt	4380
ctgctatgtg gtgctatctg actffftgct gttcagcagt tcttgcctc tgatffcca	4440
gtctgaccac ttoggattat cccgtgacag gtcattcaga ctggctaag caccagtaa	4500
ggcagcggta tcatcaacag gcttaccctg cttactgtcg gggatcgacg ctctccctta	4560
tgcgaactct gcacctffcg tcttogaata aatacctgtg acggaagatc acttcgcaga	4620
ataaataaat cctgggtgtcc ctgttgatac cgggaagccc tgggccaact tttggcgaaa	4680
atgagacggt gatcggcacg taagaggttc caactffcac cataatgaaa taagatcact	4740

ES 2 733 312 T3

accggcgta tttttgagt tatcgagatt ttcaggagct aaggaagcta aaatggagaa 4800  
 aaaaatcact ggataacca cggttgatat atcccaatgg catcgtaaag aacattttga 4860  
 ggcatttcag tcagttgctc aatgtaccta taaccagacc gttcagctgg atattacgpc 4920  
 ctttttaaag accgtaaaga aaaataagca caagttttat ccggccttta ttcacattct 4980  
 tgcccgcctg atgaatgctc atccggaatt ccgatatggca atgaaagacg gtgagctggt 5040  
 gatatgggat agtgttcacc cttgttacac cgttttccat gagcaaacctg aaacgttttc 5100  
 atcgctctgg agtgaatacc acgacgattt ccggcagttt ctacacatat attcgcaaga 5160  
 tgtggcgtgt tacggtgaaa acctggccta tttccctaaa gggtttattg agaatatgtt 5220  
 tttcgtctca gccaatccct ggggtgagttt caccagtttt gatttaaacg tggccaatat 5280  
 ggacaacttc ttcgcccccg ttttcacatc gggcaaatat tatacgcaag gcgacaaggt 5340  
 gctgatgccg ctggcgattc aggttcatca tgccgtttgt gatggcttcc atgtcggcag 5400  
 aatgcttaat gaattacaac agtactgcga tgagtggcag ggcggggcgt aattttttta 5460  
 aggcagttat tgggtccctt aaacgcctgg ttgctacgcc tgaataagtg ataataagcg 5520  
 gatgaatggc agaaattcga aagcaaatc gaccgcctcg tcggttcagg gcagggctcg 5580  
 taaatagccg cttatgtcta ttgctggtct cggtaaccgg ggatcgcggc ccggcttcgc 5640  
 tatcccattg gcagtgcac cagcgtgata acggctgaca cagcaaatcg ctctgattaa 5700  
 atccccgacg ccagtgcgc cgctgccata acggaacgct gacgatgcga tccggcaatt 5760  
 gcaaccgggt ggtgcgacga gcgtgtaaga cttccaatag taacagacgt gacagggcgc 5820  
 tggcgatttc actgcgcccg gaaaatttaa gctgggtggat aagcggactt aacggcggcg 5880  
 catagtggc aaccgtgacc agtctttgcc agggcggcgg tttttgcagg cagcggaccgc 5940  
 agggaagatg gtagtggtg gcgggtaatc cacattgtgg gcataacggt ttatctgtgc 6000  
 ggggtggcgc tgaacagacc gaacaaatcc cccaatgacc taacgccagt ggcattcggc 6060  
 atagccagca taatccgggt actgttagca tatgttcac cttgtaagtc aaaagagaac 6120  
 aatagcggat gcctcgaggg cgttgaagca gaggggtgtag gtggcttttg aaatggcgag 6180  
 acagaacttt actgactcgc cgcagccaac tcttctctg acagcccggg aaagcgcag 6240  
 atgtctgcaa gaggaactcc ggattcaagc attattttgg ctatatgcag ggctttggat 6300  
 tgttccccct cctgcgcaa tctttccgca atagtcatta aactctcctt gtgtttcgg 6360  
 gaacgttcgg caacgcgctc gataaaatcg ttaaaacgta cagcgtcgcc agtttgagc 6420  
 atgtaattaa acagcccttt gatttgtctg tcattagcgt atccactact taataagcag 6480  
 gccatttgct ctaccagccc catcaggtcg cgttgacgaa tatgtttttg aattaactcc 6540  
 agcagcgcca tacgtcggtg ctgcatgatt tcatcatcag gcatgacggg gacatcaatc 6600  
 agcggaaatg cggaggcata aagctgcctt gccagtttgg gccgcgatcc tcta 6654

<210> 6  
 <211> 39  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador

10 <400> 6  
 ccggggatcg cggcccggct tcgctatccc attggcagt 39

# ES 2 733 312 T3

```

<210> 7
<211> 58
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

10 <400> 7
cctctgcttc aacgccctcg aggcacccgc tattgtctc tttgactta caaggatg      58

<210> 8
<211> 24
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

20 <400> 8
gcgtgaagc agaggggtga ggtg      24

<210> 9
<211> 39
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> cebador

<400> 9
tagaggatcg cggcccaaac tggcaaggca gctttatgc      39

35 <210> 10
<211> 1008
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> gen desactivado resultante

<400> 10
cggcttcgct atcccattgg cagtgcaacc agcgtgataa cggctgacac agcaaatcgc      60
tctgattaaa tccccgacgc cagtgacgcc gctgccataa cggaacgctg acgatgcgat      120
45

```

ES 2 733 312 T3

ccggcaattg caaccoggtg gtgcgacgag cgtgtaagac ttccaatagt aacagacgtg 180  
 acagggcgct ggcgatttca ctgcccggg aaaatttaag ctggtggata agcggactta 240  
 acggcggcgc atagtccgca accgtgacca gtctttgccca gggcggcggg ttttgcaggc 300  
 agcgaccgca ggaagatgg gagtgtgtgg cgggtaatcc acattgtggg cataacgttt 360  
 tatctgtgcg ggtggcgcgt gaacagaccg aacaaatccc ccaatgacct aacgccagtg 420  
 gcattcggca tagccagcat aatcccggta ctgttagcat atgttcatcc ttgtaagtca 480  
 aaagagaaca atagcggatg cctcgagggc gttgaagcag aggggtgtagg tggcttttga 540  
 aatggcgaga cagaacttta ctgactcgcc gcagccaact cttcttctga cagcccggta 600  
 aagcgcatga tgtctgcaag aggaactccg gattcaagca ttattttggc tatatgcagg 660  
 gctttggatt gttccccctc ctgcccgaat ctttccgcaa tagtcattaa actctccttg 720  
 tgtttcggtg aacgttcggc aacgccgtcg ataaaatcgt taaaacgtac agcgtcgcca 780  
 gtttgcagta tgtaattaa cagccctttg atttgtctgt cattagcgtg tccactactt 840  
 aataagcagg ccatttgctc taccagcccc atcaggtcgc gttgacgaat atgtttttga 900  
 attaactcca gcagcgccat acgtcggtcg tgcgatgattt catcatcagg catgacggtg 960  
 acatcaatca gcggaaatgc ggaggcataa agctgccttg ccagtttg 1008

<210> 11  
 <211> 12348  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> vector

<400> 11  
 ggggaagccct gcaaagtaaa ctggatggct ttcttgccgc caaggatctg atggcgcagg 60  
 ggatcaagat ctgatcaaga gacaggatga ggatcgtttc gcatgattga acaagatgga 120  
 ttgcacgcag gttctccggc cgcttgggtg gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa 180  
 cagacaatcg gctgctctga tgccgccgtg ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccggtt 240  
 ctttttgtca agaccgacct gtccgggtgcc ctgaatgaac tgcaggacga ggcagcgcgg 300  
 ctatcgtggc tggccacgac gggcgttcct tgcgcagctg tgctcgacgt tgtcactgaa 360  
 gcgggaaggg actggctgct attgggcgaa gtgccggggc aggatctcct gtcactcac 420  
 cttgctcctg ccgagaaaagt atccatcatg gctgatgcaa tgcggcggct gcatacgtt 480  
 gatccggcta cctgccatt cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact 540  
 cggatggaag ccggtcttgt cgatcaggat gatctggacg aagagcatca ggggctcgcg 600  
 ccagcccgaac tgttcgccag gctcaaggcg cgcatgcccg acggcggagga tctcgtcgtg 660  
 acctatggcg atgctgctt gccgaatc atggtggaaa atggccgctt ttctggatte 720

ES 2 733 312 T3

atcgactgtg gccggctggg tgtggcggac cgctatcagg acatagcgtt ggctaccctg 780  
 gatattgctg aagagcttgg cggcgaatgg gctgaccgct tcctcgtgct ttacggtatc 840  
 gccgctcccc attcgcagcg catcgccttc tatcgccttc ttgacgagtt cttctgagcg 900  
 ggactctggg gttcgaaatg accgaccaat cgattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 960  
 atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattht aaaaggatct aggtgaagat 1020  
 cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 1080  
 agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg 1140  
 ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 1200  
 accaactcct tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 1260  
 tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 1320  
 cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 1380  
 gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc 1440  
 gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgat ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 1500  
 gctatgagaa agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg 1560  
 cagagtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 1620  
 tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 1680  
 ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 1740  
 ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat 1800  
 taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcagctc 1860  
 agtgagcggag gaagcgggaag agcgcctgat gcggtattht ctcttacgc atctgtcggg 1920  
 tatttcacac cgcatagggg atctccaatc gtgccttggc gcagcgaacg ccctcgttcc 1980  
 cccagatagc cattgatcct ctctcgcctg tcccctcagt tcagtaattht cctgcatttg 2040  
 cctgtttcca gtcggtagat attccacaaa acagcagggga agcagcgtt ttccgctgca 2100  
 taaccctgct tcggggatcat tatagcgatt ttttcggtat atccatcctt tttcgcacga 2160  
 tatacaggat tttgccaaag ggttcgtgta gactttcctt ggtgtatcca acggcgtcag 2220  
 ccgggcagga taggtgaagt aggccacccc gcgagcgggt gttccttctt cactgtcctt 2280  
 tattcgcacc tggcgggtgct caacgggaat cctgctctgc gaggetggcc ggctaccgcc 2340  
 ggcgtaacag atgagggcaa gcgcatggct gatgaaacca agccaaccag gaagggcagc 2400  
 ccacctatca aggtgtactg cctccagac gaacgaagag cgattgagga aaaggcggcg 2460  
 gcggccggca tgagcctgtc ggcctacctg ctggcctcg gccagggcta caaatcacg 2520  
 ggcgtcgtgg actatgagct cgagaacgct taccgccaac acagcagtggt atttgaataa 2580

ES 2 733 312 T3

gagctogaac atgatcggat ctcccatttc agcaaggaa atcccacat agccaccacc 2640  
 gatttatgtg gcgtagaaaa cggtcacac caaatatggc aatacttccc cgcocaagcg 2700  
 ccacataaca gcctgggcca cttttacgc ggtagttccg cacgtacgga gtgcgggggg 2760  
 cggcaggtaa ctgccgtccc tatecgcacc gttggttcga gtggctgagc atcattgcta 2820  
 atcaggtaat tttatactcc ctgcaagcgc accttgacgt ttaggcaaat ttattgtctc 2880  
 agttgcaatc agtcgctcct gcttgtagc aaggacttct agttcaagag tttcgttatt 2940  
 aattgcaaca acgagtttat cgtagtcctt tagagcacca agtccttgca gcgccatccc 3000  
 tttaaatca gaccagaacc gtgggtgggt tgggtgctggg gttgatgtgc cacagatgct 3060  
 acttgcgaca atttgagcgt gtgtaaccgc attatgaatt gtctctaaac gtaccatcgt 3120  
 tccccaaaa ggatttctag ccattgcgca gtgcgcgatt gcatatatac ttgtatccga 3180  
 tgtacacatc tgatcatcga ccacaacacc attactcact tcaagggccg cctcagttgc 3240  
 cagctctagc tctgggatag caccgattcc aactacaatc agatccgcct gaatttcttc 3300  
 tccactttca agtacgcatt gttcaacatg gccattcctg ccctttatag acgttaattt 3360  
 cgcattcagc ttgaaactca ttccttcagc ctccagcggg gctctgacta agtttgctgc 3420  
 tgccggcgta accacgcgcg ccattacaog cggggcggct tctatcactg tgaccctctt 3480  
 ccctaagccc accgcagctg aggcgacttc aagcccgatt actccgcgc ccaacacaac 3540  
 aacagacgca ctctccacaa gtttctacg taaattttg gcgtcttcca tactgcgtaa 3600  
 atagcagacc ccagacagtt cagaccctc gcaggttaac ctacgtgcgc tagcaccctgt 3660  
 tgcaagaatc aatttttcat acgctattc ttttccatct ttagaagaaa ctatottacg 3720  
 ccccacgtcg attgatacaa togggtgtatt taacgaaatg gtaaatattgt tattcgtata 3780  
 aaaaccttct ggctttaatg gcaactgcgga ttctgcaatc tcacttgta gaaaagcctt 3840  
 ggatagagga ggccgctgat aaggcgcac agactccctg ctaaaaatcc taatttcccc 3900  
 tttataacca tattgacgaa gccagaacgc agcatttact ccagctgtac cagcgccaac 3960  
 aacaacgatt gccataatc tctctccggt atacttttca ctatatcact taatgccgat 4020  
 tattttagat aattccttga cgctcagctt caattgttgc ttgcgtgcga ttcactacat 4080  
 tcaaggtggc aaatattttc ctcatatgcc actttatagc atcttcggtg acatgcatat 4140  
 ttgttgctat ttgtttgttt gagcaccctt cttttacaag cctcaagaca gcaatctgct 4200  
 tccgtgtcaa taaagcgtca gctttattct ctgcggactt tccaatctca actattcgcg 4260  
 gaagactaaa agccccaatc gcttgatcta aattaactgc tgtgaaggct tcacatgaag 4320  
 ccggtattat tcgctcaatt aaacatactt catcaagaac tgtttgaaag cattgaagct 4380  
 gttttgctat ctccactgca taaacaatgt taagetgagc cttttttaa tcaccggcac 4440  
 ctgcctgcgc tccggccaaa cacaataatc caoggacttc cagctggccc gcgttaattt 4500

ES 2 733 312 T3

tacgggcttg	ctgaatagcc	aataacgctc	tgtgcgcggc	actatgaaag	ttccgatctc	4560
gggaaagcac	tagtgattga	acaagcagca	ggcgtgcttt	taggggggct	gagtgtctgc	4620
cggagaaaat	cttatgatct	tcaagagttt	ttaaattatt	tatgcccggt	atgccttgac	4680
agactaagcg	ctgatagatc	tcaatttggc	tcataacttc	caatcttggg	agattttttt	4740
caaccgcatg	cgcttctgcc	cactccaata	tctcaatgga	gccatttagg	tcactccttc	4800
caagccgcca	agctgacaca	gcacggcata	cggaaaaaaa	cacgtctgtc	accccgatgat	4860
tggaaatgaa	ctctaaaatt	ttggagagct	tttcttctga	gggtgtccaag	cagcgcaatt	4920
cataatgtaa	ctcaagctct	agagcgtcaa	acattttcga	agtaaactcg	gattccatca	4980
tctgcgcgcg	actgtctgtg	cgtgcttgag	ttataatctg	cctcgcccag	cccatttttc	5040
cgcttgctag	ggcttgttga	aacctcgga	catacagcca	acccaaagca	aaattttgtt	5100
ttgcaaattt	attcacggct	tgggcctgag	ccagcacctt	ctccaactct	gcaaacttat	5160
actcactggc	aaaaataaaa	gccaaacag	ttagcgcggc	cccttttcca	actgcgtttg	5220
aatccccaaa	taactaatac	cacttattac	agagctcctc	actcgaaagc	atttcatctt	5280
tcgttgcttt	acctattgca	agcacaagct	gcagccatc	cttttcttgc	catttatttt	5340
ttttatcgga	ttgtgaagat	aggtcttta	ttaacttctc	tgctcgcgcg	ccttgctgac	5400
tgaaatacaa	taccacgcg	taactaataa	gcactatggg	ttttttgtgc	caggcctgct	5460
tcggcagctc	taacagccac	tgtctcagcg	catctatttc	gccctgacga	aatgacaaat	5520
ctaaaattat	tctctcagac	atgctgactg	cccagcgaca	gtcattcgcc	cgtagggata	5580
ttcgtattgc	atactggtat	tcacctctac	gccaatgcca	gaaagctgca	cgcttaagca	5640
ggtaggatct	tttagcagga	tttccagtcc	aagtaatttc	tcgtagaaaa	ttacgcagta	5700
ctggatgcag	tgtaaactgc	gctggtccac	cgctcacatg	gcgaagcaac	atgtaattag	5760
tgcttaaata	cttaatacat	gagaccccat	tgacgcattt	gaatacataa	ttgtattgat	5820
caggcgtcac	gaaatcgagc	aatgaagaat	ttgcaagaaa	aacacgatag	cgctcgggaa	5880
tcgcctcaaa	tatttcatcc	ctaaagtaat	tgtctacttc	aactactgct	gaaatatgct	5940
tggccggcaa	ctcacgcttt	aacaaaaaaaa	ctacaagagc	aggccacccc	tcaacttctt	6000
gcaccaaggt	ctctatctgt	tcttcaggaa	ctccaagaac	agactctgcc	tccgctaacg	6060
ccaccgctc	ttctgcgcta	aaggccaagt	ctttctcggt	gtactcccg	atagcgctg	6120
caagtttaag	ctgcgagaac	ctttttattg	tattgcctgc	aactgcaaac	ctgatatttt	6180
ttggtgtatt	taacataaac	tccataagtg	cgtgcaacaa	cggcaagtct	aagtcatgat	6240
taatattatc	caaacaaact	agcgtttcta	tctcgttatt	cgaggtgctc	tgccaaagac	6300
tagatgcaag	gtctcgcaag	agcgcaggct	tgctcacacc	ctctctcaca	cggctgaatt	6360

ES 2 733 312 T3

ttaccatttc gaaagtttca agctgctcaa taatctctgc gcagatatca aattcactgt 6420  
 aagaactggc tottaaagaa agccacactg caggacgtcc ggctgttctg tggcgtagcc 6480  
 actcgaacgc aagagcaacg gttttcccat atccaggtgg ggctctgtaa aggcatactc 6540  
 tgggagcggc tccatccgcg ataactcaatc ttggccgata tatgcaacta tgaactttgg 6600  
 cacttactag agtcgtaatt tgatccgctc cgaccttagc gaccgggaaa tcattattta 6660  
 ttattatfff cattatgcta ttctcgcgcc agctgactgg aaatfffcac cataggttac 6720  
 ggtgttaaat attaaaacta cacttaagtg tagtcggcat gatcgggtgg gcaaaatatt 6780  
 tactagggaa ggtctgaagt aggccgctat ttctggccga cttcggcctt cgcctgattt 6840  
 gaagacgggc accgggtcaa aatcgaccag atagctcgcct ctttcgggtg ctttcagccg 6900  
 tcgcgagtag ctccgcggtac ctggcatgct tgcggccagc tcgtgttttt ccagcagacg 6960  
 acggagcaaa aactaccctg aggtgtagtt ggcgcaagcg tccgattagc tcaggtttaa 7020  
 gatgtcgaga gtgagagtgg gccgcttaac tttctcagtt aggcataaaa ttacgtctta 7080  
 aatctcgtag cgactaattt aataaaaatt ggagaattcc atatgcttga gaaacacaga 7140  
 gttctggatt ccgctccaga gtacgtagat aaaaagaaat atctctggat actatcaact 7200  
 ttgtggccgg ctactccgat gatcggaaac tggccttcaa atgaaactgg ttgggggatt 7260  
 ttttatgggc tggatattgct cgtatggtac ggcgcacttc cattgcttga tgcgatgttt 7320  
 ggtgaggact ttaataatcc gcctgaagaa gtgggtgccga aactagagaa ggagcggtag 7380  
 tatcgagttt tgacatatct aacagttcct atgcattacg ctgcattaat tgtgtcagca 7440  
 tgggtggctg gaactcagcc aatgtcttgg cttgaaattg gtgcgcttgc cttgtcactg 7500  
 ggtatcgtga acggactagc gctcaataca ggacacgaac tcggtcacia gaaggagact 7560  
 tttgatcgtt ggtatggcaa aattgtgttg gctgtcgtag ggtacggta cttctttatt 7620  
 gagcataata agggatcatca ccgtgatgct gctacaccga tggatcctgc aacatcccg 7680  
 atgggagaaa gcatttataa gttttcaatc cgtgagatcc caggagcatt tattcgtgct 7740  
 tgggggcttg aggaacaacg cctttcgcgc cgtggccaaa gcgtttggag tttcgataat 7800  
 gaaatcctcc aaccaatgat catcacagtt attctttacg ccgttctcct tgccttgttt 7860  
 ggacctaaga tgctggtggt cctgccgatt caaatggctt tcggttggtg gcagctgacc 7920  
 agtgcgaact atattgaaca ttacggcttg ctccgtcaaa aaatggagga cggtcgatat 7980  
 gagcatcaaa agccgcacca ttcttggaaat agtaatcaca tcgtctctaa tctagtgtg 8040  
 ttccaccttc agcggcactc ggatcaccac gcgcatccaa cacgtttctta tcagtactt 8100  
 cgggattttc ccggcctgcc ggctcttccg acgggttacc ctggtgcatt tttgatggcg 8160  
 atgattcctc agtggtttag atcagttatg gatcccaagg tagtagattg ggtgggtgg 8220  
 gaccttaata agatccaaat tgatgattcg atgcgagaaa cctatttgaa aaaatttggc 8280

ES 2 733 312 T3

actagtagtg ctggtcatag ttcgagtacc tctgcggtag catcgtagtt atgtgagcac 8340  
gcagagcccc gcggtcgata tttacaataa gtgcttcaat tttatgtgcg gcggtgaaag 8400  
ctctcacaaa gagtgcactt cgctaaagtg ctgaggggttg attgcctctc tgtaattgct 8460  
ttgaaggcga cctgctccga tagttacact ctgatgaagt tgtcggagca gcgactaacg 8520  
ctgagttaat aggagagtgg gagaatgtca aggtaccagt gtccagattg tcagtatatc 8580  
tatgatgaaa ataaggggga gccgcacgaa ggtttccacc cgaacaccag ctggaatgat 8640  
atccccaaag attgggcatg cccggactgc gcagttcgag acaagggtga ctttatcttt 8700  
ctcgcggatt ctccctcgaa agaaacacag ctaggggtga atagtcagct tgccaactcg 8760  
gaaagtggta tttcagatgc tactccaact ggaatggcag ttttggccgc agaattagtg 8820  
atccccacta atcaagaaaa taaaaatgag ggctgtgcgg ctaagactga agttcttgat 8880  
caggcgagca cccacaggt tgtaagaaaa tcttccacaa ggaagaagat gagaaataa 8940  
taacgcaaat ttgccgcaac gcaaaaataac aatttgacat ggtgatgagt atggctagct 9000  
ataaatgccc ggattgtaat tatgtttatg atgagagtgc gggtaatgtg catgaggggt 9060  
tttctccagg tacgccttgg caccttattc ctgaggattg gtgctgcccc gattgcgccg 9120  
ttcgagacaa gcttgacttc atgttaattg agagcggcgt aggtgaaaag ggcgtcacct 9180  
caaccatac ttgcgcaaat ttatccgagg ttagtggcac aagtttaact gctgaagcag 9240  
tggttgccgc gacaagctta gagaattgc ctagtgccga cgttaaaggc caagatctat 9300  
ataaaactca acctccaagg tctgatgccc aaggcgggaa agcatacttg aagtggatat 9360  
gtattacttg tggccatata tatgatgagg cgttgggcca tgaggccgag ggttttactc 9420  
caggtaactc ctttgaggat attcctgatg actggtgctg tccggattgc ggggctacga 9480  
aagaagacta tgtgctctac gaggaaaagt gaagattaaa acttcaagtc attctaggta 9540  
attcaggaca aaataaaaat gaccatacca attagcctag ccaagttaa ctctagtgcc 9600  
gatacccatt cagcgcttgt cgacctgtaa cgacaacaaa acgagggtag cacaatgagt 9660  
ttttctaatt ataaagtaat cgcgatgccg gtgttggttg ctaattttgt tttggggcg 9720  
gccactgcat gggcgaatga aaattatccg gcgaaatctg ctggctataa tcagggtgac 9780  
tgggtcgcta gcttcaatth ttctaaggtc tatgtgggtg aggagcttg cgatctaat 9840  
gttgagggg gggctttgcc aatgctgat gtaagtattg gtaatgatac aacacttacg 9900  
tttgatatcg cctatthtgt tagctcaaat atagcgggtg atthttttgt tggggtgcca 9960  
gctagggcta aatthcaagg tgagaaatca atctctcgc tgggaagagt cagtgaagtt 10020  
gattacggcc ctgcaattht ttcttcaa tatcattacg atagctthga gcgacttht 10080  
ccatatgtht gggthggtg tggtcgggtg ctatthtttg ataaaaccga cggthgcttht 10140

ES 2 733 312 T3

agttcgtttg atattaagga taaatgggcg cctgcttttc aggttggcct tagatatgac 10200  
 cttggttaact catggatgct aaattcagat gtgcgttata ttcctttcaa aacggacgtc 10260  
 acaggtactc ttggcccggg tctgtttct actaaaattg aggttgatcc tttcattctc 10320  
 agtcttgggtg cgtcatatgt tttetaagta atcaggctcg tcaactgtcgc aggtcgacct 10380  
 gcagccaagc ttctgttttg gggatgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc 10440  
 agaacgcaga agcgtctga taaaacagaa tttgcctggc ggcagtagcg cggtggtccc 10500  
 acctgacccc atgccgaact cagaagtga acgccgtagc gccgatggtg gtgtggggtc 10560  
 tccccatgcg agagtaggga actgccaggc atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag 10620  
 actgggcctt tcgttttctc tgttgtttgt cgggtgaacgc tctcctgagt aggacaaatc 10680  
 cgccgggagc ggatttgaac gttgcgaagc aacggcccgg aggttggcgg gcaggacgcc 10740  
 cgccataaac tgccaggcat caaattaagc agaaggccat cctgacggat ggcctttttg 10800  
 cgtttctaca aactcttttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 10860  
 agacaataac cctgataaat gcttcaataa tgcagcctga aaggcaggcc gggcctggt 10920  
 ggccacggcc tctagccag atccacggc atctgggtta gtcgagcgcg gcccgcttcc 10980  
 catgtctcac cagggcagc ctgtttcgcg atctcagcat ctgaaatctt cccggccttg 11040  
 cgcttcgctg gggccttacc caccgccttg gcgggcttct tcggtccaaa actgaacaac 11100  
 agatgtgtga ccttgcgccc ggtctttcgc tgcgccact ccacctgtag cgggctgtgc 11160  
 tcgttgatct gcgtcacggc tggatcaagc actcgcaact tgaagtccct gatcgaggga 11220  
 taccggcctt ccagttgaaa ccactttcgc agctgtcaa tttctatttc gcgctggccg 11280  
 atgctgtccc attgcatgag cagctcgtaa agcctgatcg cgtgggtgct gtccatcttg 11340  
 gccacgtcag ccaaggcgta tttggtgaac tgtttggtga gttccgtcag gtacggcagc 11400  
 atgtcttttg tgaacctgag ttctacacgg cctcaccct cccggtagat gattgtttgc 11460  
 acccagccg taatcatcac actcgtctt tccccctgc cattgggctc ttgggttaac 11520  
 cggacttccc gccgtttcag gcgcagggcc gcttctttga gctggttgta ggaagattcg 11580  
 atagggacac ccgccatcgt cgctatgtcc tccgcgca ctgaatacat cacttcatcg 11640  
 gtgacaggct cgctcctctt cacctggcta atacaggcca gaacgatccg ctgttcctga 11700  
 aactgaggc gatacgcggc ctcgaccagg gcattgctt tgtaaacat tgggggtgag 11760  
 gccacgttcg acattccttg tgtataaggg gacactgtat ctgctccca caatacaaca 11820  
 aatccgtccc tttacaacaa caaatccgtc ccttctaac aacaaatccg tccctaatg 11880  
 gcaacaaatc cgtccctttt taaactctac aggccacgga ttacgtggcc tgtagacgtc 11940  
 ctaaaagggt taaaagggaa aaggaagaaa aggggtgaaa cgcaaaaaac gcaccactac 12000  
 gtggccccgt tggggccgca tttgtcccc tgaagggcg ggggaggcgt ctgggcaatc 12060  
 cccgttttac cagtccccta tcgcccctg agagggcgca ggaagcagat aatcagggta 12120  
 tcgaggcgga ttcacccttg gcgtccaacc agcggcacca gcggcgcctg agaggcgaat 12180  
 tgacataagc ctgttcgggt cgtaaactgt aatgcaagta gcgtatgccc tcacgcaact 12240  
 ggtccagaac cttgaccgaa cgcagcgggt gtaacggcgc agtggcggtt ttcattggctt 12300  
 gttatgactg tttttttgta cagtctatgc ctcgggcac caatcgat 12348

ES 2 733 312 T3

<211> 6834  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> vector

<400> 12  
 accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag 60  
 ttgcctgact ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca 120  
 ggcgtgcgat gataccgcga gaaccacgct caccggctcc ggatttatca gcaataaacc 180  
 agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt 240  
 ctattaattg ttgcogggaa gctagagtaa gtagtctgcc agttaatagt ttgcgcaacg 300  
 ttgttgccat cgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca 360  
 gctccggttc ccaacgatca aggcgagta catgatccc catggtgtgc aaaaagcgg 420  
 ttagctcctt cgtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca 480  
 tggttatggc agcactgcat aattctetta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg 540  
 tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct 600  
 cttgcccggc gtcaatacgg gataatacgg cgccacatag cagaacttta aaagtgetca 660  
 tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca 720  
 gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg 780  
 tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac 840  
 ggaaatggtg aatactcata ttcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt 900  
 attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggtca 960  
 gtgttacaac caattaacca attctgaaca ttatcgcgag cccatttata cctgaatatg 1020  
 gctcataaca cccttggtt gcctggcggc agtagcggg tggcccacc tgaccccatg 1080  
 ccgaactcag aagtgaaacg ccgtagcggc gatggtagtg tggggactcc ccatgcgaga 1140  
 gtagggaact gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg 1200  
 cccgggctaa ttatggggtg tcgcccttat tcgactctat agtgaagttc ctattctcta 1260

10

ES 2 733 312 T3

gaaagtatag gaacttctga agtggggatc cggccggcct gcagccccgc agggcctgtc 1320  
 tcggtcgatc attcagcccc gctcatagat atgcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg 1380  
 taagttagct cactcattag gcaccccagg cttgacactt tatgcttccg gctcgtataa 1440  
 tgtgtggaat tgtgagcgga taacaataac aatttcacac aggatctagg aaccaaggag 1500  
 agtggcatat gatcatcggc gtccctaag aaatcaaaaa caacgaaaa cgcgtggcac 1560  
 tgacccccggg tgggtgtgcc caattgatca gcaacggcca ccgtgtcttg gtcgaaaccg 1620  
 gcgctggtct gggtagcggc tttgagaacg aggcatacga gtcggcagggt gcggagatta 1680  
 ttgccgatcc taagcagggtg tgggacgccg agatggttat gaaagtgaaa gaaccgctgc 1740  
 cggagaata cgtttacttt cgcaaaggtc tggttctggt cacctatctg cacttggccc 1800  
 ctgagccgga gctggcacia gcgctgaagg ataaggcgtg tacggcgatc gcgtatgaaa 1860  
 cgggtgtctga gggccgtacc ctgccctgc tgaccccgat gagcgaggtt gccggtcgta 1920  
 tggcagccca gatcggtgcg cagttcctgg agaaaccgaa aggtggcaag gccattctgc 1980  
 tggcgggtgt cccgggtgtt tctcgtggtg aggtcactat cattggcgggt gccgtggtcg 2040  
 gtaccaacgc ggcgaagatg gcggttggcc tgggtgctga cgttacgatt atcgacttga 2100  
 acgctgatcg cctgcgtcaa ttggacgaca tctttggcca ccagatcaag acctgatct 2160  
 ccaatccggt gaatatcgcg gacgcggtgg cggaggcggg tctgctgatt tgcgcagttc 2220  
 tgattcctgg cgcgaaggcg ccgaccctgg tcacggaaga aatggtgaaa caaatgaaac 2280  
 cgggtagcgt gattgttgac gtagcgttg atcagggtgg tatcgtgaa actgttgacc 2340  
 acatcacgac tcatgatcag ccgacgtacg agaaacatgg tgttgttcaac tatgcagttg 2400  
 caaatatgcc ggggtcgggc ccgcgtacta gcacgattgc cctgaccaat gtgaccgttc 2460  
 cgtatgcact gcaaattgca aataagggtg cgggtgaaggc tttggcggac aacaccgcgc 2520  
 tgcgtgctgg tctgaatacc gcgaacggtc atgtgacctg tgaggcggtc gcacgtgacc 2580  
 tgggttatga gtacgtgcct gcagagaagg cactgcagga cgagagctcc gtggcaggtg 2640  
 cgtaataagc tttaaaggaga tataatatgc agaaacagcg taccacctct cagtggcgtg 2700  
 aactggatgc ggcgcacatc ctgcatccgt ttaccgatac cgcgagcctg aatcaggcgg 2760  
 gtgcgcgtgt gatgaccctg ggcgaaggcg tgtatctgtg ggatagcga ggcaacaaaa 2820  
 ttattgatgg catggcgggc ctgtggtgcg tgaacgtggg ctatggccgt aaagattttg 2880  
 cggaaagcggc gcgtcgtcag atggaagaac tgccgtttta taacaccttc tttaaaacca 2940  
 cccatccggc ggtggtggaa ctgagcagcc tgctggccga agttaccccg gcaggttttg 3000  
 atcgtgtgtt ttataccaac agcggcagcg aaagcgtgga taccatgatt cgtatggtgc 3060  
 gtcgttattg ggatgtgcag ggcaaacggg aaaaaaaaa cctgattggc cgttggaacg 3120  
 gctatcacgg cagcaccatt ggcggtgcca gcctggcggg catgaaatat atgcatgaac 3180

ES 2 733 312 T3

agggcgatct gccgattccg ggcattggcg atattgaaca gccgtggtgg tataaacatg 3240  
 gcaaagatat gaccccgat gaatttgccg tggttgcggc gcgttggtg gaagaaaaa 3300  
 ttctggaaat cggcgcggat aaagtggcgg cgtttgtggg cgaaccgatt cagggtgccg 3360  
 gcggtgtgat tgttccgccg gcaacctatt ggccggaaat tgaacgtatt tgccgcaaat 3420  
 atgatgtgct gctggttgcg gatgaagtga tttgcggctt tggccgtacc ggcgaatggt 3480  
 ttggccatca gcattttggc tttcagccgg acctgtttac cggcggcгаа ggcctgagca 3540  
 gcggctatct gccgattggc gcggtgtttg tgggcaaacg tgttgccgaa ggtctgattg 3600  
 cgggcggtga ttttaacct ggctttacct atagcggcca tccggtgtgt gcggcggtgg 3660  
 cgcattgcgaa tgttgccggc ctgctgtatg aaggcattgt gcagcgtgtg aaagatgata 3720  
 ttggcccgtg tatgcagaaa cgttggcgtg aaacctttag ccgttttgaa catgtggatg 3780  
 atgtgcgtgg cgtgggcatt gtgcaggcgt ttaccctggt gaaaaacaaa gcgaaacgtg 3840  
 aactgtttcc ggattttggc gaaattggca ccctgtgccg cgatattttt tttcgcaaca 3900  
 acctgattat gcgtgcgtgc ggcgatcaca ttgtgtctgc accgccgctg gttatgacct 3960  
 gtgcggaagt ggatgaaatg ctggccgtgg cggaacgttg cctggaagaa tttgaacaga 4020  
 ccctgaaagc gcgtggcctg gcctaaacta gttcaacaac tctcctggcg caccatcgtc 4080  
 ggctacagcc tcgggaattg ctgcaagtcg acggatcgcc ggaattaatt ctcatgtttg 4140  
 acagcttacc actgatcagt gaattaatgg cgatgacgca tccctcacgat aatatccggg 4200  
 taggcgcaat cactttcgtc tctactcctg tacaagcga ggctgggtat ttcccggcct 4260  
 ttttgggccg gccggatcca aatgaaggg aagttcctat actttctaga gaataggaac 4320  
 ttctataggg agtogaataa gggcgacaca aaaggattc taaatgcata ataaatactg 4380  
 ataacatctt atagtttgta ttatattttg tattatcgtt gacatgtata attttgatat 4440  
 caaaaactga ttttcccttt attattttcg agatttattt tcttaattct ctttaacaaa 4500  
 ctagaatat tgtatataca aaaaatcata aataatagat gaatagttta attatagggtg 4560  
 ttcattcaatc gaaaaagcaa cgtatcttat ttaaagtgcg ttgctttttt ctcatttata 4620  
 aggttaaata attctcatat atcaagcaaa gtgacaggcg cccttaaata ttctgacaaa 4680  
 tgctctttcc ctaaaactccc ccataaaaa aaccgccga agcgggtttt tacgttattt 4740  
 gcgattaac gattactcgt taccagaacc gcccaggatg cctggcagtt ccctactctc 4800  
 gccgtcgcgc tcggtcgttc ggctgcggga cctcagcgtc agcggagtgt atactggctt 4860  
 actatgttgg cactgatgag ggtgtcagtg aagtgettca tgtggcagga gaaaaaaggc 4920  
 tgcaccgggtg cgtcagcaga atatgtgata caggatatat tccgcttccct cgctcactga 4980  
 ctgctacgc tcggtcgttc gactgcggcg agcggaaatg gcttacgaac ggggcggaga 5040

ES 2 733 312 T3

tttcctggaa gatgccagga agatacttaa cagggaaagtg agagggccgc ggcaaagccg 5100  
 tttttccata ggctccgccc ccctgacaag catcacgaaa tctgacgctc aaatcagtgg 5160  
 tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggcgg ctccctcgtg 5220  
 cgctctcctg ttctgcctt tcggtttacc ggtgtcattc cgctgttatg gccgcgtttg 5280  
 tctcattcca cgctgacac tcagttccgg gtaggcagtt cgctccaagc tggactgtat 5340  
 gcacgaacc cccgttcagt ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 5400  
 caaccggaa agacatgcaa aagcaccact ggcagcagcc actggtaatt gatttagagg 5460  
 agttagtctt gaagtcatgc gccggttaag gctaaactga aaggacaagt tttggtgact 5520  
 gcgctcctcc aagccagtta cctcggttca aagagttggt agctcagaga accttcgaaa 5580  
 aaccgccctg caaggcggtt ttttcgtttt cagagcaaga gattacgcgc agaccaaacc 5640  
 gatctcaaga agatcatctt attaatact gcccgtttc cagtcgggaa acctgtcgtg 5700  
 ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgcca 5760  
 ggggtggttt tcttttcacc agtgagactg gcaacagctg attgcccttc accgcctggc 5820  
 cctgagagag ttgcagcaag cggtcacgc tggtttgccc cagcaggcga aaatcctgtt 5880  
 tgatggtggt taacggcggg atataacatg agctatcttc ggatcgtcg tatcccacta 5940  
 ccgagatata cgcaccaacg cgcagcccgg actcggtaat ggcgcgcatt gcgccagcg 6000  
 ccatctgata gttggcaacc agcatcgag tgggaacgat gccctcattc agcatttgca 6060  
 tggtttggtg aaaaccggac atggcactcc agtcgccttc cggttccgct atcggctgaa 6120  
 tttgattgcg agtgagatat ttatgccagc cagccagacg cagacgcgcc gagacagaa 6180  
 ttaatgggcc cgtaacagc gcgatttgct ggtgacccaa tgcgaccaga tgctccacgc 6240  
 ccagtcgct accgtcctca tgggagaaaa taatactggt gatgggtgtc tggtcagaga 6300  
 catcaagaaa taacgccga acattagtgc aggcagcttc cacagcaatg gcatcctggt 6360  
 catccagcgg atagttaatg atcagcccac tgacgcgttg cgcgagaaga ttgtgcaccg 6420  
 ccgctttaca ggcttcgacg ccgcttcggt ctaccatcga caccaccacg ctggcaccca 6480  
 gttgatcggc gcgagattta atcgcgcgca caatttgcca cggcgcgtgc agggccagac 6540  
 tggaggtggc aacgccaatc agcaacgact gtttgccgc cagttggtgt gccacgcggt 6600  
 tgggaatgta attcagctcc gccatcgccg cttccacttt ttcccgcgtt ttcgcagaaa 6660  
 cgtggetggc ctggttcacc acgcgggaaa cggctgata agagacaccg gcatactctg 6720  
 cgacatcgta taacgttact ggtttcatat tcaccaccct gaattgactc tcttcgggc 6780  
 gctatcatgc cataccgcga aaggttttgc gccattogat ggcgcgccgc tttt 6834

<210> 13  
 <211> 14403  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> vector

10

<400> 13

ES 2 733 312 T3

cggccccggg ctaattaggg ggtgtcgccc ttcttagtgc ctgaaaacgt tgaattccct 60  
 tgggactcta gagatccgcg ggggcccccc gggggcgcgc caagtatagg aacttcctt 120  
 cttttggat ccggccggcc caaaaaggcc gggaaatacc cagcctcgct ttgtaacgga 180  
 gtagagacga aagtgattgc gcctaccggy atattatcgt gaggatgctg catcgccatt 240  
 aattcactga tcagtgataa gctgtcaaac atgagaatta attccggcga tccgtcgact 300  
 tgcagcaatt ccgaggctg tagccgacga tgggtcgcca ggagagttgt tgaactagtt 360  
 agtataacag gcgtgagtac caacgctcta gattatagg cgaggccacg cgctttgagg 420  
 gtctgttcaa attcttcgag gcaacgttcc gccacggcga gcatttcac cacttcgca 480  
 cgggtcataa cgagcggcgy tgcagacaca atgtgatcgc cgcacgcacg cataatgagg 540  
 ttgttgcgaa aaaaaatc gcggcagagg gtgccaattt cgccaaaatc cggaaagagt 600  
 tcacgtttcg ctttgtttt cagcagggtg aacgcctgca ccatgccac gccacgcaca 660  
 tcatccacat gttcaaacg gctaaaggtt tcacgccaac gtttctgcat atacgggcca 720  
 atatcatctt tcacacgctg cacaatgcct tcatcagga gcgcgcaac attcgcagc 780  
 gccaccgccc cacacaccgy atggccgcta taggtaaagc catgggttaa atcaccgccc 840  
 gcaatgagac cttcgcgaac acgtttgccc acaaacaccg cgccaatcgy gagatagccg 900  
 ctgctgaggc ctttcgccc ggtaaagagg tccggtgaa agccaaaatg ctgatggcca 960  
 aaccattcgc cgttacggcc aaagccgcaa atcacttcac ccgcaacgag gagcacatca 1020  
 tttttcggc aaatacgttc aatttcggc caataggtt cggcggaac aatcacaccg 1080  
 cccgcaccct gaatcggttc gccacaaaac gccgccactt tatccgccc gatttcgaga 1140  
 atttttctt cgagccaacg gcgcgcaacc acgccaatt catccggggt catatctttg 1200  
 ccatgtttat accaccacgy ctgttcaata tgcgccatgc ccggaatcgy gagatcggcc 1260  
 tgttcagca tatatttcac gccgcgagg ctgcaccgc caatggtgct gccgtgatag 1320  
 ccgttccaac ggccaatgag ggttttttt tccggtttgc cctgcacac ccaataacga 1380  
 cgcaccatac gaatcatggt atccacgctt tcgctgccc tgttggtata aaacacacga 1440  
 tcaaaacctg ccgggtaac ttccggcagagg aggtgctga gttccaccac cgccggatgy 1500  
 gtggttttaa agaaggtggt ataaaacggg agttctcca tctgacgacg cgccgcttc 1560  
 gcaaaatctt tacggccata gccacgttc acgcaccaga ggcccggcat gccatcaata 1620  
 atttgttgc cttcgcctac ccagagatac acgccttcgc cacgggtcat cacacgcgca 1680

ES 2 733 312 T3

cccgcctgat tgaggctcgc ggtatcggta aacggatgga gatgatgcgc cgcacgcagt 1740  
 tcacgccact gagagggtgt acgctgtttc tgcatattat atctccttaa ctcgagttat 1800  
 tacgcacctg ccacggagct ctcgctctgc agtgccttct ctgcaggcac gtactcataa 1860  
 cccaggtcac gtgcgaccgc etcataggtc acatgaccgt tcgcgggtatt cagaccagca 1920  
 cgcagcgcgg tggtgtccgc caaagccttc accgcaccct tatttgcaat ttgcagtgca 1980  
 tacggaacgg tcacattggt cagggcaatc gtgctagtac gcgggaccgc acccggcata 2040  
 tttgcaactg catagtgaac aacaccatgt ttctcgtacg tcggctgatc atgagtcgtg 2100  
 atgtggtcaa cagtttccac gataccacc tgatcaatcg ctacgtcaac aatcacgcta 2160  
 cccggtttca tttgtttcac catttcttcc gtgaccaggg tcggcgcctt cgcgccagga 2220  
 atcagaactg cgcaaatcag cagatccgcc tccgccaccg cgtcccgat attcaccgga 2280  
 ttggagatca aggtcttgat ctggtggcca aagatgtcgt ccaattgacg caggcgatca 2340  
 gcgttcaagt cgataatcgt aacgtcagca cccaggccaa ccgccatctt cgcgcggtg 2400  
 gtaccgacca cgccaccgcc aatgatagtg acctaccac gagaaacacc cgggacacc 2460  
 gccagcagaa tgcccttgcc accttctggt ttctccagga actgcgcacc gatctgggct 2520  
 gccatacgac cggcaacctc gctcatcggg gtccagcagc gcagggtacg gccctcagac 2580  
 accgtttcat acgcgatcgc cgtaacgccc ttatccttca gcgcttgtgc cagctccggc 2640  
 tcagcggcca agtgcagata ggtgaacaga accagacctt tcgaaaagta aacgtattct 2700  
 tccggcagcg gttctttcac tttcataacc atctcggcgt cccacacctg cttaggatcg 2760  
 gcaataatct ccgcacctgc cgactcgtat gcctcgttct caaagccgct acccagacca 2820  
 gcgcgcggtt cgaccaagac acggtggccg ttgctgatca attgggacac accaccggg 2880  
 gtcagtgcc a gcggttttc gttgtttttg atttctttag ggacgccgat gatcatatgc 2940  
 cactctcctt ggttcttaga tcctgtgtga aattgttatt gttatccgct cacaattcca 3000  
 cacattatac gagccggaag cataaagtgt caagcctggg gtgcctaatag agtgagctaa 3060  
 ettacattaa ttgcgttgcg etcaactgcc ctgcaggggc cggccgttta aacaccaggt 3120  
 gcgatcgcgc ggccgcgctc gagaacgctt accgccaaca cagcagtgta tttgaataag 3180  
 agctcgaaca tgatcggatc tcccatttca gcaaggaaa tcccaccata gccaccaccg 3240  
 atttatgtgg cgtagaaaac ggtcatcacc aaatatggca ataactcccc gcccaagcgc 3300  
 cacataacag cctgggccac attttacgcg gttagttcgc acgtacggag tcgggggggc 3360  
 ggcaggtaac tgccgtccct atcgcgaccg ttggttcgag tggctgagca tcattgctaa 3420  
 tcaggttaatt ttatactccc tgcaagcgc ccttgacgtt taggcaaatt tattgtctca 3480  
 gttgcaatca gtcgctcctg ettgtagca aggacttcta gttcaagagt ttcgttatta 3540  
 attgcaacaa cgagtttatc gtagtccttt agagcaccaa gtccttgacg cgcctccct 3600

ES 2 733 312 T3

ttaagatcag accagaaccg tggtaggggtt ggtgctggtg ttgatgtgcc acagatgcta	3660
cttgcgacaa tttgagcgtg tgtaaccgca ttatgaattg tctctaaacg taccatcgtt	3720
ccccaaaaag gatttctagc cattgcgcag tgcgccattg catatatact tgtatccgat	3780
gtacacatct gatcatcgac cacaacacca ttactcactt caagggccgc ctcagttgcc	3840
agctctagct ctgggatagc accgattcca actacaatca gatccgcctg aatttcttct	3900
ccactttcaa gtacgcattg ttcaacatgg ccattcctgc cctttataga cgtaatttc	3960
gcattcagct tgaactcaat tccttcagcc tccaggcggg ctctgactaa gtttgctgct	4020
gccggcgtaa ccacgcgcgc cattacacgc ggggtggctt ctatcactgt gaccctcttc	4080
cctaagccca ccgcagctga ggcgacttca agcccgatta ctccgccgcc caacacaaca	4140
acagacgcac tctccacaag tttcctacgt aaatttttgg cgtcttccat actgcgtaaa	4200
tagcagaccc cagacagttc agaccctcgc caggtaacc tacgtgcgct agcaggtgtt	4260
gcaagaatca atttttcata cgcgtattct tttccatctt tagaagaaac tatcttacgc	4320
cccacgtcga ttgatacaat cgggtgtattt aacgaaatgg taatattggt attcgtataa	4380
aaaccttctg gctttaatgg cactgcggat tctgcaatct cacttgctag aaaagccttg	4440
gatagaggag gccgctgata aggcgccaca gactccctgc taaaaatcct aatttccct	4500
ttataaccat attgacgaag ccagaacgca gcatttactc cagctgtacc agcgccaaca	4560
acaacgattg ccataattct ctctccgta tacttttcac tatatcactt aatgccgatt	4620
atthtagata attccttgac gctcagcttc aattggtgct tgcgtgcgat tcactacatt	4680
caagtgggca aatattttcc tcatatgcca ctttatagca tcttcgggtga catgcatatt	4740
tgttgctatt tgtttgttg agcaccctc ttttacaagc ctcaagacag caatctgctt	4800
ccgtgtcaat aaagcgtcag ctttattctc tgcggacttt ccaatctcaa ctattcgcgg	4860
aagactaaaa gccccaatcg cttgatctaa attaactgct gtgaaggctt cacatgaagc	4920
cggattattt cgctcaatta aacatacttc atcaagaact gtttgaaagc attgaagctg	4980
ttttgctatc tccactgcat aaacaatggt aagctgagcc ttttttaaat caccgacacc	5040
tgcctgcgct ccggccaaac acaataatcc acggacttcc agctggcccg cgtaattttt	5100
acgggcttgc tgaatagcca ataacgctct gtgcgcggca ctatgaaagt tccgatctcg	5160
ggaaagcact agtgattgaa caagcagcag gcgtgctttt aggggggctg agtgctgtcc	5220
ggagaaaatc ttatgatctt caagagtttt taaattattt atgcccgta tgccttgaca	5280
gactaagcgc tgatagatct caatttggct cataacttcc aatcttggtg gatttttttc	5340
aaccgcatgc gccttcgccc actccaatat ctcaatggag ccatttaggt cactccttcc	5400
aagccgcca gctgacacag cacggcatac ggaaaaaac acgtctgtca ccccgatgatt	5460

ES 2 733 312 T3

ggaaatgaac tctaaaatth tggagagcct ttctctgag gtgtccaagc agcgcattc 5520  
 ataatgtaac tcaagctcta gagcgtcaaa cattttcgaa gtaaaactcgg attccatcat 5580  
 ctgcgcgca ctgtctgtgc gtgcttgagt tataatctgc ctgcgccagc ccatttttcc 5640  
 gcttgctagg gcttgttgaa acctcgcgac atacagccaa ccaaaagcaa aattttgttt 5700  
 tgcaaattha ttcacggctt gggcctgagc cagcaccttc tccaactctg caaatctata 5760  
 ctcaactggca aaaataaaaag ccaaacaggt tagcgcggcc ccttttccaa ctgcgtttga 5820  
 atccccaaat aaactaatcc acttattaca gagctcctca ctcgaaagca tttcatcttt 5880  
 ggttgcttha cctattgcaa gcacaagctg cagccattcc ttttcttgc atttattttt 5940  
 tttatcggat tgtgaagata ggtctttaat taacttctct gctcgcgcgc ctgctgact 6000  
 gaaatacaat acccagcgt aactaataag cactatgggt ttttgggtcc aggcctgctt 6060  
 cggcagctct aacagccact gtctcagcgc atctatttcg cctgacgaa atgacaaatc 6120  
 taaaattatt ctctcagaca tgctgactgc ccagcgcagc tcattcgcgc gtagggatat 6180  
 tcgtattgca tactggtatt cacctctacg ccaatgccag aaagctgcac gcttaagcag 6240  
 gtaggatctt ttagcaggat tttcagtcca agtaatttct cgtagaaaat tacgcagtac 6300  
 tggatgcagt gtaaaactgc ctggctcacc gctcacatgg cgaagcaaca tgtaattagt 6360  
 gcttaaatc ttaatacatg agacccatt gaogcatttg aatacataat tgtattgatc 6420  
 aggcgtcacg aaatcgagca atgaagaatt tgcaagaaa acacgatagc gctcgggaat 6480  
 cgcctcaaat atttcatccc taaagtaatt gtctacttca actactgctg aaatatgctt 6540  
 ggcggcaac tcacgtttha acaaaaaaac tacaagagca ggccaccct caacttcttg 6600  
 caccaaggtc tctatctggt cttcaggaac tccaagaaca gactctgcct ccgctaacgc 6660  
 caccgcctct tctgcgctaa aggccaaagtc tttctcggtg tactcccgca tagcgcctgc 6720  
 aagtttaagc tgcgagaacc cttttattgt attgcctgca actgcaaacc tgatattttt 6780  
 tgggtgtattt aacataaact ccataaagtc gtgcaacaac ggcaagtcta agtcatgatt 6840  
 aatattatcc aaacaaacta gcgtttctat ctcgttatc gaggtgctct gccaaagact 6900  
 agatgcaagg tctcgaaga gcgcaggctt gctcacacc tctctcacac ggcgtaattt 6960  
 taccatttcg aaagtttcaa gctgctcaat aatctctgcg cagatatcaa attcactgta 7020  
 agaactggct cttaaaagaaa gccacactgc aggacgtccg gctgttctgt ggcgtagcca 7080  
 ctgaaogca agagcaacg ttttccata tccaggtagg gctctgtaa ggcatactct 7140  
 gggagcggct ccatccgca tactcaatct tggccgatat atgcaactat gaactttggc 7200  
 acttactaga gtcgtaattt gatccgctcc gaccttagcg accgggaaat cattatttat 7260  
 tattattttc attatgctat tctcgcgcca gctgactgga aattttcacc ataggttacg 7320  
 gtgttaata ttaaaactac acttaagtg agtcggcatg atcgggtggtg caaaatattt 7380

ES 2 733 312 T3

actaggaag gtctgaagta ggccgctatt tctggccgac ttcggccttc gccgattttg 7440  
aagacgggca ccgggtcaaa atcgaccaga tagctcgctc atttcgggtc tttcagccgt 7500  
cgcgagtagc tgcgggtacc tggcatgctt gcggccagct cgtgtttttc cagcagacga 7560  
cggagcaaaa actaccgta ggtgtagttg gcgcaagcgt ccgattagct caggtttaag 7620  
atgtcgagag tgagagtggg cggcttaact ttctcagtta gccataaaat tacgtcttaa 7680  
atctcgtagc gactaattta ataaaaattg gagaattcca tatgcttgag aaacacagag 7740  
ttctggattc cgctccagag tacgtagata aaaagaaata tctctggata ctatcaactt 7800  
tgtggccggc tactccgatg atcggaatct ggcttgcaaa tgaactgggt tgggggattt 7860  
tttatgggct ggtattgctc gtatggtacg gcgcacttcc attgcttgat gcgatgtttg 7920  
gtgaggactt taataatccg cctgaagaag tgggtgccgaa actagagaag gagcgggtact 7980  
atcgagtttt gacatatcta acagttccta tgcattacgc tgcattaatt gtgtcagcat 8040  
gggtgggtcgg aactcagcca atgtcttggc ttgaaattgg tgcgcttgcc ttgtcactgg 8100  
gtatcgtgaa cggactagcg ctcaatacag gacacgaact cggtcacaag aaggagactt 8160  
ttgatcgttg gatggccaaa attgtgttgg ctgtcgtagg gtacgggtcac ttctttattg 8220  
agcataataa gggatcatcac cgtgatgtcg ctacaccgat ggatcctgca acatcccgga 8280  
tgggagaaaag catttataag ttttcaatcc gtgagatccc aggagcattt attcgtgctt 8340  
gggggcttga ggaacaacgc ctttcgcgcc gtggccaaaag cgtttggagt ttcgataatg 8400  
aaatcctcca accaatgatc atcacagtta ttctttacgc cgttctcctt gccttgtttg 8460  
gacctaatgat gctgggtgttc ctgccgattc aaatggcttt cggttgggtg cagctgacca 8520  
gtgcgaacta tattgaacat tacggcttgc tccgtcaaaa aatggaggac ggtcgatatg 8580  
agcatcaaaa gccgcacat tcttgaata gtaatcacat cgtctctaata ctagtgtgtg 8640  
tccaccttca gcggcactcg gatcaccacg cgcacccaac acgttcttat cagtcacttc 8700  
gggattttcc cggcctgccc gctcttccga cgggttacc cgggtgcattt ttgatggcga 8760  
tgattcctca gtggttttaga tcagttatgg atcccaagg agtagattgg gctggtggtg 8820  
accttaataa gatccaaatt gatgattcga tgcgagaaac ctatttgaaa aaatttgca 8880  
ctagtagtgc tggatcatagt tgcgtagcct ctgcggtagc atcgtagtta tgtgagcagc 8940  
cagagcccgg cggtcgatat ttacaataag tgcttcaatt ttatgtgcgg cgttgaaagc 9000  
tctcacaag agtgcacttc gctaaagtgc tgagggttga ttgcctctct gtaattgctt 9060  
tgaaggcgac ctgctccgat agttacactc tgatgaagtt gtcggagcag cgactaacgc 9120  
tgagttaata ggagagtggg agaattgtcaa ggtaccagtg tccagattgt cagtatatct 9180  
atgatgaaaa taagggggag ccgcacgaag gtttccacc gaacaccagc tggaatgata 9240

ES 2 733 312 T3

tccccaaaga ttgggcatgc cgggactgcg cagttcgaga caaggtggac tttatctttc	9300
tcgcggattc tcctctgaaa gaaacacagc taggggtgaa tagtcagctt gccaaactcg	9360
aaagtgggat ttcagatgct actccaactg gaatggcagt tttggccgca gaattagtga	9420
tcccacttaa tcaagaaaat aaaaatgagg gctgtgcggc taagactgaa gttcttgatc	9480
aggcgagcac cccacagggt gtaagaaaat cttccacaag gaagaagatg agaaataaat	9540
aacgcaaatt tgccgcaacg caaaataaca atttgacatg gtgatgagta tggctagcta	9600
taaatgcccg gattgtaatt atgtttatga tgagagtgcg ggtaatgtgc atgaggggtt	9660
ttctccaggt acgccttggc accttattcc tgaggattgg tgctgccccg attgcgccgt	9720
tcgagacaag cttgacttca tgtaattga gagcggcgta ggtgaaaagg gcgtcacctc	9780
aaccatact tcgccaaatt tatccgaggt tagtggcaca agtttaactg ctgaagcagt	9840
ggttgcgccg acaagcttag agaaattgcc tagtgcggac gttaaaggcc aagatctata	9900
taaaactcaa cctccaaggt ctgatgccc aaggcggaaa gcataactga agtggatatg	9960
tattacttgt ggccatatat atgatgaggc gttgggcgat gaggccgagg gttttactcc	10020
aggtactcgc tttgaggata ttcctgatga ctgggtgctgt ccggattgcg gggctacgaa	10080
agaagactat gtgctctacg aggaaaagtg aagattaaaa cttcaagtca ttctaggtaa	10140
ttcaggacaa aataaaaatg accataccaa ttagcctagc caagttaaac tctagtgccg	10200
ataccattc agcgcctgtc gacctgtaac gacaacaaaa cgagggtagc acaatgagtt	10260
tttctaatta taaagtaatc gcgatgccg tggttggttgc taattttgtt ttgggggocg	10320
ccactgcatg ggcgaatgaa aattatccgg cgaaatctgc tggctataat cagggtgact	10380
gggtcgctag ottcaatfff totaaggtct atgtgggtga ggagcttggc gatctaaatg	10440
ttggaggggg ggctttgcc aatgctgatg taagtattgg taatgataca acacttacgt	10500
ttgatatcgc ctattttgtt agctcaaata tagcgggtgga tttttttgtt ggggtgccag	10560
ctagggctaa atttcaaggt gagaaatcaa tctcctcgct gggaagagtc agtgaagttg	10620
attacggccc tgcaattctt tcgcttcaat atcattacga tagctttgag cgactttatc	10680
catatgttg gggttgggtt ggtcgggtgc tattttttga taaaaccgac ggtgctttga	10740
gttcgtttga tattaaggat aaatgggcgc ctgcttttca ggttggcctt agatatgacc	10800
ttgtaactc atggatgcta aattcagatg tgcgttatat tcctttcaaa acggacgtca	10860
caggtaactc tggcccgggt cctgtttcta ctaaaattga ggttgatcct ttcattctca	10920
gtcttgggtc gtcatatggt ttctaagtaa tcaggctctgt cactgtcgca ggtcgacctg	10980
cagccaagct tctgttttgg cggatgagag aagattttca gcctgataca gattaatca	11040
gaacgcagaa gcggctctgat aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc ggtggtecca	11100
cctgacccca tgccgaactc agaagtgaaa cgccgtagcg ccgatggtag tgtgggtct	11160

ES 2 733 312 T3

ccccatgcca gagtagggaa ctgccaggca tcaaataaaa cgaaaggctc agtcgaaaga 11220  
 ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct ctcctgagta ggacaaatcc 11280  
 gccgggagcg gatttgaacg atgataagct gtcaaacatg agaattacaa cttatatcgt 11340  
 atggggctga cttcaggtgc tacatttgaa gagataaatt gcaactgaaat ctagaatat 11400  
 tttatctgat taataagatg atcttcttga gatcgttttg gtctgcgctg aatctcttgc 11460  
 tctgaaaacg aaaaaaccgc cttgcagggc ggtttttcga aggttctctg agctaccaac 11520  
 tctttgaacc gaggtaactg gcttgaggga ggcagtcac caaaacttgt cctttcagtt 11580  
 tagccttaac cggcgcatga cttcaagact aactcctcta aatcaattac cagtggctgc 11640  
 tgccagtggg gcttttgcag gtctttccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 11700  
 ggcgcagcgg tcggactgaa cgggggggttc gtgcatacag tccagcttgg agcgaactgc 11760  
 ctaccggaa ctgagtgta ggcgtggaat gagacaaacg cggccataac agcggaatga 11820  
 caccgtaaa ccgaaaggca ggaacaggag agcgcacgag ggagccgcca ggggaaacg 11880  
 cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccaccactg atttgagcgt cagatttctg 11940  
 gatgcttgtc aggggggctg agcctatgga aaaacggctt tgccgcgcc ctctcacttc 12000  
 cctgttaagt atcttctctg catcttccag gaaatctccg ccccgctcgt aagccatttc 12060  
 cgctcgcgc agtcgaacga ccgagcgtag cgagtcagtg agcggggaag cggaatatat 12120  
 cctgtatcac atattctgct gacgcaccgg tgcagccttt tttctctgc cacatgaagc 12180  
 acttcaactga caccctcatc agtgccaaca tagtaagcca gtatacactc cgctagcgt 12240  
 gatgtccggc ggtgcttttg ccgttacgca ccaccccgtc agtagctgaa caggagggac 12300  
 agctgataga aacagaagcc actggagcac ctcaaaaaa ccatcataca ctaaactcagt 12360  
 aagttggcag catcaccgca cgcactttgc gccgaataaa tacctgtgac ggaagatcac 12420  
 ttcgcagaat aaataaatcc tgggtgcctt gttgataccg ggaagccctg ggccaacttt 12480  
 tggcgaaaat gagacgttga tcggcacgta agaggttcca actttcacca taatgaaata 12540  
 agatcactac cgggcgtatt ttttgagtta tcgagatttt caggagctaa ggaagctaaa 12600  
 atggagaaaa aatcactgag atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 12660  
 cttttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 12720  
 attacgcct ttttaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt 12780  
 cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggt 12840  
 gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaaactgaa 12900  
 acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 12960  
 tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tcctaaagg gtttattgag 13020

ES 2 733 312 T3

aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg 13080  
gccaatatgg acaacttctt cgcccccggtt ttcacccatgg gcaaatatta tacgcaaggg 13140  
gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtctgtga tggcttccat 13200  
gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcgatg agtggcaggg cggggcgtaa 13260  
tttttttaag gcagttattg gtgcccttaa acgcctgggtg ctacgcctga ataagtata 13320  
ataagcggat gaatggcaga aattcgaaag caaattcgac ccggtcgtcg gttcagggca 13380  
gggtcgttaa atagccgctt atgtctattg ctggtttacc ggtttattga ctaccggaag 13440  
cagtggtacc gtgtgcttct caaatgcctg aggccagttt gctcaggctc tccccgtgga 13500  
ggtaataatt gacgatatga tcatttattc tgcctcccag agcctgataa aaacggttag 13560  
cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag 13620  
atccggaaca taatgggtga gggcgcttgt ttcggcgtgg gtatgggtggc agggccccgtg 13680  
gccgggggac tgttggggcg tgcgggcacc tgtcctacga gttgcatgat aaagaagaca 13740  
gtcataagtg cggcgacgat agtcatgccc cgcgccacc ggaaggagct accggacagc 13800  
gggtcggact gttgtaactc agaataagaa atgaggccgc tcatggcgtt gactctcagt 13860  
catagtatcg tggtatcacc ggttggttcc actctctggt gcgggcaact tcagcagcac 13920  
gtaggggact tcccggtttc cagactttac gaaacaogga aaccogaagac cattcatggt 13980  
gttgctcagg tcgcagacgt tttgcagcag cagtgccttc acgttcgctc gcgtatcgg 14040  
gattcattct gctaaccagt aaggcaaccc cgcagccta gccgggtcct caacgacagg 14100  
agcacgatca tgcgcacccg tggccaggac ccaacgctgc ccgagatgcg ccgctgtcgg 14160  
ctgctggaga tggcggacgc gatggatatg ttctgccaag ggttggtttg cgcattcaca 14220  
gttctccgca agaattgatt ggctccaatt cttggagtgg tgaatccgtt agcgaggtgc 14280  
cgccggcttc cattcaggtc gaggtggccc ggctccatgc accgcgacgc aacgcgggga 14340  
ggcagacaag gtataggggc gcgcctacaa tccatgccaa cccgttccat gtgctcggcg 14400  
agg 14403

<210> 14  
<211> 5664  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> vector

10 <400> 14  
ccctttcgtc ttcgaataaa tacctgtgac ggaagatcac ttcgcagaat aaataaatcc 60  
tgggtgccct gttgataccg ggaagccctg ggccaacttt tggcgaaaat gagacgttga 120  
tcggcacgta agaggttcca actttcacca taatgaaata agatcactac cgggctgatt 180

ES 2 733 312 T3

ttttgagtta	tcgagat	ttt	caggagctaa	ggaagctaaa	atggagaaaa	aatcactgg	240
atataccacc	gttgatata	t	cccaatggca	tcgtaaagaa	cattttgagg	catttcagtc	300
agttgctcaa	tgtacctata		accagaccgt	tcagctggat	attacggcct	ttttaagac	360
cgtaaagaaa	aataagcaca		agttttatcc	ggcctttatt	cacattcttg	cccgcctgat	420
gaatgctcat	ccggaattcc		gtatggcaat	gaaagacggg	gagctgggga	tatgggatag	480
tgttcaccct	tgttacaccg		ttttccatga	gcaaactgaa	acgttttcat	cgctctggag	540
tgaataccac	gaogatttcc		ggcagtttct	acacatatat	tcgcaagatg	tggcgtgta	600
cggtgaaaac	ctggcctatt		tccttaaagg	gtttattgag	aatatgtttt	tcgtctcagc	660
caatccctgg	gtgagtttca		ccagttttga	tttaaactgt	gccaatatgg	acaacttctt	720
cgcccccggt	ttcaccatgg		gcaaatatta	tacgcaaggc	gacaagggtgc	tgatgccgct	780
ggcgattcag	gttcatcatg		ccgtttgtga	tggcttccat	gtcggcagaa	tgcttaatga	840
attacaacag	tactgcgatg		agtggcaggg	cggggcgtaa	tttttttaag	gcagttattg	900
gtgcccttaa	acgcctggtg		ctacgcctga	ataagtata	ataagcggat	gaatggcaga	960
aattcgaaag	caaattcgac		ccggtcgtcg	gttcagggca	gggtcgtaa	atagccgctt	1020
atgtctattg	ctggtttatc		ggtaccggg	gatcgcggcc	gcggaccgga	tcctctagag	1080
cggcccgcat	cctctagagt		cgaccgggtg	cgaatgggac	gcgccctgta	gcggcgcatt	1140
aagcgcggcg	ggtgtggtgg		ttacgcgcag	cgtgaccgct	acacttgcca	gcgccctagc	1200
gcccgctcct	ttcgctttct		tccttctctt	tctcgccacg	ttcgccggct	ttccccgta	1260
agctctaaat	cgggggctcc		ctttaggggt	ccgatttagt	gctttacggc	acctcgacct	1320
caaaaaactt	gattaggggtg		atggttcacg	tagtgggcca	tcgccctgat	agacggtttt	1380
tcgccctttg	acgttgaggt		ccacgttctt	taatagtggg	ctcttggttc	aaactggaac	1440
aacactcaac	cctatctcgg		tctattcttt	tgatttataa	gggattttgc	cgatttcggc	1500
ctattgggta	aaaaatgagc		tgatttaaca	aaaatttaac	gcgaatttta	acaaaatatt	1560
aacgcttaca	athtaggtgg		cacttttcgg	ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta	1620
tttttctaaa	tacattcaaa		tatgtatccg	ctcatcagat	cctttttaac	ccatcacata	1680
tacctgccgt	tcactattat		ttagtgaaat	gagatattat	gatattttct	gaattgtgat	1740
taaaaaggca	actttatgcc		catgcaacag	aaactataaa	aaatacagag	aatgaaaaga	1800
aacagataga	tttttaggtt		ctttagggcc	gtagtctgca	aatcctttta	tgattttcta	1860
tcaaacaaaa	gaggaaaata		gaccagttgc	aatccaaacg	agagtctaata	agaatgaggt	1920
cgaaaagtaa	atcgcgcggg		ttgttactg	ataaagcagg	caagacctaa	aatgtgtaaa	1980
gggcaaagtg	tatactttgg		cgtaacccct	tacatatttt	aggtcttttt	ttattgtgcg	2040

ES 2 733 312 T3

taactaactt gccatcttca aacaggaggg ctggaagaag cagaccgcta acacagtaca	2100
taaaaaagga gacatgaacg atgaacatca aaaagtttgc aaaacaagca acagtattaa	2160
cctttactac cgcactgctg gcaggagggc caactcaagc gtttgcgaaa gaaacgaacc	2220
aaaagccata taaggaaaca tacggcattt cccatattac acgccatgat atgctgcaaa	2280
tccctgaaca gcaaaaaaat gaaaaatata aagttcctga ttcgtccaca attaaaaata	2340
tctcttctgc aaaagcctg gacgtttggg acagctggcc attacaaaac gctgacggca	2400
ctgtcgcaaa ctatcacggc taccacatcg tctttgcatt agccggagat cctaaaaatg	2460
cggatgacac atcgatttac atgttctatc aaaaagtcgg cgaaacttct attgacagct	2520
ggaaaaacgc tggccgcgtc tttaaagaca gcgacaaatt cgatgcaaat gattctatcc	2580
taaaagacca aacacaagaa tggtcaggtt cagccacatt tacatctgac ggaaaaatcc	2640
gtttattcta cactgatttc tccggtaaac attacggcaa acaaacactg acaactgcac	2700
aagttaacgt atcagcatca gacagctctt tgaacatcaa cgggtgtagag gattataaat	2760
caatctttga cggtyacgga aaaacgtatc aaaatgtaca gcagttcatc gatgaaggca	2820
actacagctc aggcgacaac catacctga gagatcctca ctacgtagaa gataaaggcc	2880
acaaataactt agtatttgaa gcaaacactg gaactgaaga tggctaccaa ggcgaagaat	2940
ctttatttaa caaagcatac tatggcaaaa gcacatcatt cttccgtcaa gaaagtcaaa	3000
aacttctgca aagcgataaa aaacgcacgg ctgagttagc aaacggcgct ctcggtatga	3060
ttgagctaaa cgatgattac aactgaaaa aagtgatgaa accgctgatt gcatctaaca	3120
cagtaacaga tgaaattgaa cgcgcgaacg tttttaaata gaaocggcaa tggtaacctg	3180
tcactgactc ccgcggatca aaaatgacga ttgacggcat tacgtctaac gatatttaca	3240
tgcttggtta tgtttctaata tctttaactg gccatacaa gccgctgaac aaaactggcc	3300
ttgtgttaaa aatggatctt gatcctaacg atgtaacctt tacttactca cacttcgctg	3360
tacctcaagc gaaaggaaac aatgtcgtga ttacaagcta tatgacaaac agaggattct	3420
acgcagacaa acaatcaacg tttgcgcaa gcttcctgct gaacatcaaa ggcaagaaaa	3480
catctgttgt caaagacagc atccttgaac aaggacaatt aacagttaac aaataaaaac	3540
gcaaaagaaa atgccgatcc ggtttattga ctaccggaag cagtgtgacc gtgtgcttct	3600
caaatgcctc aggcgtgcta tgtgtgactg ttgagctgta acaagttgtc tcagggttct	3660
aatttcatgt tctagtgtct ttgttttact ggtttcacct gttctattag gtgttacatg	3720
ctgttcatct gttacattgt cgatctgttc atgggtgaaca gctttaaatg caccaaaaac	3780
tcgtaaaagc tctgatgtat ctatcttttt tacaccgttt tcatctgtgc atatggacag	3840
tttcccttt gatataaac ggtgaacagt tgttctactt ttgtttgtta gtcttgatgc	3900
ttcactgata gatacaagag ccataagaac ctcagatcct tccgtattta gccagtatgt	3960

ES 2 733 312 T3

tctctagtgt	ggttcgttgt	ttttgcgtga	gccatgagaa	cgaaccattg	agatcatgct	4020
tactttgcat	gtcactcaaa	aatthttgcct	caaaaactgg	gagctgaatt	tttgacgtta	4080
aagcatcgtg	tagtgthttt	cttagtccgt	tacgtaggta	ggaatctgat	gtaatggttg	4140
ttggtattht	gtcaccattc	atthtttatct	ggttgttctc	aagttcggtt	acgagatcca	4200
tttgtctatc	tagttcaact	tggaaaatca	acgtatcagt	cgggcggcct	cgcttatcaa	4260
ccaccaatth	catattgctg	taagtgttta	aatctthtact	tattggthttc	aaaaccatt	4320
ggtaagcct	tttaaaactca	tggtagttat	tttcaagcat	taacatgaac	ttaaattcat	4380
caaggctaath	ctctatatht	gccttgtgag	ttthctthttg	tgttagttct	tttaataacc	4440
actcataaath	cctcatagag	tatthgttht	caaaagactt	aacatgttcc	agattatath	4500
ttatgaatth	ttthaaactgg	aaaagataag	gcaatathctc	ttcactaaaa	actaattcta	4560
atthttcgtc	tgagaacttg	gcatagthttg	tcactggaa	aatctcaaag	cthttaacca	4620
aaggattcct	gattthccaca	gttctcgtca	tcagctctct	ggttgctthta	gctaatacac	4680
cataagcatt	thccctactg	atgthcatca	tctgagcgtta	ttggttataa	gtgaacgata	4740
ccgtccgttc	thtccctgta	gggtthttcaa	tcgtgggtt	gagtagtgcc	acacagcata	4800
aaattagcct	ggtthcatgc	thccgttaagt	catagcagact	aatcgcctagt	tcatttgctt	4860
tgaaaacaac	taattcagac	atacatctca	atthgtctag	gtgattthta	tcactatacc	4920
aattgagatg	ggctagtcaa	tgataattac	tagthcttht	cctthgagtt	gtgggtatct	4980
gtaaattctg	ctagaccctth	gctggaaaac	ttgtaaatthc	tgctagacc	thctgtaaath	5040
ccgttagacc	thtgtgtgtt	ththttgtth	atathcaagt	ggttataath	tatagaataa	5100
agaaagaata	aaaaaagata	aaaagaatag	atcccagccc	tgtgtataac	tcactactth	5160
agtcagthcc	gcagtattac	aaaaggatgt	cgcaaacgct	gthtgctcct	ctacaaaaaca	5220
gacctaaaa	ccctaaaggc	ttaagtagca	ccctcgcaag	ctcgggcaaa	tcgctgaata	5280
thcctthttg	ctccgacat	caggcacctg	agthcgtgtc	ththttcgtga	cattcagthc	5340
gctgcgctca	cggctctggc	agtgaatggg	ggtaaatggc	actacaggcg	cctthttatgg	5400
atthcatgcaa	ggaaactacc	cataatacaa	gaaaagcccg	tcacgggctt	ctcagggcgt	5460
thtatggcgg	gtctgctatg	tggtgctatc	tgactthttg	ctgthcagca	gthcctgccc	5520
thctgaththc	cagthctgacc	actthcgatt	atcccgtgac	aggthcattca	gactggctaa	5580
thgcaccagth	aaggcagcgg	tatcatcaac	aggcttacc	gtcttactgt	cggatcgacg	5640
ctctccctta	thcgactcct	gcat				5664

## REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la conversión de un éster de ácido carboxílico de fórmula (I)

5  $R^1 - A - COOR^2$  (I),

seleccionándose  $R^1$  del grupo que consiste en hidrógeno,  $-CH_2OH$ ,  $-CHO$ ,  $-COOR^3$ ,  $-CH_2SH$ ,  $-CH_2OR^3$  y  $-CH_2NH_2$ ,

10 seleccionándose  $R^2$  del grupo que consiste en alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

seleccionándose  $R^3$  del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo, y tratándose en el caso de A de un resto alquileno o alquenileno, lineal, no sustituido, con al menos 4, más preferiblemente 6, aún más preferiblemente 8 átomos de carbono,

15 por medio de una célula, que comprende la etapa de

a) poner en contacto la célula con el éster de ácido carboxílico en una disolución acuosa,

20 tratándose en el caso de la célula de una célula recombinante, en la que la actividad de un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo, presentando la variante esencialmente la misma actividad enzimática del polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 y presentando la variante una homología con SEQ ID NO 2 de al menos el 90%, está reducida con respecto al tipo silvestre de la célula.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de

25 b) poner en contacto la disolución acuosa con una disolución orgánica hidrófoba que comprende un intercambiador catiónico.

3.- Uso de una desactivación de un gen que codifica para un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo como parte de la dotación genética de una célula recombinante para aumentar la producción de un éster de ácido carboxílico de fórmula (I)

30  $R^1 - A - COOR^2$  (I),

35 seleccionándose  $R^1$  del grupo que consiste en hidrógeno,  $-CH_2OH$ ,  $-CHO$ ,  $-COOR^3$ ,  $-CH_2SH$ ,  $-CH_2OR^3$  y  $-CH_2NH_2$ ,

seleccionándose  $R^2$  del grupo que consiste en alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

40 seleccionándose  $R^3$  del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

tratándose en el caso de A de un resto alquileno o alquenileno lineal, no sustituido, con al menos 4, más preferiblemente 6, aún más preferiblemente 8 átomos de carbono,

45 y presentando la variante esencialmente la misma actividad enzimática del polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 y presentando la variante una homología con SEQ ID NO 2 de al menos el 90%,

4.- Uso de una célula recombinante, en el que la actividad de un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo, presentando la variante esencialmente la misma actividad enzimática del polipéptido que comprende SEQ ID NO 2, y presentando la variante una homología con SEQ ID NO 2 de al menos el 90%, está reducida con respecto al tipo silvestre de la célula, para la conversión de un éster de ácido carboxílico de fórmula (I)

50  $R^1 - A - COOR^2$  (I),

55 seleccionándose  $R^1$  del grupo que consiste en hidrógeno,  $-CH_2OH$ ,  $-CHO$ ,  $-COOR^3$ ,  $-CH_2SH$ ,  $-CH_2OR^3$  y  $-CH_2NH_2$ ,

seleccionándose  $R^2$  del grupo que consiste en alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

seleccionándose  $R^3$  del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, preferiblemente metilo, etilo y propilo,

60 y tratándose en el caso de A de un resto alquileno o alquenileno, lineal, no sustituido, con al menos 4, más preferiblemente 6, aún más preferiblemente 8 átomos de carbono.

5.- Procedimiento o uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, tratándose en el caso de A de un resto alquileno saturado, preferiblemente de un resto alquileno de fórmula  $-(CH_2)_n-$ , siendo n al menos 4.

65

- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, seleccionándose R<sup>1</sup> del grupo que consiste en hidrógeno, -CH<sub>2</sub>OH, -CHO y -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.
- 5 7.- Procedimiento o uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, expresando la célula además una transaminasa.
- 8.- Procedimiento o uso según una de las reivindicaciones 1 a 7, expresando la célula además una alanina deshidrogenasa.
- 10 9.- Procedimiento o uso según una de las reivindicaciones 1 a 8, presentando la célula además una proteína de la familia AlkL.
- 15 10.- Procedimiento o uso según una de las reivindicaciones 1 a 9, presentando la célula una actividad reducida con respecto a su tipo silvestre de al menos una enzima, que catalizada una de las reacciones de la β-oxidación de ácidos grasos, tratándose preferiblemente de una enzima del grupo que comprende ácido graso-CoA-ligasa, acil-CoA-deshidrogenasa, 2,4-dienoil-CoA-reductasa, enoil-CoA-hidratasa, 3-cetoacil-CoA-tiolasa, un importador de ácidos grasos o variantes de los mismos, presentando las variantes esencialmente la misma actividad enzimática de la ácido graso-CoA-ligasa, de la acil-CoA-deshidrogenasa, de la 2,4-dienoil-CoA-reductasa, de la enoil-CoA-hidratasa, de la 3-cetoacil-CoA-tiolasa o del importador de ácidos grasos, de manera especialmente preferible de FadL o una variante del mismo, presentando la variante esencialmente la misma actividad enzimática del FadL.
- 20 11.- Procedimiento o uso según una de las reivindicaciones 1 a 10, presentando y/o sobreexpresando la célula al menos una enzima del grupo que consiste en alcano hidroxilasa, alcohol deshidrogenasa, transaminasa, alanina deshidrogenasa y una proteína de la familia AlkL en forma recombinante.
- 25 12.- Procedimiento o uso según una de las reivindicaciones 1 a 11, estando reducida la actividad de un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo con respecto al tipo silvestre de la célula mediante la desactivación de un gen que codifica para un polipéptido que comprende SEQ ID NO 2 o una variante del mismo.

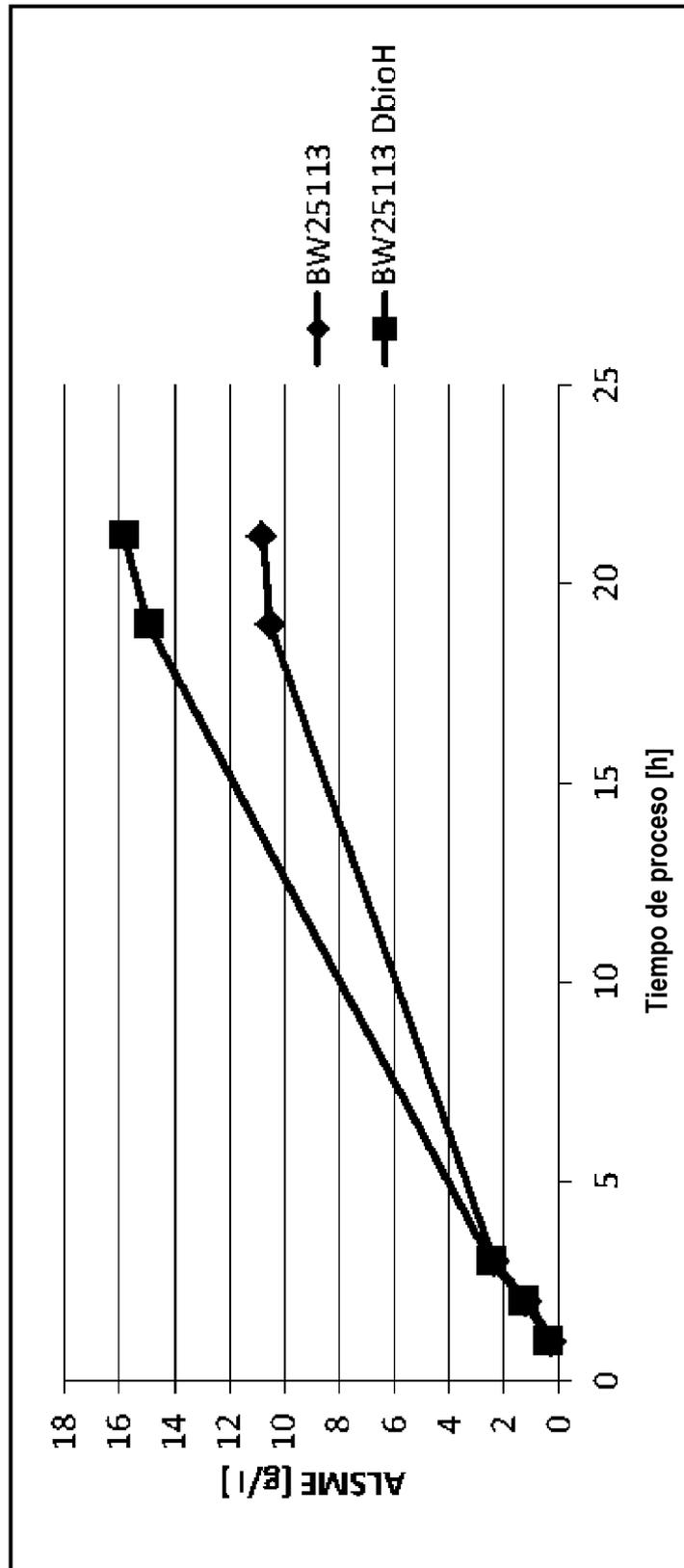


Figura 1