



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

## Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201230835	
Fecha de recepción:	31 mayo 2012, 12:58 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	486	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	HIPERPRODUCCION DE CELULOSA BACTERIANA	
Documentos enviados:	Descripcion.pdf (8 p.) Reivindicaciones.pdf (1 p.) Resumen.pdf (1 p.) Dibujos.pdf (2 p.) OLF-ARCHIVE.zip OTRO-1.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (9 p.) SEQLTXT.txt BIORCPT-1.pdf (1 p.) BIORCPT-2.pdf (1 p.) BIORCPT-3.pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=NOMBRE UNGRIA LOPEZ JAVIER - NIF 05211582N,OU=500050022,OU=FNMT Clase 2 CA,O=FNMT,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	31 mayo 2012, 12:58 (CEST)	
Codificación del envío:	C0:90:4A:98:57:DE:F1:21:4B:E1:C3:00:E9:AD:52:01:CA:85:F6:37	





(1) MODALIDAD:	<b>PATENTE DE INVENCION</b> <b>MODELO DE UTILIDAD</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5) DIRECCION ELECTRONICA HABILITADA (DEH):		
(6-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL:  NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME:  DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAIS RESIDENCIA: CODIGO PAIS: TELEFONO: FAX: PERSONA DE CONTACTO:  MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)  España ES Q2818002D  Serrano nº 117 MADRID 28 Madrid 28006 España ES  <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(7-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/PASAPORTE:	PEREZ MENDOZA DANIEL España ES 32053809-C
(7-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/PASAPORTE:	GALLEGOS FERNANDEZ MARIA TRINIDAD España ES 24250235-R
(7-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS:	SOTO MISSFUT MARIA JOSE España ES

(7-4) INVENTOR 4:	DNI/PASAPORTE: APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	24228081-L PRADA RAMIREZ HAROLD ALEXIS Colombia CO Y0737619T
(7-5) INVENTOR 5:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	OLMEDILLA ARNAL ADELA España ES 05342418-R
(7-6) INVENTOR 6:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	SANJUAN PINILLA JUAN España ES 24173944-R
(8) TÍTULO DE LA INVENCION:		HIPERPRODUCCION DE CELULOSA BACTERIANA
(9) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:		SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>
(10) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACCELERADO DE CONCESIÓN		SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:		SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
(12-1) DEPÓSITO 1:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO:  NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	Plasmido pJBPléD Colección Española de Cultivos Tipo Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot (Valencia), España CECT8034 [ ]
(12-2) DEPÓSITO 2:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO:  NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	SmepJBPléD Colección Española de Cultivos Tipo Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot (Valencia), España CECT8035 [ ]
(12-3) DEPÓSITO 3:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO:  NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	PstpJBPléD Colección Española de Cultivos Tipo Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot (Valencia), España CECT 8036 [ ]
(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:		LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS <input checked="" type="checkbox"/>
(14) EXPOSICIONES OFICIALES:		LUGAR:

	FECHA:	
(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(16) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: NOMBRE: CÓDIGO DE AGENTE:  NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE:  DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO:  NÚMERO DE PODER:	UNGRIA LOPEZ JAVIER 0392/1  España ES  AVDA. RAMON Y CAJAL, 78 MADRID 28 Madrid 28043 España ES  oepm@ungria.es  201101882
(17) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES:  DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: JUSTIFICANTE DEL DEPÓSITO BIOLÓGICO (1): JUSTIFICANTE DEL DEPÓSITO BIOLÓGICO (2): JUSTIFICANTE DEL DEPÓSITO BIOLÓGICO (3): LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BÚSCUDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):  -OTRO1.pdf DECLARACION DE SECUENCIAS	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 8 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 17 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 4 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 9 <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1
(18) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:	DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:
(19) NOTAS:		
(20) FIRMA:	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:  LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:	NOMBRE UNGRIA LOPEZ JAVIER - NIF 05211582N MADRID 31 Mayo 2012



TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL  
DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL  
PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DESTINATARIO Juan Sanjuan Pinilla Dpto. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos Estación Experimental del Zaidín, CSIC C/ Prof. Albareda 1 18008 Granada  <p style="text-align: center;">NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE</p>	RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO INICIAL expedido en virtud de la Regla 7.1 por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada en la parte inferior de esta página
<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación asignada por el DEPOSITANTE: PstpJBPlE*	Número de orden atribuido por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:  CECT 8036
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado en I venía acompañado: <input checked="" type="checkbox"/> de una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> de una designación taxonómica propuesta (Márquese lo que corresponda)	
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta autoridad internacional de depósito acepta el microorganismo identificado en I, que ha recibido el 18 de octubre de 2011 (fecha del depósito inicial) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECEPCIÓN DE UNA PETICIÓN DE CONVERSIÓN</b>	
Esta autoridad internacional de depósito ha recibido el microorganismo identificado en I, el _____ (fecha de depósito inicial) y recibió una petición de conversión del depósito inicial en depósito conforme con el Tratado de Budapest el _____ (fecha de recepción de la petición de conversión)	
<b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>	
Nombre: COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT). Dirección: Edificio 3 CUE. Parc Científic Universitat de Valencia Catedrático Agustín Escardino, 9 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la autoridad internacional de depósito o del (de los) empleado(s) autorizado(s)   Fecha: 19 de diciembre de 2011 Fdo.: José Miguel López Coronado  

<sup>1</sup>En caso de aplicación de la Regla 6.4d), ésta será la fecha en la que haya sido adquirido el estatuto de autoridad internacional de depósito.

## HIPERPRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA

### RESUMEN

5 La presente invención se refiere a una célula para producción de celulosa bacteriana que contiene genes para la síntesis y exportación de celulosa bacteriana, y además una transformación con una construcción genética que induce un aumento en la producción de dicha celulosa, donde dicha construcción genética comprende un gen *pleD*\* dispuesto bajo control transcripcional de un promotor constitutivo o inducible. Preferentemente, la célula es una seleccionada entre *Sinorhizobium meliloti* CECT 8035 y *Pseudomonas syringae* CECT 8036. Además, la  
10 invención también hace referencia a un método de producción de celulosa bacteriana que comprende el uso de dichas células, y a la celulosa bacteriana obtenible por este método.

Es asimismo objeto de la presente invención, la construcción genética anterior para inducir un aumento en la producción de celulosa bacteriana en una célula con capacidad para sintetizar y exportar de celulosa bacteriana,  
15 así como su uso para la producción de celulosa bacteriana.



## HIPERPRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA

### DESCRIPCIÓN

#### 5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un método para aumentar la producción de celulosa bacteriana de un cultivo celular, preferentemente bacteriano, basado en una construcción genética que comprende el gen *pleD\**, y se enmarca dentro del sector biotecnológico, con aplicaciones en los sectores químico, textil y sanitario.

10

#### Estado de la técnica

La celulosa es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza y consiste en residuos de glucosa unidos por enlaces  $\beta$  1-4, formando una cadena lineal. Las cadenas lineales se asocian por puentes de hidrógeno y "cristalizan" formando microfibrillas. La celulosa posee gran importancia industrial y comercial para la fabricación de fibras textiles, papel, aditivos de alimentos, recubrimientos, sistemas de empaquetado o dispositivos médicos.

15

La celulosa se obtiene principalmente de tejidos vegetales como algodón, lino, maderas, etc. No obstante, existen microorganismos que pueden producir celulosa, p. e., bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, etc. Se trata de la denominada Celulosa Bacteriana (CB), también conocida como celulosa microbiana o biocelulosa (U. Römling. 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria, Res. Microbiol. 153: 205-212). Aunque químicamente idéntica a la celulosa vegetal, la CB es de más fácil purificación y modificación química, y además posee una estructura fibrilar distinta que determina unas propiedades físicas y mecánicas diferentes que permiten también aplicaciones novedosas.

20

25

Los microorganismos más frecuentemente utilizados para la producción industrial de CB pertenecen al género *Gluconacetobacter* (anteriormente denominado *Acetobacter*), sobre todo a la especie *G. xylinus* (ex *Acetobacter xylinum*). Cultivos de estas bacterias pueden producir fibrillas extracelulares de celulosa adheridas a las células bacterianas, resultando en la formación de películas o aglomerados, dependiendo de la forma de cultivo, que son mezcla de celulosa y células bacterianas.

30

Hasta ahora se han utilizado principalmente bacterias del género *Gluconacetobacter* (ex *Acetobacter*) para la producción industrial de CB, debido a la capacidad natural de estas bacterias para producir altas cantidades de este polímero. De hecho, distintas publicaciones (revisado por P. R. Chawla et al. 2009. Microbial cellulose: Fermentative production and applications. Food Technol. Biotechnol. 47:107-124) divulgan procesos para la optimización de las condiciones de cultivo de *Gluconacetobacter* (*Acetobacter*) en la producción de CB. Asimismo, también se han descrito mejores cepas productoras, principalmente de *G. xylinum*, con ciertas características metabólicas, tales como una capacidad reducida de producir ácido glucónico y ácidos cetoglucónicos, resistencia a etanol, o una transformación genética con un gen que codifica una enzima implicada en el metabolismo de la sacarosa, que permiten incrementar la estabilidad del cultivo productor o la cantidad de celulosa producida por los cultivos de dichas bacterias.

35

40

Otras mejoras, como la desarrollada por Ben-Bassat y colaboradores, implican el uso de los genes del operón de la celulosa sintasa de *Gluconacetobacter* para aumentar la dosis génica y obtener microorganismos recombinantes que produzcan mayores cantidades de CB (A. Ben-Bassat et al. 1991, "Methods and nucleic acid sequences for the expression of the cellulose synthase operon", Documento US 5268274). Aunque se ha especulado con la posibilidad de obtener bacterias valiosas para la producción industrial de celulosa mediante la manipulación de los genes estructurales y/o reguladores de la síntesis de celulosa (P.R. Chawla et al., 2009. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. Food Technol. Biotechnol. 47:107-124), no se conocen otros ejemplos concretos que apoyen esta posibilidad.

45

50

En *Gluconacetobacter xylinum* (antes conocida como *Acetobacter xylinum*) el c-di-GMP (diguanylate cíclico) actúa como un activador de la biosíntesis de celulosa. Sin embargo, los niveles intracelulares de c-di-GMP están regulados por la acción de dos tipos de enzimas con acciones contrapuestas: diguanilato ciclasas (DGC), que ciclan dos moléculas de GTP para producir c-di-GMP y PPI, y fosfodiesterasas (PDE) que degradan el c-di-GMP hasta la forma inactiva pGpG. Diversas evidencias sugieren que el c-di-GMP también actúa como un regulador de la biosíntesis de celulosa en otras bacterias (U. Römling. 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria, Res. Microbiol. 153: 205-212; C. Bassis & K. Visick 2010. The cyclic-di-GMP phosphodiesterase BinA negatively regulates cellulose-containing biofilms in *Vibrio fischeri*. J. Bacteriol. 192:1269-1278).

55

60

Pérez-Mendoza et al. han relacionado el aumento de los niveles intracelulares de c-di-GMP a través de la sobreexpresión de una diguanilato ciclasa constitutivamente activa (*PleD\**) con la producción de poli-N-acetil-glucosamina, pero no con celulosa (Perez-Mendoza et al. 2011; N-acetyl-glucosamine-dependent biofilm formation in *Pectobacterium atrosepticum* is cryptic and activated by elevated c-di-GMP levels; Microbiology 157: 3340-3348). De hecho, se ha encontrado que no existe una relación directa entre la sobreexpresión de actividad DGC, los niveles intracelulares de c-di-GMP y la cantidad de celulosa producida.

65

Por ejemplo, S. Ude y colaboradores han demostrado, de manera cualitativa pero no cuantitativa, que la sobreexpresión de la proteína WspR19 (que posee actividad DGC constitutiva) en distintas cepas y especies de *Pseudomonas*, provoca la formación de biopelículas que contienen celulosa en su matriz. Sin embargo, la sobreexpresión de esta misma DGC WspR19 en otras bacterias, como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, provoca una débil expresión de celulosa (S. Ude et al., 2006. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates, Environ. Microbiol. 8:1997-2011). Por tanto, aunque la sobreexpresión de distintas proteínas con actividad DGC suele conllevar aumentos moderados o altos de los niveles intracelulares de c-di-GMP, estos incrementos del c-di-GMP intracelular no garantizan la hiperproducción de celulosa, posiblemente porque las bacterias poseen mecanismos para mantener restringidos los niveles de este efector en determinados compartimentos celulares, como podría ser la membrana plasmática a la que se asocia la celulosa sintasa.

En la inmensa mayoría de los ejemplos anteriores, el microorganismo productor de celulosa es *G. xylinus*, bacteria en la que han sido estudiados la mayoría de procesos básicos relacionados con la biosíntesis de celulosa, y que además posee de manera natural la capacidad de producir altas cantidades de celulosa en medios de cultivo. No obstante, en algunos casos también se ha patentado el uso de bacterias diferentes a *G. xylinus* para la producción de CB, por ejemplo *Enterobacter* (K. Fujiwara et al. 2001, "New bacterial cellulose-producing microorganism and promoted recovering method of petroleum by utilizing the same", Patente JP3896564B2), o *Proteus* (P. Delaquis 2010, "Cellulose production by facultatively anaerobic bacteria", Patente US7811795B2).

Se conoce que muchas otras bacterias poseen potencial de producción de celulosa, aunque a diferencia de *Gluconacetobacter*, habitualmente lo hacen en muy pequeñas cantidades, lo que impide su aprovechamiento industrial. Si estos otros tipos de bacterias pudiesen ser aprovechadas industrialmente para la producción de CB, podrían aplicarse nuevas y más rentables condiciones de producción de CB, condiciones que actualmente son dependientes de los requerimientos fisiológicos y nutritivos de *Gluconacetobacter*. Además, es sabido que las propiedades físico-químicas de la CB varían dependiendo de la bacteria productora y que distintas propiedades físico-químicas de las fibrillas de CB pueden implicar distintas posibilidades de aplicación de la CB producida. Aunque existen muchas otras bacterias con capacidad para producir celulosa, lo hacen generalmente en condiciones muy concretas y en muy bajas cantidades, por lo que su explotación industrial para la obtención de CB no es rentable. Para que puedan ser industrialmente rentables, es necesario conseguir que aquellas bacterias que naturalmente producen pequeñas cantidades de CB puedan aumentar notablemente su capacidad de producción.

Por tanto, es deseable poder ampliar el abanico de géneros y especies bacterianas que puedan ser aprovechadas industrialmente para la producción de CB. Esto conllevaría aumentar el abanico de condiciones de producción para obtener mejores productividades (ratio coste-beneficio) de los procesos industriales o semi-industriales de producción de CB. Además, permitiría contar con la posibilidad de producción de CBs con nuevas propiedades físico-químicas, y por tanto de nuevas aplicaciones de las CBs obtenidas a partir de distintas bacterias.

### Descripción de la invención

La presente invención se refiere al aumento de la capacidad de producción de CB, o hiperproducción de celulosa, en un amplio espectro de bacterias. Para ello, se procede a una modificación genética de las bacterias que provoca un enorme aumento (50 veces o más) de los niveles intracelulares de c-di-GMP, el compuesto activador de la actividad de la celulosa sintasa bacteriana. De esta forma se acelera la actividad de la enzima celulosa sintasa presente en dichas bacterias y, por tanto, se multiplica la capacidad de producción de celulosa en los cultivos de dichas bacterias. La modificación genética es aplicable a cualquier bacteria.

En la presente invención, para conseguir el aumento de la producción de celulosa, las bacterias son modificadas genéticamente, introduciéndoles el gen *pleD\**, que codifica para una proteína con alta actividad diguanilato ciclasa constitutiva (DGC<sup>c</sup>). El gen *pleD\** es un gen mutante derivado de *pleD* de *Caulobacter crescentus*. PleD participa en el control del ciclo de vida de esta bacteria y, más concretamente, en la transición de células móviles a sésiles ("stalked"). Mientras que la proteína codificada por *pleD* requiere ser fosforilada para expresar actividad DGC, *pleD\** codifica una proteína mutante que muestra elevada actividad DGC en ausencia de fosforilación y de forma constitutiva (R. Paul et al. 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. Genes Dev. 18:715-727). Hay que señalar que ninguno de los dos genes, *pleD* ni *pleD\** han sido relacionados con la producción de celulosa ni en *C. crescentus* ni en otras bacterias.

De manera general, el proceso para la obtención de bacterias genéticamente modificadas y la hiperproducción de celulosa podría comprender las siguientes etapas:

1. El gen *pleD\** es dispuesto bajo control transcripcional de un promotor constitutivo (esto es, que mantiene altos niveles de expresión con independencia de las condiciones ambientales), o bajo control de un

promotor inducible, esto es, que solo es activo en presencia de un agente inductor como alguna sustancia química o condición ambiental.

2. El gen *pleD\** dispuesto según el punto 1, es clonado en un vector plasmídico capaz de replicarse establemente en la bacteria de destino.
3. La construcción resultante de 1 y 2 es introducida en la bacteria elegida, por métodos de conjugación, transformación o electroporación bacteriana, dependiendo del vector de clonación elegido y de la bacteria de destino.
4. Alternativamente a los pasos 2 y 3, el gen *pleD\** dispuesto como se describe en el punto 1, puede ser integrado en el genoma de la bacteria deseada, por alguno de los métodos conocidos para recombinación homóloga o no homóloga, por ejemplo mediante el uso de transposones u otros vectores moleculares que no son capaces de autorreplicarse en la bacteria de destino pero que pueden mediar procesos de recombinación entre ácidos nucleicos.
5. Las bacterias genéticamente modificadas con el gen *pleD\**, de acuerdo a los puntos 1-4, son cultivadas en condiciones propicias para la biosíntesis y exportación extracelular de celulosa. Esto incluye contenedores de cualquier forma y volumen, que contienen caldos, líquidos o solidificados con sustancias gelificantes, que incluyen compuestos carbonados, nitrogenados, sales minerales y otros elementos esenciales o importantes para la multiplicación celular, p.e. oxígeno. La composición, pH y temperatura del caldo de cultivo puede variar dependiendo de la cepa o especie bacteriana productora de celulosa. Las condiciones y tiempos de cultivo para la producción de celulosa por los cultivos bacterianos también pueden ser variadas, implicando condiciones estáticas, o condiciones de agitación por sistemas mecánicos, o condiciones de semiagitación por métodos físicos, por ejemplo burbujeo mediante la inyección de uno o más gases en los caldos de cultivo o en los recipientes que los contienen.
6. La biomasa producida tras la incubación de los caldos es recogida para la posterior separación de las fibras de celulosa y las bacterias por cualquier método físico, químico o mecánico. Las fibras de celulosa obtenidas son posteriormente procesadas por métodos químicos, físicos o mecánicos, dependiendo de cual vaya a ser su uso posterior.

Un primer aspecto de la invención se refiere a una célula, preferentemente una bacteria, para producción de celulosa bacteriana que comprende:

- genes para la síntesis y exportación de celulosa bacteriana,
- una transformación con una construcción genética que induce un aumento en la producción de dicha celulosa, donde dicha construcción genética comprende un gen *pleD\** dispuesto bajo control transcripcional de un promotor, ya sea un promotor constitutivo o un promotor inducible.

Cuando la construcción genética anterior comprende un promotor constitutivo y se introduce en una célula que contiene genes para la síntesis y exportación de celulosa bacteriana, es capaz de inducir o aumentar la producción de celulosa bacteriana de dicha célula, cuando la célula se cultiva en condiciones adecuadas para producir celulosa (y que se definen más adelante en la presente descripción). Sin embargo, para que se produzca el aumento de la producción de celulosa cuando la construcción genética comprende un promotor inducible, además de cultivar la célula en condiciones adecuadas para producir celulosa, es necesario también que la célula sea cultivada en presencia de al menos un agente inductor capaz de activar a dicho promotor inducible. Así por ejemplo, en el caso de construcciones genéticas del gen *pleD\** bajo control transcripcional del promotor constitutivo *Ptet*, para aumentar la producción de celulosa se requieren condiciones de cultivo en presencia de tetraciclina. Esto quiere decir, que en las condiciones de cultivo anteriores, la construcción genética induce la hiperproducción de celulosa en una célula que contiene genes para la síntesis y exportación de celulosa bacteriana.

Según la presente invención, el término promotor constitutivo se refiere a un promotor genético que expresa continuamente el gen que regula, en este caso el gen *pleD\**, como por ejemplo, y sin que sirva de limitación, los promotores constitutivos *Plac* o *Ptac*. El término promotor inducible en la presente invención hace referencia a un promotor genético que activa la expresión del gen *pleD\** al que regula en respuesta a un factor externo (o agente inductor), como por ejemplo una sustancia química o una condición ambiental, y que en este caso controla la transcripción del gen *pleD\**, como es entre otros (y sin que sirva de limitación) el promotor inducible *Ptet*, que es activado en presencia de tetraciclina. No obstante, existen secuencias promotoras que se comportan como constitutivas o como inducibles dependiendo de la célula que los expresa, por ejemplo el promotor *Plac* es inducible en *Escherichia coli* pero se comporta como constitutivo en *Rhizobium* o *Pseudomonas*.

La célula o bacteria productora de celulosa bacteriana según se define en este aspecto de la invención, cuando se cultiva en condiciones adecuadas para producir celulosa, produce al menos 25 veces más celulosa bacteriana que una célula similar carente de la construcción genética definida anteriormente.

5 En esta memoria, las condiciones de cultivo para producir celulosa bacteriana hacen referencia a las condiciones habitualmente empleadas y conocidas por cualquier experto en la materia. Dichas condiciones incluyen contenedores de cualquier forma y volumen, que contienen caldos, líquidos o solidificados con sustancias gelificantes, que incluyen compuestos carbonados, nitrogenados, sales minerales y otros elementos esenciales o importantes para la multiplicación celular, p.e. oxígeno. La composición, pH y temperatura del caldo de cultivo puede variar dependiendo de la cepa o especie bacteriana productora de celulosa. Las condiciones y tiempos de cultivo para la producción de celulosa por los cultivos bacterianos también pueden ser variadas, implicando condiciones estáticas, o condiciones de agitación por sistemas mecánicos, o condiciones de semiagitación por métodos físicos, por ejemplo burbujeo mediante la inyección de uno o más gases en los caldos de cultivo o en los recipientes que los contienen.

15 En el ámbito de esta memoria, la expresión “hiperproducción de celulosa bacteriana” se refiere a la producción de celulosa por parte de una célula en una cantidad multiplicada por al menos 25 a la que se obtendría por una célula del mismo tipo sin la construcción genética que comprende el gen *pleD*\*. Análogamente, la expresión “célula o bacteria hiperproductora de celulosa bacteriana” hace referencia a una célula o bacteria que comprende la construcción genética de la invención, y es capaz de producir al menos 25 veces más celulosa que una misma célula o bacteria carente de dicha construcción genética, cuando se cultiva en condiciones adecuadas para producir celulosa y de expresión del gen *pleD*\*.

25 Según la invención, el término “genes para síntesis y exportación de celulosa bacteriana” hace referencia a los genes necesarios para que una célula, preferentemente una bacteria, tenga la capacidad de sintetizar celulosa bacteriana y exportar dicha celulosa bacteriana al exterior celular. Típicamente, el operón de la biosíntesis de la celulosa en *Gluconacetobacter xylinus* y otras bacterias en que se ha estudiado, contiene al menos 2 genes: *bcsA* (también denominado *acsA* o *celA* según la especie bacteriana), que codifica para la celulosa sintasa y *bcsB* (también llamado *acsB* o *celB*) que codifica una proteína de unión a c-di-GMP (diguanylate cíclico). Algunas veces *bcsA* y *bcsB* pueden estar fusionados formando único gen; en otros casos, el operón puede incluir un tercer gen, *bcsZ* (o *celC*) que codifica una celulasa también necesaria para la síntesis de celulosa *in vivo* (U. Römling. 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria, Res. Microbiol. 153: 205-212).

35 Según la invención, y sin que sirva de limitación, ejemplos de células o bacterias que comprenden genes para síntesis y exportación de celulosa, y que son susceptibles de transformación con una construcción genética como se definió anteriormente, son aquellas que poseen habitualmente genes para síntesis de celulosa similares a los de *Gluconacetobacter*, como son entre otras bacterias de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Burkholderia*, *Rhodobacter*, *Sarcina*, *Klebsiella*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, etc.. En esta memoria se presentan como ejemplos el aumento de producción de celulosa en bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Sinorhizobium*. Asimismo, también se entiende por célula o bacteria que comprenden genes para síntesis y exportación de celulosa, aquella célula o bacteria que, comprendiendo o no dichos genes de manera natural, se les haya dotado de los mismos mediante métodos de ingeniería genética, como por ejemplo microorganismos recombinantes con los genes de celulosa de *Acetobacter* como los descritos por Ben Bassat y colaboradores (A. Ben-Bassat et al. 1991, “Methods and nucleic acid sequences for the expression of the cellulose synthase operon”, Documento US 5268274).

45 Además, la presente invención puede ser aplicable a bacterias que se cree que no poseen capacidad de sintetizar celulosa. A modo de ejemplo, no se conocía que *Sinorhizobium meliloti* 8530 tuviese capacidad para producir celulosa, y esta capacidad ha podido ser demostrada solo gracias a la modificación genética y proceso objeto de esta solicitud de patente. Por tanto, la presente invención puede permitir poner en evidencia la capacidad de producción e hiperproducción de celulosa por otras bacterias que se cree que no la poseen.

50 En el ámbito de la presente invención, el gen *pleD*\* hace referencia a un gen procedente de *Caulobacter crescentus* que codifica para una proteína con actividad diguanylate ciclase constitutiva y preferentemente comprende la secuencia SEQ ID No: 1.

55 En una realización preferida, la célula o bacteria de este aspecto de la invención comprende una construcción genética donde el promotor es un promotor constitutivo, preferentemente un promotor constitutivo *Plac*, y más preferentemente, el promotor *Plac* que consiste en SEQ ID No: 2.

60 Según la invención, la célula transformada según se ha definido anteriormente puede presentar la construcción genética (que comprende el gen *pleD*\* dispuesto bajo control transcripcional del promotor constitutivo o inducible) clonada en un vector génico capaz de replicarse establemente en la célula de destino, como por ejemplo un plásmido, o integrada en el genoma de la célula deseada, por ejemplo mediante transposones u otros vectores moleculares que, aun no siendo capaces de autorreplicarse en la célula de destino, pueden mediar procesos de recombinación entre ácidos nucleicos.

Preferiblemente, la célula transformada presenta dicha construcción genética clonada en un plásmido, más preferentemente clonada en el plásmido pJB3Tc19 de secuencia SEQ ID No: 3, resultando el plásmido pJBPléD\* que consiste en SEQ ID No: 4. En consecuencia, en realizaciones preferidas, la construcción genética anterior está comprendida en un plásmido, y más preferiblemente dicho plásmido es SEQ ID No: 4 (plásmido pJBPléD\*)

#### **Cepa *Escherichia coli* $\beta$ 2163 transformada con el plásmido pJBPléD\* SEQ ID No: 4 (CECT 8034)**

La siguiente cepa transformada con dicho plásmido SEQ ID No: 4 (pJBPléD\*) ha sido depositada el 18 de OCTUBRE de 2011 en la **Colección Española de Cultivos Tipo** (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna, 46980 Valencia (ESPAÑA), por Juan Sanjuán Pinilla, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZADÍN (EEZ-CSIC), C/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada (ESPAÑA).

El depósito de la cepa depositada (y que comprende el plásmido SEQ ID No: 4) cuya referencia es **Plásmido pJBPléD\***, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 8034** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

En realizaciones preferidas, la célula de la invención para producción de celulosa bacteriana según se ha definido, y en cualquiera de sus realizaciones anteriores, es una bacteria.

En una realización más preferida de la anterior, dicha bacteria pertenece a una especie seleccionada entre *Pseudomonas syringae* o *Sinorhizobium meliloti*.

En otra realización preferida, cuando la célula de la invención para producción de celulosa bacteriana es una bacteria, dicha bacteria es *Sinorhizobium meliloti* CECT 8035.

En otra realización preferida, cuando la célula de la invención para producción de celulosa bacteriana es una bacteria, dicha bacteria es *Pseudomonas syringae* CECT 8036.

#### **Cepa *Sinorhizobium meliloti* 8530 pJBPléD\* (CECT 8035)**

La siguiente cepa ha sido depositada el 18 de OCTUBRE de 2011, en la **Colección Española de Cultivos Tipo** (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna, 46980 Valencia (ESPAÑA), por Juan Sanjuán Pinilla, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZADÍN (EEZ-CSIC), C/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada (ESPAÑA).

El depósito de la cepa depositada cuya referencia es **SmepJBPléD\***, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 8035** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

#### **Cepa *Pseudomonas syringae* DC3000 pJBPléD\* (CECT 8036)**

La siguiente cepa ha sido depositada el 18 de OCTUBRE de 2011, en la **Colección Española de Cultivos Tipo** (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna, 46980 Valencia (ESPAÑA), por Juan Sanjuán Pinilla, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZADÍN (EEZ-CSIC), C/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada (ESPAÑA).

El depósito de la cepa depositada cuya referencia es **PstpJBPléD\***, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 8036** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

En la presente memoria, cualquiera de las células o bacterias que comprenden la construcción genética que comprende el gen *pleD\** dispuesto bajo control transcripcional de un promotor, según se definieron anteriormente, puede ser igualmente referida como célula o bacteria de la invención, célula transformada de la invención o como bacteria transformada de la invención.

Un segundo aspecto de la invención hace referencia a una construcción genética para inducir un aumento en la producción de celulosa bacteriana en una célula que comprende genes para la síntesis y exportación de celulosa bacteriana según se ha definido en el primer aspecto de la presente invención, donde dicha construcción genética comprende un gen *pleD\** dispuesto bajo control transcripcional de un promotor (constitutivo o inducible). Preferentemente, dicho promotor es un promotor constitutivo (más preferentemente el promotor *Plac* SEQ ID No: 2) y dicho gen *pleD\** es SEQ ID No: 1.

En una realización preferida, la construcción genética está comprendida en un plásmido, y más preferiblemente dicho plásmido es SEQ ID No: 4 (plásmido pJBPléD\*).



En la presente memoria, cualquiera de las construcciones genéticas según se definieron anteriormente, y que comprenden el gen *pleD*\* dispuesto bajo control transcripcional de un promotor, puede ser igualmente referida como construcción genética de la invención.

5

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de una célula de la invención, como se definió anteriormente, que comprende:

10

- a. introducir una construcción genética que comprende el gen *pleD*\* dispuesto bajo control transcripcional de un promotor inducible o un promotor constitutivo en una célula que contiene genes para síntesis y exportación de celulosa bacteriana (célula de destino), mediante metodología recombinante.

15

Como se indicó anteriormente, la célula transformada de la invención puede presentar la construcción genética clonada en un vector génico capaz de replicarse establemente en dicha célula, como por ejemplo en un plásmido. En consecuencia, la etapa a de transformación celular puede llevarse a cabo clonando la construcción genética en el vector (plásmido), que puede ser posteriormente introducido en la célula de destino por un método de conjugación, transformación o electroporación, dependiendo de la célula de destino y del vector de clonación elegido.

20

Alternativamente, la célula transformada puede presentar la construcción genética integrada en el genoma de dicha célula. En ese caso, la etapa de transformación celular a puede llevarse a cabo por alguno de los métodos conocidos para recombinación homóloga o no homóloga, por ejemplo mediante el uso de transposones u otros vectores moleculares que no son capaces de autorreplicarse en la célula de destino, pero que pueden mediar procesos de recombinación entre ácidos nucleicos.

25

En la presente memoria, la expresión “método de conjugación” se refiere a cualquiera de los métodos habitualmente empleados en biología molecular que permiten transferir una molécula de ADN desde una bacteria donadora a una bacteria receptora tras ponerlas en contacto directo.

30

En la presente memoria, la expresión “método de transformación” se refiere a cualquiera de los métodos habitualmente empleados en biología molecular que permiten introducir una molécula de ADN en una cepa bacteriana tras poner en contacto directo dicha cepa bacteriana con la molécula de ADN.

35

En la presente memoria, la expresión “método de electroporación” se refiere a cualquiera de los métodos habitualmente empleados en biología molecular que permiten introducir una molécula de ADN en una cepa bacteriana tras poner en contacto directo dicha cepa bacteriana con la molécula de ADN y aplicar una corriente eléctrica.

40

En una realización preferida del procedimiento anterior, la construcción genética se introduce clonada en un plásmido, siendo dicho plásmido capaz de replicarse establemente en la célula. Más preferentemente, dicho plásmido es pJB*pleD*\* y consiste en SEQ ID No: 4.

45

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de una célula o bacteria de la invención, o de una construcción genética de la invención, para producir celulosa bacteriana.

Un quinto aspecto de la invención hace referencia a un método para producir celulosa bacteriana que comprende las siguientes etapas:

50

- i. cultivar una célula de la invención, según definida anteriormente, en condiciones propicias para la biosíntesis y exportación extracelular de celulosa

55

- ii. procesar la biomasa producida en el cultivo anterior que comprende separar la celulosa bacteriana del contenido celular, por cualquier método físico (p.e. decantación, filtración, centrifugación), químico (p.e. extracción con ácidos o álcalis) o mecánico (p.e. sonicación).

De acuerdo con el método de producción de celulosa, la célula de la invención puede ser cultivada en presencia de al menos otra célula, la cual también es capaz de producir celulosa bacteriana y puede haber sido previamente transformada como describe la presente invención.

60

En una realización preferida, dicho método comprende cultivar una célula de la invención seleccionada entre *Sinorhizobium meliloti* CECT 8035, *Pseudomonas syringae* CECT 8036 y una combinación de las mismas.

65

La celulosa bacteriana producida tras el cultivo o incubación de las células, puede aislarse del contenido celular a partir de la biomasa total producida tras la incubación mediante cualquier método físico, químico o mecánico, habitualmente empleado en el estado de la técnica para aislar celulosa bacteriana. Posteriormente, dicha

celulosa bacteriana obtenida y aislada puede ser procesada por métodos químicos, físicos o mecánicos dependiendo de cual vaya a ser su uso posterior, para adaptarla a las necesidades requeridas para dicho uso.

5 Un sexto aspecto de la invención hace referencia a una celulosa obtenible mediante el método (o procedimiento) de obtención de celulosa bacteriana de la presente invención descrito anteriormente.

### Breve descripción de las figuras

10 **Figura 1.** Mapa genético del plásmido pJBpLeD\* SEQ ID No: 4. Se indica la posición del gen *pleD\** (SEQ ID No: 1) y el promotor *Plac* (SEQ ID No: 2) tras su clonación en el vector pJB3Tc19 (SEQ ID No: 3).

15 **Figura 2.** Fluorescencia emitida por cultivos de las cepas SmepJBpLeD\* (*Sinorhizobium meliloti* 8530 pJBpLeD\* CECT 8035) y SmepJB3Tc19 tras tinción con calcofluor y cuantificación en fluorímetro. La emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de celulosa presente en el cultivo.

20 **Figura 3.** Fluorescencia emitida por cultivos de las cepas PstpJBpLeD\* (*Pseudomonas syringae* DC3000 pJBpLeD\* CECT 8036), Pst1026:KmpJBpLeD\* (cepa mutante que carece del gen celulosa sintasa) y PstpJB3Tc19 tras tinción con calcofluor y cuantificación en fluorímetro. La emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de celulosa presente en el cultivo.

25 **Figura 4.** Cantidad de celulosa, medida por el método de la antrona, presente en la biomasa total de los cultivos de las cepas PstpJBpLeD\* (*Pseudomonas syringae* DC3000 pJBpLeD\* CECT 8036) y PstpJB3Tc19.

### Ejemplos

30 **EJEMPLO 1: Producción de CB con bacterias *Pseudomonas syringae* DC3000 (Pst) y *Sinorhizobium meliloti* 8530 (Sme) transformadas con el plásmido pJBpLeD\* (SEQ ID No: 4) portador del gen *pleD\** (SEQ ID No: 1).**

35 Se construyó el plásmido pJBpLeD\* cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 4 mediante la clonación de un fragmento de DNA XbaI/EcoRI portador del gen *pleD\** de secuencia SEQ ID No: 1, derivado del *pleD* de *Caulobacter crescentus* (R. Paul et al. 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. Genes Dev. 18:715-727) en el vector pJB3Tc19 que comprende SEQ ID No: 3 (J.M. Blatny et al. 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. Appl Environ Microbiol 63: 370-379), resultando el plásmido pJBpLeD\* SEQ ID No: 4. En esta construcción, el gen *pleD\** quedó bajo el control transcripcional del promotor *Plac* de secuencia SEQ ID No: 2 (Figura 1).

40 Se introdujo el plásmido SEQ ID No: 4 (pJBpLeD\*; CECT 8034) en dos estirpes bacterianas diferentes: *Pseudomonas syringae* DC3000, y *Sinorhizobium meliloti* 8530. En el caso de *P. syringae* el método utilizado fue el de electroporación, en el caso de *S. meliloti* fue introducido mediante conjugación.

45 Las bacterias *P. syringae* DC3000 (Pst) y *Sinorhizobium meliloti* 8530 (Sme) fueron transformadas con el plásmido SEQ ID No: 4 (pJBpLeD\*), dando lugar a las cepas recombinantes *P. syringae* DC3000 CECT 8036 (también denominada en esta memoria como PstpJBpLeD\*) y *Sinorhizobium meliloti* 8530 CECT 8035 (también referida en la presente memoria como SmepJBpLeD\*), respectivamente. También se obtuvieron las cepas PstpJB3Tc19 y SmepJB3Tc19, que resultaron de la transformación con el plásmido pJB3Tc19 sin *pleD\** (vector vacío) de las mencionadas bacterias *P. syringae* DC3000 (Pst) y *S. meliloti* 8530 (Sme), respectivamente.

50 Los niveles intracelulares de c-di-GMP en la bacteria recombinantes PstpJBpLeD\* (CECT 8536) aumentaron 150 veces con respecto a la cepa PstpJB3Tc19. Los niveles intracelulares de c-di-GMP en la bacteria recombinante SmepJBpLeD\* (*S. meliloti* CECT 8035) aumentaron 53 veces con respecto a la cepa SmepJB3Tc19.

55 Para determinar la producción de celulosa, las bacterias recombinantes fueron inoculadas y cultivadas en frascos que contenían el caldo denominado Medio Mínimo de Robertsen modificado (MM; B.K. Robertsen et al. 1981. Structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. Plant Physiol. 67:389-400), que contiene diversas sales minerales, vitaminas, manitol y glutamato de sodio, e incubados durante 3 días a 28°C en el caso de las bacterias derivadas de Sme (SmepJBpLeD\* -CECT 8035- y SmepJB3Tc19), o durante 24 horas a 20°C en el caso de las derivadas de Pst (PstpJBpLeD\* -CECT 8036- y PstpJB3Tc19), en agitación continua (180 rpm en agitador orbital).

60 En los tiempos y condiciones expresadas, existen manifestaciones macroscópicas, observables a simple vista y que son indicativas de la presencia de fibras de celulosa en los cultivos de las bacterias PstpJBpLeD\* (CECT 8036) y SmepJBpLeD\* (CECT 8035), pero no en las bacterias transformadas con el vector pJB3Tc19 vacío (SEQ ID No: 3), PstpJB3Tc19 y SmepJB3Tc19. En agitación, los cultivos de las bacterias PstpJBpLeD\* (CECT 8036) y SmepJBpLeD\* (CECT 8035) forman gránulos o flóculos amorfos, de color blanco, aspecto algodonoso y tamaño

variable, que se mantienen flotando en el caldo de cultivo pero que se depositan rápidamente en el fondo de los frascos cuando cesa la agitación. Observaciones al microscopio de estos gránulos indican que están compuestos por un entramado de bacterias y fibras. Estos gránulos o flóculos no los forman las bacterias control PstpJB3Tc19 ni SmepJB3Tc19

En condiciones de cultivo estático (cultivo sin agitación), los cultivos de las bacterias PstpJBPléD\* (CECT 8036) y SmepJBPléD\* (CECT 8035) desarrollan una especie de nata o película densa y de color blanquecino sobre la superficie del caldo de cultivo. Estas películas no las forman las bacterias control PstpJB3Tc19 y SmepJB3Tc19. Observaciones microscópicas de estas películas indican que están compuestas por un entramado de bacterias y fibras.

Otro indicio de que tanto los gránulos como las películas descritos anteriormente contienen altas cantidades de celulosa es que son reactivos al colorante Rojo Congo, adquiriendo color rojo intenso en presencia del mismo. Además, dichos gránulos se deshacen si al medio de cultivo se añade una cantidad adecuada de enzima celulasa, que hidroliza la celulosa.

Para determinar cuantitativamente la producción de celulosa por los distintos cultivos bacterianos, se han utilizado varios métodos descritos en la bibliografía. Para ello, las bacterias se cultivaron como se ha descrito anteriormente y posteriormente se recogió la biomasa formada en cada caso.

En primer lugar, se determinó la cantidad de celulosa presente en la biomasa de cada cultivo mediante medida de la fluorescencia emitida tras tinción con el compuesto Calcoflúor (también referido en la memoria como CF), siguiendo métodos descritos en la bibliografía (p.e., C. Bassis and K. Visick 2010. The cyclic-di-GMP phosphodiesterase BinA negatively cellulose containing biofilms in *Vibrio fischeri*. J. Bacteriol. 192:1269-1278). Todas las bacterias fueron cultivadas en condiciones de agitación en el caldo MM suplementado con blanco de calcoflúor (CF) a una concentración 100  $\mu$ M, y tetraciclina (10 mg/L) durante 3 días en el caso de *S. meliloti*, o durante 24 h en el caso de *P. syringae*. Transcurridos estos tiempos, la biomasa de cada cultivo se precipitó por centrifugación, se retiró el caldo con exceso de CF y la biomasa de cada cultivo resuspendida en igual volumen de agua desionizada estéril. Se prepararon diluciones seriadas de las diferentes cepas y se midió la fluorescencia de cada uno en un fluorímetro, en un rango de excitación y emisión apropiadas para el CF (excitación: 365 nm; emisión: 435 nm). Las diferentes muestras fueron normalizadas con la DO<sub>600nm</sub> del cultivo de partida y la cantidad de celulosa expresada como unidades arbitrarias/DO<sub>600nm</sub>. En la Figura 2 se muestra como la fluorescencia de los cultivos de la cepa SmepJBPléD\* (CECT 8035) es más de 25 veces superior a la de los cultivos de la cepa control SmepJB3Tc19. Del mismo modo, en la Figura 3 se muestra que los cultivos de la cepa PstpJBPléD\* (CECT 8036) emiten casi 25 veces más fluorescencia que los de la cepa control PstpJB3Tc19. Además, este enorme incremento de la fluorescencia del cultivo de PstpJBPléD\* (CECT 8036), que ocurre como consecuencia de la expresión de PléD\*, no se observa en una cepa derivada que porta una mutación en el operón de la celulosa sintasa: la cepa Pst1026::KmpJBPléD\* (Fig. 3). Esto demuestra que la alta fluorescencia emitida por los cultivos de las bacterias portadoras de la construcción pJBPléD\* (SEQ ID No: 4) en presencia de CF, es debida a celulosa sintetizada por la celulosa sintasa.

Además, se cuantificó de forma directa la celulosa producida por cultivos de las cepas PstpJBPléD\* y PstpJB3Tc19, mediante el método de la antrona, descrito originalmente por Updegraff (D.M. Updegraff (1969). Semimicro determination of cellulose in biological materials. Anal. Biochem. 32: 420-424). Según estas medidas, como se observa en la Figura 4, la cepa PstpJBPléD\* (CECT 8036) produjo 189 veces más celulosa que la cepa control PstpJB3Tc19.

La celulosa producida por las bacterias transformadas con el plásmido pJBPléD\* (SEQ ID No: 4), cultivadas en las condiciones descritas anteriormente, llega a suponer cerca del 20% del peso seco de la biomasa total de los cultivos (Fig. 4) en un plazo de 24 horas. En contraste, la celulosa producida por las bacterias no transformadas con el gen *pleD\**, cepa PstpJB3Tc19, supuso apenas el 0,1 % de la biomasa total presente en los cultivos.

Puesto que las condiciones de cultivo han sido estándar y no optimizadas para la producción de celulosa, es esperable que la cantidad de celulosa producida por las bacterias transformadas con el gen *pleD\** será muy superior en condiciones y tiempos de cultivo optimizados. Es probable que tales condiciones óptimas de producción de celulosa varíen dependiendo de la especie y cepa bacteriana transformadas con *pleD\**. La consecución de las condiciones óptimas de producción de celulosa por diferentes bacterias transformadas con el gen *pleD\** podría ser objeto de ulteriores patentes.



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula para producción de celulosa bacteriana caracterizada porque comprende genes para la síntesis y exportación de celulosa bacteriana, y una construcción genética que induce un aumento en la producción de dicha celulosa, donde dicha construcción genética comprende un gen *pleD\** dispuesto bajo control transcripcional de un promotor.
- 10 2. Una célula según la reivindicación 1 que, cultivada en condiciones adecuadas para producir celulosa, produce al menos 25 veces más celulosa bacteriana que una célula similar carente de la construcción genética.
- 15 3. Una célula según una de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el gen *pleD\** es SEQ ID No: 1.
4. Una célula según una de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho promotor es un promotor constitutivo.
5. Una célula según la reivindicación 4, donde el promotor constitutivo es un promotor *Plac*.
- 20 6. Una célula según la reivindicación 5, donde dicho promotor *Plac* es SEQ ID No: 2.
7. Una célula según una de las reivindicaciones 1 a 6, donde la construcción genética está comprendida en un plásmido.
- 25 8. Una célula según la reivindicación 7, donde el plásmido consiste en SEQ ID No: 4.
9. Una célula según una de las reivindicaciones 1 a 8, donde la célula es una bacteria.
- 30 10. Una célula según la reivindicación 9, donde la bacteria pertenece a una especie seleccionada entre *Pseudomonas syringae* o *Sinorhizobium meliloti*.
11. Una célula según la reivindicación 9, donde la bacteria es *Sinorhizobium meliloti* CECT 8035.
12. Una célula según la reivindicación 9, donde la bacteria es *Pseudomonas syringae* CECT 8036.
- 35 13. Una construcción genética para inducir un aumento en la producción de celulosa bacteriana en una célula que contiene genes para la síntesis y exportación de celulosa bacteriana, caracterizada porque comprende un gen *pleD\** dispuesto bajo control transcripcional de un promotor.
- 40 14. Uso de una célula transformada según una de las reivindicaciones 1 a 12, o de la construcción genética de la reivindicación 13, para producir celulosa bacteriana.
- 45 15. Método para producir celulosa bacteriana, caracterizado porque comprende:
  - i. cultivar una célula productora de celulosa bacteriana definida en una de las reivindicaciones 1 a 12, en condiciones propicias para la biosíntesis y exportación extracelular de celulosa
  - ii. procesar la biomasa producida en el cultivo anterior que comprende separar la celulosa bacteriana del contenido celular.
- 50 16. Método según la reivindicación 15, donde la célula se selecciona entre *Sinorhizobium meliloti* CECT 8035, *Pseudomonas syringae* CECT 8036, o una combinación de las mismas.
17. Celulosa bacteriana obtenible por un método definido en una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16.

FIGURAS

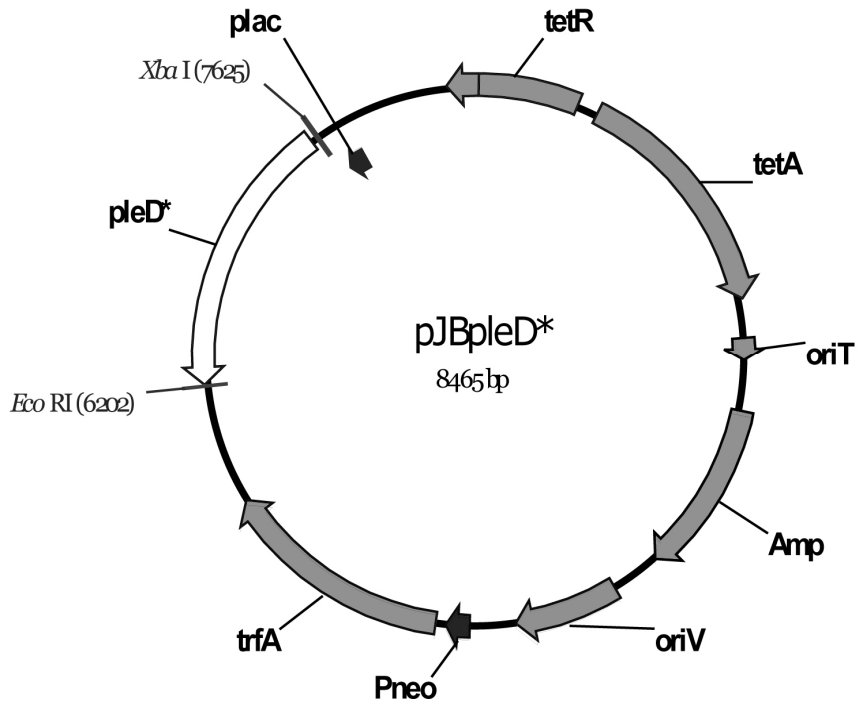


Figura 1

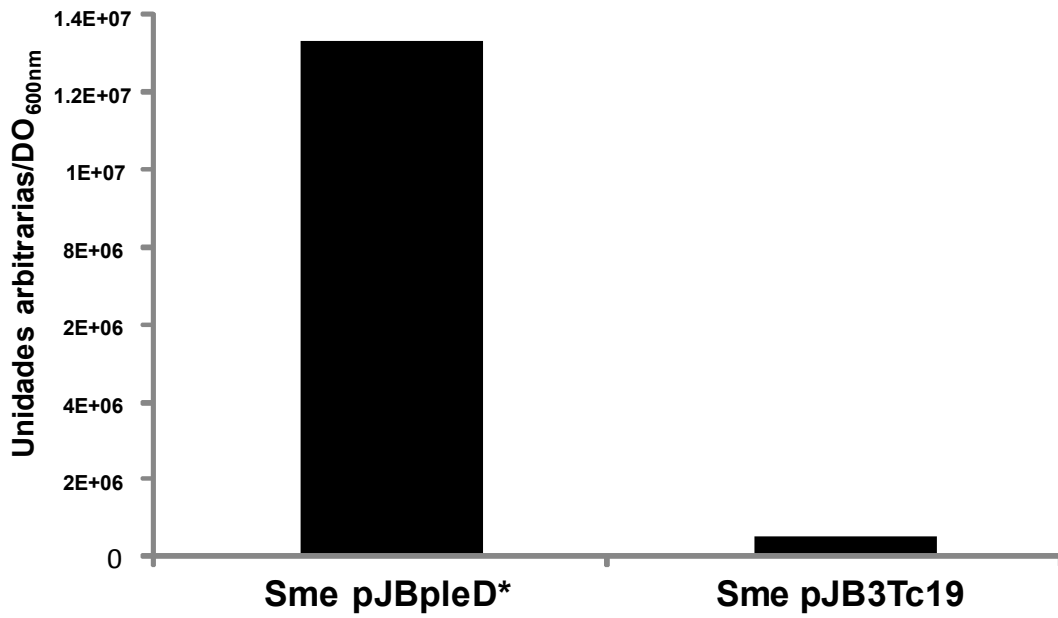


Figura 2

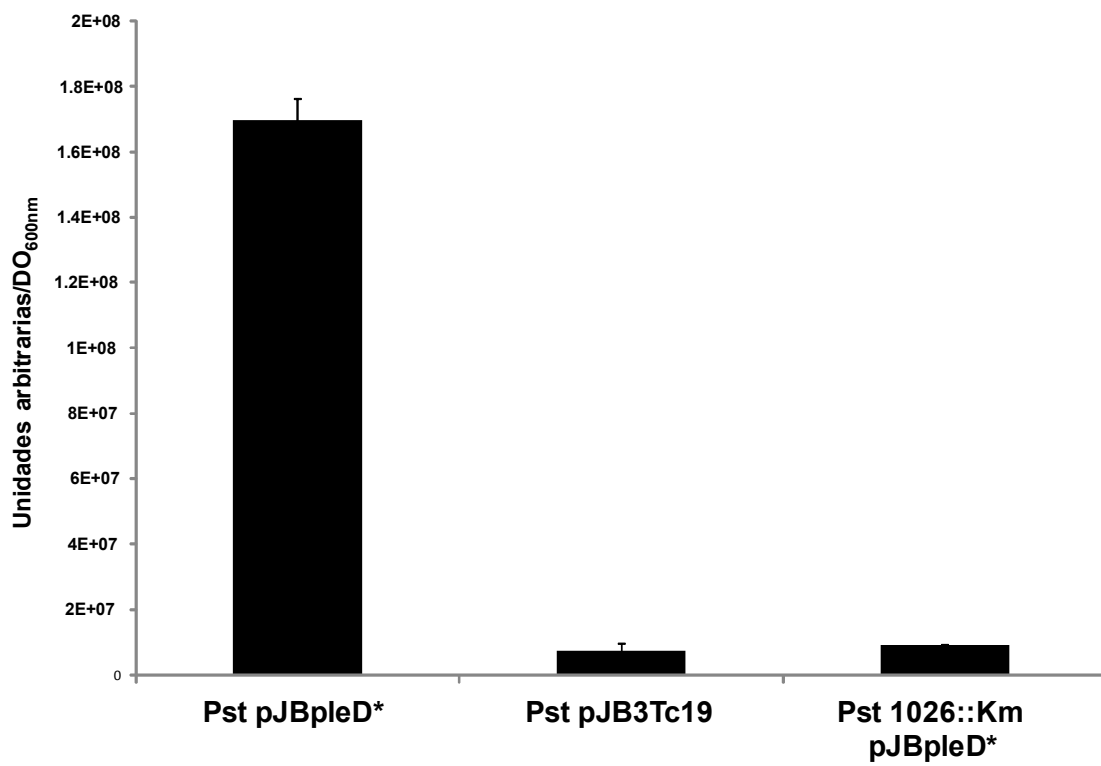


Figura 3

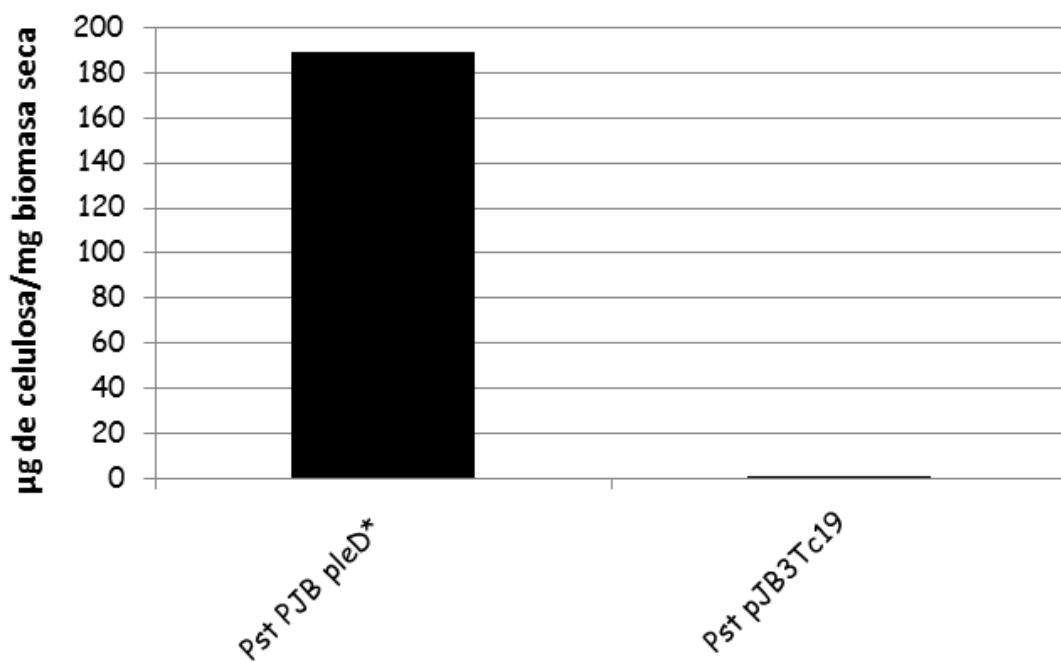


Figura 4

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> Hiperproducción de celulosa bacteriana

<160> 4

<170> BISSAP 1.0

<210> 1

<211> 1362

<212> DNA

<213> *Caulobacter crescentus*

<220>

<221> source

<222> 1..1362

<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Secuencia del gen pleB\*"  
/organism="Caulobacter crescentus"

<400> 1

```

atgagcggccc ggatcctcgt cgtcgacgac atcgaggcca atgtccgcct gcttgaggcc      60
aagctgacgg ccgagtacta tgaggctctcc accgccatgg acgggccgac ggccctggct      120
atggccgcgc gcgatctgcc cgacatcatt ctgctggacg tcatgatgcc cggcatggac      180
ggcttcaccg tctgccgtaa gctgaaggac gatccgacta cccgccacat cccggtgggtg      240
ctgatcaccg cgctcgacgg gctgaggcgc cgcattccagg gcctggaatc gggcgcttcg      300
gacttcctga ccaagccgat cgacgacgtc atgctgttcg cccgcgtgcg cagcctgacc      360
cgcttcaagc tggatgatcga cgaactgcgt cagcgcgagg cctcgggccg ccgcatgggc      420
gtgatcgccg gcgccgccgc ggcctgggac ggtctggggc gtcgggtgct gatcgtcgac      480
gacaacgaac gccaggctca acgcgtcgcc gccgagctgg gcgtcgaaca ccgcccggtg      540
atcgagagcg accctgagaa ggccaagatc agcgcggcg gtccggtcga cctgggtcatc      600
gtcaacgctg cggccaagaa cttcgatggc ctgctgttca ccgccgcgt gcggtccgag      660
gaacgcaccc gccagttgcc cgtgctggcc atggtcgatc ccgatgatc tggccgcatg      720
gtcaaggcgc tggagatcgg cgtgaacgac atcctgtcgc gcccgatcga tccgcaggaa      780
ctgtccgcgc gcgtcaagac gcagatccag cgcaagcgt aactgacta tctgcgcaac      840
aatctggatc actcgctgga gctggccgct accgaccagc tgaccggcct gcacaatcgc      900
cgctacatga ccggtcagct cgactcgctg gtcaagcgcg cgacactggg cggcgatccg      960
gtttcggccc tgctgatcga catcgatttc ttcaagaaaa tcaacgacac cttcggtcac     1020
gatatcggcg acgaggtgct gcgcgagttc gccttgctc tggcctcgaa cgtccgcgcc     1080
attgatctgc cttgccgcta tggcggggaa gagttcgtgg tgatcatgcc cgacaccgcc     1140
ctggctgacg ccctgcgcat cgccgagcgg atccgatgc atgtctccgg ctcgcccttc     1200
acggtcggcc atggccgcga aatgctgaac gtcaccatct cgatcggcgt ctcggccacg     1260
gcgggcgagg gcgacacgcc cgaagccctg ctcaagcgcg ccgacgaagg cgtttatcag     1320
gcccaaggcct cgggtcggaa cgcggtggtc ggcaaggccg cc                          1362

```

<210> 2

<211> 123  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<221> source  
<222> 1..123  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Secuencia del promotor Plac"  
/organism="Escherichia coli"

<400> 2  
gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca cccagggctt tacactttat 60  
gcttccggct cgatatgtgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 120  
cta 123

<210> 3  
<211> 7069  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<221> source  
<222> 1..7069  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Secuencia del vector pJB3Tc19"  
/organism="Escherichia coli"

<400> 3  
cgagagcgga gcctgttcaa cggtgccgcc gcgctcgccg gactcgctgt cgccggcctg 60  
ctcctcaagc acggcccca cagtgaagta gctgattgtc atcagcgc atgacggcgtc 120  
cccggccgaa aaacccgcct cgagaggaa gcgaagctgc gcgtcggccg tttccatctg 180  
cgggtgcgcc ggtcgcgtgc cggcatggat gcgcgcgcca tcgcggtagg cgagcagcgc 240  
ctgcctgaag ctgcgggcat tcccagtcag aatgagcgc cagtcgtcgt cggctctcgg 300  
caccgaagtg ctatgattct ccgccagcat ggcttcggcc agtgcgtcga gcagcgcgccg 360  
cttgttcctg aagtgccagt aaagcgcggg ctgctgaacc cccaaccggt cgcgccagttt 420  
gcgtgtcgtc agaccgtcta cgccgacctc gttcaacagg tctagggcgg cacggatcac 480  
tgtattcggc tgcaactttg tcatgcttga cactttatca ctgataaaca taatatgtcc 540  
accaacttat cagtgataaa gaatccgcgc gttcaatcgg accagcggag gctgggtccgg 600  
aggccagacg tgaaaccca catacccctg atcgtaattc tgagcactgt cgcgctcgac 660  
gctgtcggca tcggcctgat tatgccggtg ctgccgggcc tctgctcga tctggttcac 720  
tcgaacgacg tcaccgcca ctatggcatt ctgctggcgc tgtatgcggt ggtgcaattt 780  
gcctgcgcac ctgtgctggg cgcgctgtcg gatcgtttcg ggcggcggcc aatcttgctc 840  
gtctcgtcgg ccggcgcacc tgtcgcactac gccatcatgg cgacagcgc tttcctttgg 900  
gttctctata tcgggcggat cgtggccggc atcaccgggg cgactggggc ggtagccggc 960  
gcttatattg ccgatatcac tgatggcgtg gagcgcgcgc ggcacttcgg cttcatgagc 1020  
gcctgttttcg gggtcgggat ggtcgcggga cctgtgctcg gtgggctgat gggcggtttc 1080  
tccccccacg ctccgttctt cgccgcggca gccttgaacg gcctcaattt cctgacgggc 1140  
tgtttccttt tgccggagtc gcacaaaggc gaacgcgggc cgttacgccg ggaggctctc 1200

aacccgctca	gcttcgttcg	gtgggcccgg	ggcatgaccg	tcgtcgccgc	cctgatggcg	1260
gtctttcttca	tcatgcaact	tgtcggacag	gtgccggccg	cgctttgggt	cattttcggc	1320
gaggatcgct	ttcactggga	cgcgaccacg	atcggcattt	cgcttgccgc	atttggcatt	1380
ctgcattcac	tcgcccaggc	aatgatcacc	ggccctgtag	ccgcccggct	cggcgaaagg	1440
cgggcactca	tgctcggaat	gattgccgac	ggcacaggct	acatcctgct	tgccctcgcg	1500
acacggggat	ggatggcggt	cccgatcatg	gtcctgcttg	cttcgggtgg	catcggaatg	1560
ccggcgctgc	aagcaatggt	gtccaggcag	gtggatgagg	aacgccaggg	gcagctgcaa	1620
ggctcactgg	cggcgctcac	cagcctgacc	tcgatcgtcg	gaccctcct	cttcacggcg	1680
atctatgcgg	cttctataac	aacgtggaac	gggtgggcat	ggattgcagg	cgctgcctc	1740
tacttgctct	gcctgccggc	gctgcgtcgc	gggctttgga	gcggcgcagg	gcaacgagcc	1800
gatcgtgat	cgtggaaacg	atagggacgg	atctgctggc	gaaaggggga	tgtgctgcaa	1860
ggcgattaag	ttgggtaacg	ccagggtttt	cccagtcacg	acgttgtaaa	acgacggcca	1920
gtgaattaat	tcttgaagac	gaaagggcct	cgtgatacgc	ctatTTTTat	aggTTaatgt	1980
catgataata	atggtttctt	agagcttacg	gccagcctcg	cagagcagga	ttcccgttga	2040
gcaccgccag	gtgCGaataa	gggacagtga	agaaggaaca	cccgctcgcg	ggtgggccta	2100
cttcacctat	cctgcccggc	tgacgccggt	ggatacacca	aggaaagtct	acacgaacc	2160
tttgcaaaa	tcctgtatat	cgtgcgaaaa	aggatggata	taccgaaaa	atcgctataa	2220
tgaccccgaa	gcagggttat	gcagcggaaa	agatccgtcg	atcgaccag	gtggcacttt	2280
tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	2340
tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaa	ggaagagtat	2400
gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	2460
ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	2520
agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	2580
agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcgg	tattatcccg	2640
tgttgacgcc	gggcaagagc	aactcggctc	ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggt	2700
tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	2760
cagtgtgcc	ataaccatga	gtgataaac	tgcggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	2820
aggaccgaag	gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccttga	2880
tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	2940
tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	3000
ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	3060
ggcccttccg	gctggctggt	ttattgctga	taaatctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	3120
cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	3180
gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	3240
actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	3300

aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	3360
caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	3420
aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	ggggatcagg	accgctgccg	gagcgaacc	3480
cactcactac	agcagagcca	tgtagggccg	ccggcgttgt	ggataccacg	cggaaaactt	3540
ggccctcact	gacagatgag	gggcggacgt	tgacacttga	ggggccgact	cacccggcgc	3600
ggcgttgaca	gatgaggggc	aggctcgatt	tcggccggcg	acgtggagct	ggccagcctc	3660
gcaaactcggc	gaaaacgcct	gattttacgc	gagtttccca	cagatgatgt	ggacaagcct	3720
ggggataagt	gccctgcggt	attgacactt	gaggggcgcg	actactgaca	gatgaggggc	3780
gcgatccttg	acacttgagg	ggcagagtga	tgacagatga	ggggcgcacc	tattgacatt	3840
tgaggggctg	tccacaggca	gaaaatccag	catttgcaag	ggtttccgcc	cgtttttcgg	3900
ccaccgctaa	cctgtctttt	aacctgcttt	taaaccaata	tttataaacc	ttgtttttaa	3960
ccagggctgc	gccctggcgc	gtgaccgcgc	acgccgaagg	ggggtgcccc	cccttctcga	4020
accctcccgg	cccgctaacg	cggcaccca	tccccagag	ggctgcgccc	ctcggccgcg	4080
aacgacctca	ccccaaaaat	ggcagccacg	tagaaagcca	gtccgcagaa	acggtgctga	4140
ccccggatga	atgtcagcta	ctgggctatc	tggacaaggg	aaaacgcaag	cgcaaagaga	4200
aagcaggtag	cttgcagtgg	gcttacatgg	cgatagctag	actgggcggt	tttatggaca	4260
gcaagcgaac	cggaattgcc	agctggggcg	ccctctggta	aggttgggaa	gccctgcaaa	4320
gtaaactgga	tggctttctt	gccgccaagg	atctgatggc	gcaggggatc	aagatcgacg	4380
gatcgatccg	gggaattaat	tccggggcaa	tcccgcaagg	agggtgaatg	aatcggacgt	4440
ttgaccgga	ggcatacagg	caagaactga	tcgacgcggg	gttttccgcc	gaggatgccg	4500
aaaccatcgc	aagccgcacc	gtcatgcgtg	cgccccgcga	aaccttcag	tccgtcggct	4560
cgatggtcca	gcaagctacg	gccaagatcg	agcgcgacag	cgtgcaactg	gctccccctg	4620
ccctgccccg	gccatcggcc	gccgtggagc	gttcgcgtcg	tctcgaacag	gaggcggcag	4680
gtttggcgaa	gtcgatgacc	atcgacacgc	gaggaactat	gacgaccaag	aagcgaaaaa	4740
ccgccggcga	ggacctggca	aaacaggtca	gcgaggccaa	gcaggccgcg	ttgtgaaac	4800
acacgaagca	gcagatcaag	gaaatgcagc	tttccttgtt	cgatattgcg	ccgtggccgg	4860
acacgatcgc	agcgatgcca	aacgacacgg	cccgtctcgc	cctgttcacc	acgcgcaaca	4920
agaaaatccc	gcgcgaggcg	ctgcaaaaaca	aggatcattt	ccacgtcaac	aaggacgtga	4980
agatcaccta	caccggcgtc	gagctgcggg	ccgacgatga	cgaactggtg	tggcagcagg	5040
tgttgagta	cgcgaagcgc	accctatcgc	gcgagccgat	caccttcacg	ttctacgagc	5100
tttgccagga	cctgggctgg	tcgatcaatg	gccggtatta	cacgaaggcc	gaggaatgcc	5160
tgtcgcgcct	acaggcgacg	gcgatgggct	tcacgtccga	ccgcgttggg	cacctggaat	5220
cgggtcgcct	gctgcaccgc	ttccgcgtcc	tggaccgtgg	caagaaaacg	tcccgttgcc	5280
aggctctgat	cgacgaggaa	atcgtcgtgc	tgtttgctgg	cgaccactac	acgaaattca	5340
tatgggagaa	gtaccgcaag	ctgtcgcgca	cggcccgcag	gatgttcgac	tatttcagct	5400
cgcaccggga	gccgtacccg	ctcaagctgg	aaaccttccg	cctcatgtgc	ggatcggatt	5460

ccacccgcgt gaagaagtgg cgcgagcagg tcggcgaagc ctgcgaagag ttgcgaggca 5520  
gcggcctggt ggaacacgcc tgggtcaatg atgacctggt gcattgcaa cgctagggcc 5580  
ttgtggggtc agttccggct gggggttcag cacctgcatg attattgaag catttatcag 5640  
ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 5700  
gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg 5760  
acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtctcgcgcg tttcgggtgat 5820  
gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg 5880  
gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc 5940  
tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcacatat atgcgggtgtg 6000  
aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgccattcg ccattcaggc 6060  
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtg gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 6120  
aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 6180  
gttgtaaaac gacggccagt gaattcgagc tcggtacccg gggatcctct agagtcgacc 6240  
tgcaggcatg caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat 6300  
ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc 6360  
taatgagtga gctaaactac attaattgcy ttgcyctcac tgcccgttt ccagtcggga 6420  
aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt 6480  
attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggctgt tcggctgcgg 6540  
cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 6600  
gcaggaaaga acatgcagat ccgtcgatct atctcatctg cgcaaggcag aacgtgaaga 6660  
cggccgccct ggacctcgcc cgcgagcgc agcgcacgag gccggcgcgc ggacctgccg 6720  
cggcccacga gcggagcgc cagcaggagc gccagaaggc cgccagagag gccgagcgcg 6780  
gcgtgaggct tggacgctag ggcagggcat gaaaagccc gtagcgggcy ctacggggct 6840  
ctgacgcggt ggaaagggg aggggatgtt gtctacatgg ctctgctgta gtgagtgggt 6900  
tgcgctccgg cagcggctct gatcaatcgt caccctttct cggctctca acgttcctga 6960  
caacgagcct ctttttcgcc aatccatcga caatcaccgc gagtccctgc tcgaacgctg 7020  
cgtccggacc ggcttcgctc aaggcgtcta tcgcgggccc caacagcgg 7069

<210> 4  
<211> 8465  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli  
<220>  
<221> source  
<222> 1..8465  
<223> /mol\_type="DNA"  
          /note="Secuencia completa del plasmido pJBp1eD\*"  
          /organism="Escherichia coli"

<400> 4  
cgagagcggg gcctgttcaa cgggtgccgc gcgctcgcg gactcgctgt cgccggcctg 60



ctcctcaagc	acggcccca	cagtgaagta	gctgattgtc	atcagcgcat	tgacggcgtc	120
cccggccgaa	aaacccgcct	cgagaggaa	gcgaagctgc	gcgtcggccg	tttccatctg	180
cgggtgcgcc	ggtcgcgtgc	cggcatggat	gcgcgcgcca	tcgcggtagg	cgagcagcgc	240
ctgcctgaag	ctgcgggcat	tcccagtcag	aatgagcgc	cagtcgtcgt	cggctctcgg	300
caccgaagtg	ctatgattct	ccgccagcat	ggcttcggcc	agtgcgtcga	gcagcggccc	360
cttgttcctg	aagtgccagt	aaagcgccgg	ctgctgaacc	cccaaccggt	ccgccagttt	420
gcgtgtcgtc	agaccgtcta	cgccgacctc	gttcaacagg	tctagggcgg	cacggatcac	480
tgtattcggc	tgcaactttg	tcatgcttga	cactttatca	ctgataaaca	taatatgtcc	540
accaacttat	cagtgataaa	gaatccgcgc	gttcaatcgg	accagcggag	gctgggtccgg	600
aggccagacg	tgaaaccca	catacccctg	atcgtaattc	tgagcactgt	cgcgctcgac	660
gctgtcggca	tcggcctgat	tatgccgggt	ctgccggggc	tcctgcgcga	tctggttcac	720
tcgaacgacg	tcaccgcca	ctatggcatt	ctgctggcgc	tgtatgcggt	ggtgcaattt	780
gcctgcgcac	ctgtgctggg	cgcgctgtcg	gatcgtttcg	ggcggcggcc	aatcttgctc	840
gtctcgctgg	ccggcgccac	tgtcgactac	gccatcatgg	cgacagcgcc	tttcctttgg	900
gttctctata	tcgggcggat	cgtggccggc	atcaccgggg	cgactggggc	ggtagccggc	960
gcttatattg	ccgatatcac	tgatggcgat	gagcgcgcgc	ggcacttcgg	cttcatgagc	1020
gcctgtttcg	ggttcgggat	ggtcgcggga	cctgtgctcg	gtgggctgat	gggcggtttc	1080
tccccccacg	ctccgttctt	cgccgcggca	gccttgaacg	gcctcaattt	cctgacgggc	1140
tgtttccttt	tgccggagtc	gcacaaaggc	gaacgccggc	cgttacgccg	ggaggctctc	1200
aacccgctca	gcttcgttcg	gtgggcccgg	ggcatgaccg	tcgtcgccgc	cctgatggcg	1260
gtctttctca	tcatgcaact	tgtcggacag	gtgccggccg	cgctttgggt	cattttcggc	1320
gaggatcgct	ttcactggga	cgcgaccacg	atcggcattt	cgcttgccgc	atltggcatt	1380
ctgcattcac	tcgcccaggc	aatgatcacc	ggccctgtag	ccgcccggct	cggcgaaagg	1440
cgggactca	tgctcggaat	gattgccgac	ggcacaggct	acatcctgct	tgccctcgcg	1500
acacggggat	ggatggcggt	cccgatcatg	gtcctgcttg	cttcgggtgg	catcggaatg	1560
ccggcgctgc	aagcaatggt	gtccaggcag	gtggatgagg	aacgccaggg	gcagctgcaa	1620
ggctcactgg	cggcgctcac	cagcctgacc	tcgatcgtcg	gaccctcct	cttcacggcg	1680
atctatgcgg	cttctataac	aacgtggaac	gggtgggcat	ggattgcagg	cgctgccctc	1740
tacttgctct	gcctgccggc	gctgcgtcgc	gggctttgga	gcggcgcagg	gcaacgagcc	1800
gatcgctgat	cgtggaaacg	atagggacgg	atctgctggc	gaaaggggga	tgtgctgcaa	1860
ggcgattaag	ttgggtaacg	ccagggtttt	cccagtcacg	acgttgtaaa	acgacggcca	1920
gtgaattaat	tcttgaagac	gaaagggcct	cgtgatacgc	ctatttttat	aggttaatgt	1980
catgataata	atggtttctt	agagcttacg	gccagcctcg	cagagcagga	ttcccgttga	2040
gcaccgccag	gtgcgaataa	gggacagtga	agaaggaaca	cccgctcgcg	ggtgggccta	2100
cttcacctat	cctgcccggc	tgacgccggt	ggatacacca	aggaaagtct	acacgaacc	2160
tttgcaaaa	tcctgtatat	cgtgcgaaaa	aggatggata	taccgaaaaa	atcgctataa	2220

tgaccccgaa	gcagggttat	gcagcggaaa	agatccgtcg	atcgaccag	gtggcacttt	2280
tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	2340
tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaa	ggaagagtat	2400
gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	2460
ttttgctcac	ccagaaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	2520
agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	2580
agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcgg	tattatcccg	2640
tgttgacgcc	gggcaagagc	aactcggctc	ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggg	2700
tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	2760
cagtgctgcc	ataacatga	gtgataacac	tgcggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	2820
aggaccgaag	gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccttga	2880
tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	2940
tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	3000
ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	3060
ggcccttccg	gctggctggg	ttattgctga	taaatctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	3120
cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	3180
gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	3240
actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	3300
aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	3360
caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	3420
aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcy	ggggatcagg	accgctgccg	gagcgcgaacc	3480
cactcactac	agcagagcca	tgtagggccg	ccggcgttgt	ggataccacg	cggaaaactt	3540
ggccctcact	gacagatgag	gggcggacgt	tgacacttga	ggggccgact	cacccggcgc	3600
ggcgttgaca	gatgaggggc	aggctcgatt	tcggccggcg	acgtggagct	ggccagcctc	3660
gcaaactcggc	gaaaacgcct	gattttacgc	gagtttcca	cagatgatgt	ggacaagcct	3720
ggggataagt	gccctgcggt	attgacactt	gaggggcgcg	actactgaca	gatgaggggc	3780
gcgatccttg	acacttgagg	ggcagagtga	tgacagatga	ggggcgcacc	tattgacatt	3840
tgaggggctg	tccacaggca	gaaaatccag	catttgcaag	ggtttccgcc	cgtttttcgg	3900
ccaccgctaa	cctgtctttt	aacctgcttt	taaaccaata	ttataaacc	ttgtttttaa	3960
ccagggctgc	gccctggcgc	gtgaccgcgc	acgccgaagg	ggggtgcccc	cccttctcga	4020
accctcccgg	cccgctaacg	cggcacccca	tccccccagg	ggctgcgccc	ctcggccgcg	4080
aacgacctca	ccccaaaaat	ggcagccacg	tagaaagcca	gtccgcagaa	acggtgctga	4140
ccccgatga	atgtcagcta	ctgggctatc	tggacaaggg	aaaacgcaag	cgcaaagaga	4200
aagcaggtag	cttgacagtgg	gcttacatgg	cgatagctag	actgggcggg	tttatggaca	4260
gcaagcgaac	cggaattgcc	agctggggcg	ccctctggta	aggttgggaa	gccctgcaaa	4320

gtaaactgga	tggctttctt	gccgccaagg	atctgatggc	gcaggggatc	aagatcgacg	4380
gatcgatccg	gggaattaat	tccggggcaa	tcccgaagg	agggtgaatg	aatcggacgt	4440
ttgaccgga	ggcatacagg	caagaactga	tcgacgcggg	gttttccgcc	gaggatgccg	4500
aaaccatcgc	aagccgcacc	gtcatgcgtg	cgccccgcga	aaccttcag	tccgtcggct	4560
cgatggtcca	gcaagctacg	gccaagatcg	agcgcgacag	cgtagcaactg	gctccccctg	4620
ccctgcccgc	gccatcggcc	gccgtggagc	gttcgcgtcg	tctcgaacag	gaggcggcag	4680
gtttggcgaa	gtcgatgacc	atcgacacgc	gaggaactat	gacgaccaag	aagcgaaaaa	4740
ccgccggcga	ggacctggca	aaacagggtca	gcgaggccaa	gcaggccgcg	ttgctgaaac	4800
acacgaagca	gcagatcaag	gaaatgcagc	tttccttggt	cgatattgcg	ccgtggccgg	4860
acacgatcgc	agcgatgcca	aacgacacgg	cccgtctgc	cctgttcacc	acgcgcaaca	4920
agaaaatccc	gcgcgaggcg	ctgcaaaaaca	aggctatttt	ccacgtcaac	aaggacgtga	4980
agatcaccta	caccggcgtc	gagctgcggg	ccgacgatga	cgaactggtg	tggcagcagg	5040
tgttgagta	cgcgaagcgc	accctatcgc	gcgagccgat	caccttcacg	ttctacgagc	5100
tttgccagga	cctgggctgg	tcgatcaatg	gccggtatta	cacgaaggcc	gaggaatgcc	5160
tgtcgcgcct	acaggcgacg	gcgatgggct	tcacgtccga	ccgcgttggg	cacctggaat	5220
cggtgtcgcct	gctgcaccgc	ttccgcgtcc	tggaccgtgg	caagaaaacg	tcccgttgcc	5280
aggctctgat	cgacgaggaa	atcgtcgtgc	tgtttgctgg	cgaccactac	acgaaattca	5340
tatgggagaa	gtaccgcaag	ctgtcgccga	cggccccgacg	gatgttcgac	tatttcagct	5400
cgcaccggga	gccgtacccg	ctcaagctgg	aaaccttcg	cctcatgtgc	ggatcggatt	5460
ccaccgcgct	gaagaagtgg	cgcgagcagg	tcggcgaagc	ctgcgaagag	ttgcgaggca	5520
gcggcctggt	ggaacacgcc	tgggtcaatg	atgacctggt	gcattgcaaa	cgctagggcc	5580
ttgtggggtc	agttccggct	gggggttcag	cacctgcatg	attattgaag	catttatcag	5640
ggttattgtc	tcatgagcgg	atacatattt	gaatgtattt	agaaaaataa	acaaataggg	5700
gttccgcgca	catttccccg	aaaagtgcc	cctgacgtct	aagaaacat	tattatcatg	5760
acattaacct	ataaaaaatag	gcgtatcacg	aggccctttc	gtctcgcgcg	tttcggtgat	5820
gacggtgaaa	acctctgaca	catgcagctc	ccggagacgg	tcacagcttg	tctgtaagcg	5880
gatgccggga	gcagacaagc	ccgtcagggc	gcgtcagcgg	gtggtggcgg	gtgtcggggc	5940
tggcttaact	atgcggcatc	agagcagatt	gtactgagag	tgcacatat	atgcggtgtg	6000
aaataccgca	cagatgcgta	aggagaaaat	accgcatcag	gcgccattcg	ccattcaggc	6060
tgcgcaactg	ttgggaaggg	cgatcgggtg	gggcctcttc	gctattacgc	cagctggcga	6120
aagggggatg	tgctgcaagg	cgattaagtt	gggtaacgcc	agggttttcc	cagtcacgac	6180
gttgtaaaac	gacggccagt	gaattcagtg	atggtgatgg	tgatgggagg	ccttgccgac	6240
caccgcgttc	cgaccggagg	ccttggcctg	ataaacgcct	tcgtcggcgc	gcttgagcag	6300
ggcttcgggc	gtgtcggcct	cgcccgcctg	ggccgagacg	ccgatcgaga	tggtgacggt	6360
cagcatttcg	cggccatggg	cgaccgtgaa	gggcgagccg	gagacatgca	tccggatccg	6420
ctcggcgtg	cgcagggcgt	cagccagggc	ggtgtcgggc	atgatcacca	cgaactcttc	6480

cccgccatag	cggcaaggca	gatcaatggc	gcgacggttc	gaggccagac	gcaaggcgaa	6540
ctcgcgcagc	acctcgtcgc	cgatatcgtg	accgaaggtg	tcgttgattt	tcttgaagaa	6600
atcgatgtcg	atcagcaggg	ccgaaaccgg	atcgccgcc	agtgtcgcgc	gcttgaccag	6660
cgagtcgagc	tgaccggtca	tgtagcggcg	attgtgcagg	ccggtcagct	ggtcggtgac	6720
ggccagctcc	agcgagtgat	ccagattggt	gcgagatag	tcagtgtagc	gcttgcgctg	6780
gatctgcgtc	ttgacgcgcg	cggacagttc	ctgcggatcg	atcgggcgcg	acaggatgtc	6840
gttcacgccg	atctccagcg	ccttgaccat	gcgccacga	tcacgggat	cgaccatggc	6900
cagcacgggc	aactggcggg	tgcgttcctc	ggaccgcagc	gcggcggtga	agcgcaggcc	6960
atcgaagttc	ttggccgcag	cgttgacgat	gaccaggtcg	accggaccgc	cggcgtgat	7020
cttggccttc	tcagggtcgc	tctcgatcac	cgggcggtgt	tcgacgccca	gctcggcggc	7080
gacgcgttga	gcctggcgtt	cgttgtcgtc	gacgatcagc	acccgaccgc	ccagaccgtc	7140
caggcgcgcg	gcggcggccg	cgatcacgcc	catgcggcgg	cccgaggcct	cgcgctgacg	7200
cagttcgtcg	atcaccagct	tgaagcgggt	caggctgcgc	acgcgggcca	acagcatgac	7260
gtcgtcgatc	ggcttggtca	ggaagtccga	agcgcgggat	tccaggccct	ggatgcggtc	7320
gccacgcccg	tcgagcgcgg	tgatcagcac	caccgggatg	tggcgggtag	tcggatcgtc	7380
cttcagctta	cggcagacgg	tgaagccgtc	catgccgggc	atcatgacgt	ccagcagaat	7440
gatgtcgggc	agatcgcgcg	cggccatagc	cagggccgtc	ggcccgtcca	tggcggtgga	7500
gacctcatag	tactcggccg	tcagcttggc	ctcaagcagg	cggacattgg	cctcgtatgtc	7560
gtcgcgcagc	aggatccggg	cgctcatatg	tatatctcct	tcttaaagtt	aaacaaaatt	7620
atcttagag	tcgacctgca	ggcatgcaag	cttggcgtaa	tcatggtcat	agctgtttcc	7680
tgtgtgaaat	tgttatccgc	tcacaattcc	acacaacata	cgagccggaa	gcataaagtg	7740
taaagcctgg	gggtgcctaat	gagtgagcta	actcacatta	attgcgttgc	gctcactgcc	7800
cgctttccag	tcgggaaacc	tgctcgtgcca	gctgcattaa	tgaatcggcc	aacgcgcggg	7860
gagaggcggg	ttgcgtattg	ggcgtcttc	cgcttcctcg	ctcactgact	cgctgcgctc	7920
ggtcgttcgg	ctgcggcgag	cggtatcagc	tactcaaag	gcggtataac	ggttatccac	7980
agaatcaggg	gataacgcag	gaaagaacat	gcagatccgt	cgatctatct	catctgcgca	8040
aggcagaacg	tgaagacggc	cgccctggac	ctcgcccgcg	agcggcagcg	cacgaggccg	8100
gcgcgcggac	ccgccgcggc	ccacgagcgg	acgccgcagc	aggagcgcca	gaaggccgcc	8160
agagaggccg	agcgcggcgt	gaggcttggg	cgctagggca	gggcatgaaa	aagcccgtag	8220
cgggcgctac	ggggctctga	cgcggtggaa	agggggaggg	gatgttgtct	acatggctct	8280
gctgtagtga	gtgggttgcg	ctccggcagc	ggtcctgatc	aatcgtcacc	ctttctcggt	8340
ccttcaacgt	tcctgacaac	gagcctcctt	ttcgccaatc	catcgacaat	caccgcgagt	8400
ccctgctcga	acgctgcgtc	cggaccggct	tcgtcgaagg	cgctctatcg	ggcccgcaac	8460
agcgg						8465

**DECLARACIÓN SOBRE EL CONTENIDO DEL SOPORTE ELECTRÓNICO Y EL  
DOCUMENTO IMPRESO CON LAS SECUENCIAS**

**Ref: Nueva solicitud de patente en España**

**Enunciado: HIPERPRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA.**

**Titular: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)**

**N/Ref: 5110193/MAD**

---

El abajo firmante, Agente de la Propiedad Industrial, D. Javier UNGRÍA, como representante autorizado del solicitante en relación con la solicitud mencionada, declara que la información sobre la secuencia contenida en el soporte electrónico es idéntica a la secuencia que consta en el documento impreso que se aporta.

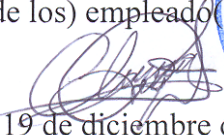
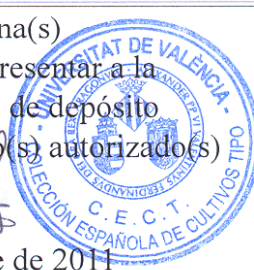
Madrid, 31 de mayo de 2012.

Javier UNGRIA



TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL  
DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL  
PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

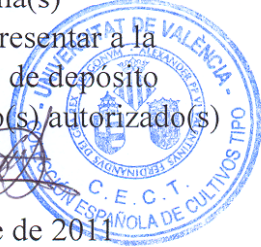
DESTINATARIO Juan Sanjuan Pinilla Dpto. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos Estación Experimental del Zaidín, CSIC C/ Prof. Albareda 1 18008 Granada  <p style="text-align: center;">NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE</p>	RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO INICIAL expedido en virtud de la Regla 7.1 por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada en la parte inferior de esta página
<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación asignada por el DEPOSITANTE: Plásmido pJBPléD*	Número de orden atribuido por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:  CECT 8034
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado en I venía acompañado: <input checked="" type="checkbox"/> de una descripción científica  <input checked="" type="checkbox"/> de una designación taxonómica propuesta (Márquese lo que corresponda)	
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta autoridad internacional de depósito acepta el microorganismo identificado en I, que ha recibido el 18 de octubre de 2011 (fecha del depósito inicial) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECEPCIÓN DE UNA PETICIÓN DE CONVERSIÓN</b>	
Esta autoridad internacional de depósito ha recibido el microorganismo identificado en I, el (fecha de depósito inicial) y recibió una petición de conversión del depósito inicial en depósito conforme con el Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la petición de conversión)	
<b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>	
Nombre: COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT). Dirección: Edificio 3 CUE. Parc Científic Universitat de Valencia Catedrático Agustín Escardino, 9 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la autoridad internacional de depósito o del (de los) empleado(s) autorizado(s)   Fecha: 19 de diciembre de 2011 Fdo.: José Miguel López Coronado  

<sup>1</sup>En caso de aplicación de la Regla 6.4d), ésta será la fecha en la que haya sido adquirido el estatuto de autoridad internacional de depósito.



TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL  
DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL  
PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DESTINATARIO Juan Sanjuan Pinilla Dpto. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos Estación Experimental del Zaidín, CSIC C/ Prof. Albareda 1 18008 Granada		RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO INICIAL expedido en virtud de la Regla 7.1 por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada en la parte inferior de esta página
NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE		
<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>		
Referencia de identificación asignada por el DEPOSITANTE: SmepJBPlED*	Número de orden atribuido por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:  CECT 8035	
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>		
El microorganismo identificado en I venía acompañado: <input checked="" type="checkbox"/> de una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> de una designación taxonómica propuesta (Márquese lo que corresponda)		
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>		
Esta autoridad internacional de depósito acepta el microorganismo identificado en I, que ha recibido el 18 de octubre de 2011 (fecha del depósito inicial) <sup>1</sup>		
<b>IV. RECEPCIÓN DE UNA PETICIÓN DE CONVERSIÓN</b>		
Esta autoridad internacional de depósito ha recibido el microorganismo identificado en I, el (fecha de depósito inicial) y recibió una petición de conversión del depósito inicial en depósito conforme con el Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la petición de conversión)		
<b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>		
Nombre: COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT). Dirección: Edificio 3 CUE. Parc Científic Universitat de Valencia Catedrático Agustín Escardino, 9 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la autoridad internacional de depósito o del (de los) empleado(s) autorizado(s)  Fecha: 19 de diciembre de 2011 Fdo.: José Miguel López Coronado	

<sup>1</sup>En caso de aplicación de la Regla 6.4d), ésta será la fecha en la que haya sido adquirido el estatuto de autoridad internacional de depósito.