



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:	P201431133	
Fecha de recepción:	28 julio 2014, 14:25 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.952	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	2	
País:	ES	
Título:	MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE POLI-..1,3-..1,4-D-GLUCANO	
Documentos enviados:	Descripcion.pdf (19 p.) Reivindicaciones.pdf (3 p.) Dibujos.pdf (4 p.) Resumen.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (21 p.) SEQLTXT.txt BIORCPT-1.pdf (3 p.) BIORCPT-2.pdf (3 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	28 julio 2014, 14:25 (CEST)	
Codificación del envío:	AA:AE:E4:8B:B0:18:B0:D9:67:21:18:67:40:BE:23:F6:EC:3F:D8:8D	

---

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA.  
Para cualquier aclaración puede contactar con la O.E.P.M.

/Madrid, Oficina Receptora/



(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
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL:  UNIVERSIDAD PÚBLICA  NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME:  DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:  MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:  PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ ]  España ES Q2818002D  C/ Serrano, 117 Madrid 28 Madrid 28006 España ES  CORREO ELECTRÓNICO:  [ ] [ ]  083,33 %
(5-2) SOLICITANTE 2:	DENOMINACION SOCIAL:  UNIVERSIDAD PÚBLICA  NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME:  DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA:	UNIVERSIDAD DE SEVILLA [ ]  España ES Q4118001I  Pabellón de Brasil, Po de las Delicias, s/n Sevilla 41 Sevilla 41013 España

	CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCIÓN LABORAL: <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO: <input type="checkbox"/> SUCESIÓN: <input type="checkbox"/> PORCENTAJE DE TITULARIDAD: 016,67 %
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: PÉREZ MENDOZA NOMBRE: DANIEL NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: ROMERO JIMÉNEZ NOMBRE: LORENA NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: RODRÍGUEZ CARBONELL NOMBRE: DAVID NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(6-4) INVENTOR 4:	APELLIDOS: GALLEGOS FERNÁNDEZ NOMBRE: Mª TRINIDAD NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(6-5) INVENTOR 5:	APELLIDOS: SANJUÁN PINILLA NOMBRE: JUAN NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(6-6) INVENTOR 6:	APELLIDOS: RODRÍGUEZ CARVAJAL NOMBRE: MIGUEL ÁNGEL NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(7) TÍTULO DE LA INVENCION:	MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE POLI-..1,3-..1,4-D-GLUCANO
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERÍA BIOLÓGICA:	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
(11-1) DEPÓSITO 1:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: pJBPléD*9091 INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)

<p style="text-align: center;">NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B): (11-2) DEPÓSITO 2:</p> <p style="text-align: center;">REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO:</p> <p style="text-align: center;">NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):</p>	<p>Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia), Spain cect 8651 <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>SmepJBPlE*9091 Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia), Spain cect 8652 <input checked="" type="checkbox"/></p>
<p>(12) 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</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/></p>
<p>(13) EXPOSICIONES OFICIALES:  LUGAR: FECHA:</p>	
<p>(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:  PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:</p>	
<p>(15) AGENTE DE PROPIEDAD INDUSTRIAL:  APELLIDOS: NOMBRE: CÓDIGO DE AGENTE:  NÚMERO DE PODER:</p>	<p>PONS ARIÑO ÁNGEL 0499/5  20081765</p>
<p>(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:  DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES:  DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): JUSTIFICANTE DEL DEPÓSITO BIOLÓGICO (1): JUSTIFICANTE DEL DEPÓSITO BIOLÓGICO (2): LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BÚSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 19 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 27 <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: 3 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 3 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 21 <input checked="" type="checkbox"/></p>
<p>(17) 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:</p>	<p><input type="checkbox"/></p> <p><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:</p>
<p>(18) NOTAS:</p>	
<p>(19) FIRMA:</p>	

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:

ENTIDAD PONS PATENTES  
Y MARCAS  
INTERNACIONAL SL - CIF  
B84921709 - NOMBRE PONS  
ARIÑO ANGEL - NIF  
50534279J

LUGAR DE FIRMA:

MADRID

FECHA DE FIRMA:

28 Julio 2014



<b>OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS</b>		
<b>Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad</b>		
<b>1. REFERENCIA DE SOLICITUD</b>	<b>ES1641.952</b>	
<b>2. TASAS</b>	<b>Importe (en euros)</b>	
<b>Concepto</b>	<b>Código de barras asignado</b>	<b>Importe</b>
IE01 Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	88097025205	63,05
IE02 Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
IE04 Petición IET		0,00
IE06 Prioridad extranjera (0)		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	<input type="checkbox"/>	
El solicitante es una Universidad pública	<input type="checkbox"/>	
	<b>Importe total</b>	63,05
	<b>Importe abonado</b>	63,05

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

**Identificación**

Ejercicio: 2014  
Nro. Justificante: 7915117796573

**Sujeto Pasivo:**

N.I.F.: Apellidos y Nombre o Razón social:

**Agente o Representante legal: (1)**

N.I.F.: Apellidos y Nombre o Razón social:

**B84921709 PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL**

Código de Agente o Representante: (2) Dígito de control:

**0499 5**

**Autoliquidación**

Titular del expediente si es distinto del pagador: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Expediente Modalidad: **P** Número: Tipo: (3)  
Clave: **IE01** Año: **2014** Concepto: **Solicitud de Invencción por Internet**  
Unidades: **1** Importe: **63,05**

Referencia OEPM: **88097025205**



909992100200188097025205

**Declarante**

Fecha: **28/07/2014**

Firma:  
**PONS PATENTES  
Y MARCAS  
INTERNACIONAL  
SL**

**Ingreso**

Importe en Euros:  
Adeudo en cuenta:   
Entidad: **2100** Oficina: D.C. Nro. Cuenta  
NRC Asignado: 7915117796573T6299633C

- (1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.
- (2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.
- (3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.
- (4) Una copia de este impreso se acompañará con la presentación de documentación en la OEPM.



## Método para la producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano

### DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a un método para la producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano de un cultivo celular, preferentemente bacteriano, basado en un ácido nucleico que comprende los genes *pleD\**, *bgsB* y *bgsA*. La presente invención se enmarca dentro del sector biotecnológico, con aplicaciones en los sectores químico, alimentario y sanitario.

10

### ESTADO DE LA TÉCNICA

Los beta-glucanos de enlaces mixtos ( $\beta$ -glucanos EM) son polímeros abundantes en semillas de cereales, como cebada o avena. Estos  $\beta$ -glucanos de cereales se caracterizan por ser homopolímeros lineales, no ramificados, constituidos por bloques de 3, 4 o más D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 (fragmentos celulósicos o celo-oligosacáridos), bloques separados entre sí por enlaces  $\beta$ -1,3. La estructura resultante es un polisacárido lineal constituido mayoritariamente por segmentos de celotriosas y celotetrosas (proporción relativa 2,5:1), aunque también existen otros celo-oligosacáridos de mayor tamaño, unidos entre sí por enlaces  $\beta$ -1,3 (Simmons TJ *et al.* 2013; *An unexpectedly lichenase-stable hexasaccharide from cereal, horsetail and lichen mixed-linkage  $\beta$ -glucans (MLGs): Implications for MLG subunit distribution*, *Phytochemistry* 95:322-332).

25 Otro  $\beta$ -glucano EM es el llamado lichenan o lichenina que se encuentra comúnmente en líquenes como *Cetraria islandica* (Perlin AS y Suzuk S, 1962; *The Structure of Lichenin: Selective Enzymolysis Studies. Canadian Journal of Chemistry* 40:50-56). El lichenan también es un  $\beta$ -glucano de enlaces mixtos  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 en el que los bloques de celotriosas son mucho más abundantes (78%) que las de celotetrosas (4%) y otros segmentos celo-oligosacarídicos más largos (18%).

También se ha encontrado este tipo de  $\beta$ -glucano EM en el fósil viviente *Equisetum* (Fry SC *et al.* 2008. *Mixed-linkage (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan is a major hemicellulose of *Equisetum* (horsetail) cell walls*; *New Phytologist* 179:104-115). En este caso los bloques de celotetrosa son los más abundantes, con proporciones menores de celotriosa y otros fragmentos celulósicos de mayor tamaño, separados por enlaces  $\beta$ -

35

1,3 (Simmons TJ *et al.* 2013; *An unexpectedly lichenase-stable hexasaccharide from cereal, horsetail and lichen mixed-linkage b-glucans (MLGs): Implications for MLG subunit distribution*, *Phytochemistry* 95:322-332).

5 Todos los mencionados  $\beta$ -glucanos EM comparten características estructurales, todos son glucanos lineales que presentan enlaces mixtos  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4, pero también exhiben diferencias en cuanto a la frecuencia relativa de cada tipo de enlace a lo largo de la cadena polisacáridica (Fry SC *et al.* 2008 *Mixed-linkage (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan is a major hemicellulose of Equisetum (horsetail) cell walls* *New Phytologist* 179:104-115; Simmons TJ *et al.* 2013 *An unexpectedly lichenase-stable hexasaccharide from cereal, horsetail and lichen mixed-linkage b-glucans (MLGs): Implications for MLG subunit distribution* *Phytochemistry* 95:322-332).

15 Los  $\beta$ -glucanos EM  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 han encontrado distintas aplicaciones en la industria alimentaria como ingredientes funcionales, con evidentes beneficios nutricionales puesto que poseen efectos positivos sobre las respuestas glucémicas, insulínica y de colesterol a la ingestión de alimentos (Brennan CS y Cleary LJ, 2005; *The potential use of cereal (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucans as functional food ingredients*. *J. Cereal Sci.* 42:1-13). También se ha descrito actividad inmunomoduladora de este tipo de polímeros (Castro GR *et al.* 2007; *Controlled release biopolymers for enhancing the immune response*. *Mol. Pharmaceutics* 4(1):33-46). Ambos tipos de aplicaciones requieren la purificación del polímero mediante métodos más o menos complejos. Las fuentes de  $\beta$ -glucanos EM  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 suelen ser granos de cereales (cebada, avena) o biomasa de líquenes. Los polímeros son obtenidos a partir del material vegetal molido y tratado con agua hirviendo, tras una serie de pasos de fraccionamiento por congelación y descongelación, combinados a veces con extracción con álcali y precipitación (Paulsen BS *et al.* 2002 *Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens* *J. Chromatography A* 967:163-171). Se ha descrito que la eficacia funcional de estos polímeros puede estar influida por el método de extracción, así como por propiedades tales como el peso molecular o las características reológicas (Brennan CS y Cleary LJ, 2005 *The potential use of cereal (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucans as functional food ingredients*. *J. Cereal Sci.* 42:1-13).

35 La producción industrial de ciertos polímeros vegetales, como celulosa o alginato, ha encontrado alternativas en bacterias productoras de los mismos o similares polímeros,

facilitando su obtención y purificación. Sin embargo, no se ha descrito hasta el momento la producción de  $\beta$ -glucanos EM  $\beta$ -1,3, $\beta$ -1,4 por bacterias. Un método de producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano (o  $\beta$ -glucanos EM  $\beta$ -1,3, $\beta$ -1,4) por bacterias sería de gran utilidad ya que ampliaría las fuentes de materia prima para la obtención de este tipo de polímero, que hasta ahora son exclusivamente vegetales (cereales o líquenes), así como los métodos de aislamiento y purificación de los mismos.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 En la presente invención se demuestra que mediante la utilización de un ácido nucleico que comprende las secuencias SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3 en una bacteria se produce poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano. A diferencia de los  $\beta$ -glucanos EM conocidos en plantas y líquenes, el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano de la presente invención presenta una *ratio* de enlaces  $\beta$ 1,3: $\beta$ 1,4 de 1:1, distribuidos de forma completamente alternante a lo largo de la cadena polisacáridica.

15 Por este motivo, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico recombinante que comprende:

- 20 a. una subunidad (a) que comprende un ácido nucleico de secuencia SEQ ID NO: 1;
- b. una subunidad (b) que comprende un ácido nucleico con al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 2; y
- c. una subunidad (c) que comprende un ácido nucleico con al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 3.

25 La subunidad (a), (b) o (c) es al menos un 70% idéntica con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente; más preferiblemente un 75%, un 80, un 81%, un 82%, un 83%, un 84%, un 85%, un 86%, un 87%, un 88%, un 89%, un 90%, un 91%, un 92%, un 93%, un 94% un 95%, un 96%, un 97%, un 98% o un 99%

30 En la presente invención la SEQ ID NO: 1 se refiere al gen *pleD\**, que codifica para una proteína con actividad diguanilato ciclasa constitutiva (DGCc). 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") y posee un 99% de identidad con *PleD\**. Mientras que la proteína codificada por *pleD* requiere ser fosforilada para expresar actividad DGC,

5 *pleD\** codifica una proteína mutante que muestra elevada actividad DGC en ausencia de fosforilación y de forma constitutiva (Paul R. *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, ni *pleD* ni *pleD\**, han sido relacionados con la producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano ni en *C. crescentus* ni en otras bacterias. En la presente invención la SEQ ID NO: 1 codifica para la proteína descrita en la SEQ ID NO: 4.

10 En la presente invención la SEQ ID NO: 2 se refiere al gen *bgsB* (Smb20390; *Plateforme Bioinformatique LIPM-SPE*) que es un gen propio de *Sinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*) que codifica para una proteína de la familia de transportadores bacterianos RND (*Resistance Nodulation Cell Division*) probablemente necesaria para la exportación del poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano al exterior celular. La proteína codificada por *bgsB* contiene un dominio HlyD presente en múltiples proteínas implicadas en la exportación de diversos compuestos al exterior celular (Zgurskaya HI, *et al.* 2009 *Structural and functional diversity of bacterial membrane fusion proteins*. *Biochimica et biophysica acta* 1794(5):794-807). En la presente invención la SEQ ID NO: 2 codifica para la proteína descrita en la SEQ ID NO: 5.

20 En la presente invención la SEQ ID NO: 3 se refiere al gen *bgsA* (Smb20391, *Plateforme Bioinformatique LIPM-SPE*) que es un gen propio de *Sinorhizobium meliloti* que codifica para una glicosiltransferasa de tipo 2 (GT-2), necesaria para la biosíntesis del polímero poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano. Además se le ha atribuido actividad de celulosa sintasa al poseer homología con este tipo de enzimas. En la presente invención la SEQ ID NO: 3 codifica para la proteína descrita en la SEQ ID NO: 6.

30 En una realización preferida del primer aspecto de la invención la subunidad (a) consiste en la SEQ ID NO: 1. En otra realización preferida del primer aspecto de la invención la subunidad (b) consiste en la SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida del primer aspecto de la invención la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 3. En una realización más preferida la subunidad (a) consiste en la SEQ ID NO: 1; la subunidad (b) consiste en la SEQ ID NO: 2; y la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 3.

35 El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos secuencias de nucleótidos que se

comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

5 El ácido nucleico del primer aspecto de la invención también se refiere a las variantes biológicamente activas del mismo obtenidas, por ejemplo, por sustituciones conservativas conocidas por el experto en la materia.

10 En la presente invención el ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico (ADN) o es ácido ribonucleico (ARN). Preferiblemente es ADN.

15 En una realización aún más preferida del primer aspecto de la invención la subunidad (b) está unida al extremo 3' de la subunidad (a) y la subunidad (c) está unida al extremo 3' de la subunidad (b), donde la unión se realiza directamente o a través de un espaciador. Preferiblemente el ácido nucleico es el ácido nucleico de secuencia SEQ ID NO: 7, donde dicha secuencia consiste en los genes en tándem *pleD\**-*bgsB*-*bgsA*.

20 El término espaciador en la presente invención se refiere a cualquier secuencia nucleotídica comprendida entre las subunidades (a) y (b) o entre las subunidades (b) y (c). También se refiere a secuencias que hayan sido fruto de los métodos de clonaje conocidos por el experto en la materia.

25 En la presente invención los genes *bgsB* y *bgsA* se han incluido en el ácido nucleico de la invención descrito como SEQ ID NO 7 e incluido en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 tal y como se encuentran en el genoma de *S. meliloti* (tándem *bgsB*-*bgsA*).

30 En la presente invención los genes *pleD\**, *bgsB* y *bgsA* se encuentran en tándem y bajo el control de un promotor que puede ser constitutivo o inducible. Por este motivo, una realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al ácido nucleico que además comprende un promotor constitutivo o inducible unido de forma operativa. Preferiblemente el promotor es constitutivo.

35 “En tándem” en la presente invención se refiere a que el extremo 3' del primer gen va seguido, bien consecutivamente o separados por una determinada secuencia nucleotídica, por el extremo 5' de un segundo gen.

En la presente invención el término “promotor” hace referencia a una región del ADN, generalmente “aguas arriba” o “upstream” del punto de inicio de la transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles. Ejemplos de promotores procariontes incluyen, por ejemplo, pero sin limitarnos, los promotores de los genes *trp*, *recA*, *lac*, *lacI*, *tet*, *gal*, *trc*, o *tac*. 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 tándem de genes *pleD\*-bgsB-bgsA*, 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 tándem génico *pleD\*-bgsB-bgsA* 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 de los genes, como es entre otros (y sin que sirva de limitación) el promotor inducible Ptet, que es activado en presencia de tetraciclina. No obstante, es conocido por el experto en la materia que 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*.

20

En una realización preferida del primer aspecto de la invención el promotor es el *Plac* de secuencia SEQ ID NO: 8.

25

En una realización aún más preferida la secuencia del ácido nucleico del primer aspecto de la invención es la SEQ ID NO: 9, que comprende las secuencias *Plac-pleD\*-bgsB-bgsA*.

30

Los términos “polinucleótido”, “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico” y “oligonucleótido” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que pueden estar o no química o bioquímicamente modificados.

35

La expresión “unido operativamente” (o “unido de forma operativa”), tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a un polinucleótido,

está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

5 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una construcción genética que comprende el ácido nucleico del primer aspecto de la invención.

10 Se entiende por “construcción genética” aquel ácido nucleico que comprende el ácido nucleico del primer aspecto de la invención y secuencias control que dirigen su transcripción intracelular. Las secuencias de control son las apropiadas para la expresión de un polinucleótido en células son conocidas en el estado de la técnica, como por ejemplo promotores, señales de inicio de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, señales de poliadenilación y/o activadores transcripcionales.

15 Utilizando técnicas bien conocidas, un experto en la materia sería capaz de obtener un vector adecuado para la clonación y/o expresión del ácido nucleico del primer aspecto de la invención en cualquier bacteria.

20 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico del primer aspecto de la invención o la construcción génica del segundo aspecto de la invención.

25 El vector puede ser, por ejemplo un vector de clonación o un vector de expresión. El término “vector de clonación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. El término “vector de expresión”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un vector de clonación adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula, denominada célula huésped. Ejemplos de vectores de  
30 expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura.

35 El término “expresión” se refiere al proceso por el cual se sintetiza un polipéptido a partir de un polinucleótido. Incluye la transcripción del polinucleótido en un ARN mensajero (ARNm) y la traducción de dicho ARNm en una o varias proteínas o polipéptidos.



En una realización preferida del tercer aspecto de la invención el vector es un plásmido, preferiblemente es el plásmido pJB3Tc19 (Blatny JM *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 tras la inclusión de la SEQ ID NO: 9 en el plásmido pJBPlE<sup>D</sup>\*9091, que consiste en la SEQ ID NO: 10. Por lo tanto, una realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al plásmido pJBPlE<sup>D</sup>\*9091 de secuencia SEQ ID NO: 10.

El plásmido pJBPlE<sup>D</sup>\*9091, introducido en la cepa de *Escherichia coli* β2163 como soporte biológico, ha sido depositado con el número CECT 8651 (*Plásmido pJBPlE<sup>D</sup>\*9091*) el 10 de Junio de 2014 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 ZAIDÍN (EEZ-CSIC), C/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada (ESPAÑA). El depósito de la cepa depositada (y que comprende el plásmido SEQ ID NO: 10) cuya referencia es *Plásmido pJBPlE<sup>D</sup>\*9091*, fue recibido por la CECT con el número de acceso CECT 8651 una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende el ácido nucleico del primer aspecto de la invención, la construcción genética del segundo aspecto de la invención o el vector del tercer aspecto de la invención. En la presente invención la célula puede ser una bacteria, una levadura, una cianobacteria o una célula eucariota. Preferiblemente la célula es una bacteria.

Una realización más preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere a la célula donde dicha célula es del orden Rhizobiales, por ejemplo de los géneros Sinorhizobium, Rhizobium, Methylobacterium, Mesorhizobium, o cualquiera de los pertenecientes a este orden Rhizobiales, como los descritos en "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" (LPSN) o también en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

En una realización aún más preferida del cuarto aspecto de la invención la célula es del género Sinorhizobium, por ejemplo de las especies *S. meliloti*, *S. medicae*, *S. fredii*, *S. arboris*, *S. americanum*, etc. Más preferiblemente la célula es de alguna cepa de la especie *Sinozhizobium meliloti*, por ejemplo las cepas 8530, 2011, GR4, AK83,



BL225, SM11, Rm41, L5.30, etc. Aún más preferiblemente dicha célula es de la cepa 8530. En una realización particular dicha célula es CECT 8652.

5 La cepa CECT 8652 ha sido depositada el 10 de Junio de 2014, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Cientific Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna, 46980 Valencia (ESPAÑA), por Juan Sanjuán Pinilla, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN (EEZ-CSIC), C/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada (ESPAÑA). El depósito de la cepa depositada cuya referencia es *Sinorhizobium meliloti* SmepJBPIeD\*9091, fue recibido por la 10 CECT con el número de acceso CECT 8652 una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

En otra realización particular del cuarto aspecto de la invención la célula es *Escherichia coli*. Preferiblemente es E. coli  $\beta$ 2163, más preferiblemente es la cepa es 15 la que comprende el plásmido de secuencia SEQ ID NO: 10.

La introducción del ácido nucleico del primer aspecto de la invención, de la construcción génica del segundo aspecto de la invención o del vector del tercer aspecto de la invención se realiza por cualquier procedimiento conocido por el experto 20 en la materia, por ejemplo en el caso del vector (plásmido) por transformación o por transfección, por metodología recombinante, conjugación o electroporación.

La célula transformada de la invención puede presentar la construcción genética clonada en un vector génico capaz de replicarse establemente en dicha célula, como 25 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. Alternativamente, la célula transformada puede 30 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 35 recombinación entre ácidos nucleicos.

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.

5

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.

10

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.

15

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del ácido nucleico del primer aspecto de la invención, la construcción génica del segundo aspecto de la invención, el vector del tercer aspecto de la invención, o la célula del cuarto aspecto de la invención para la producción del poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano.

20

El poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano obtenido en la presente invención posee una estructura química primaria correspondiente a una cadena lineal de unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 completamente alternantes, de forma que la unidad básica de repetición es el disacárido  $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  y la ratio de enlaces  $\beta$ 1,3: $\beta$ 1,4 es 1:1. La longitud de estas cadenas seguramente implica cientos o miles de unidades de glucosa. Durante la biosíntesis por la bacteria, varias cadenas lineales se asocian entre sí para formar fibras que aparecen proyectadas hacia el exterior celular y son visibles al microscopio electrónico. Una vez separadas las fibras de las células por procesos físico-químicos, el material obtenido presenta un aspecto algodonoso, fibroso y blanquecino.

25

30

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano que comprende:

35

- a. cultivar la célula del cuarto aspecto de la invención;
- b. aislar y purificar el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano.

En la presente invención las condiciones de cultivo para producir poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano hacen referencia a las condiciones habitualmente empleadas y conocidas por cualquier experto en la materia y son las propicias para la biosíntesis y exportación extracelular del poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano. 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 poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano. Las condiciones y tiempos de cultivo para la producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano 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.

De acuerdo con el método de producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano del sexto aspecto la invención, la célula de la invención puede ser cultivada en presencia de al menos otra célula, la cual también es capaz de producir poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano y puede haber sido previamente transformada como describe la presente invención.

Los resultados obtenidos demuestran que el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano obtenido con el método del sexto aspecto de la invención consiste en un polímero lineal de glucopiranosas unidas por enlaces alternantes  $\beta$ 1,3 y  $\beta$ 1,4, de forma que puede deducirse una unidad repetitiva consistente en el disacárido  $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ . Esta estructura primaria es notablemente diferente a la de otros poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucanos conocidos, como los de cereales o líquenes mencionados anteriormente, en los que pueden distinguirse subunidades o bloques principalmente de tipo celotriosa (trisacárido) y celotetrosa (tetrasacáridos) unidos entre sí por enlaces  $\beta$ 1,3, lo que implica que contienen una menor proporción de enlaces  $\beta$ 1,3 que de  $\beta$ 1,4 y que los enlaces  $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4 no son completamente alternantes. En cambio, el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano objeto de esta invención posee igual proporción de ambos tipos de enlaces y los enlaces  $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4 son completamente alternantes. Por este motivo, un séptimo aspecto de la presente invención se refiere al poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano, producido por el método del sexto aspecto de la invención, que comprende enlaces mixtos  $\beta$ 1,3 y  $\beta$ 1,4 en relación 1:1 y completamente alternantes.

El poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano de la presente invención consiste en un polímero lineal de glucosas unidas por enlaces  $\beta$ 1,3 y  $\beta$ 1,4 alternantes, de forma que posee una subunidad de repetición consistente en el disacárido  $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ . Donde la relación de enlaces  $\beta$ 1,3: $\beta$ 1,4 es 1:1. El poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano de la presente invención también podría referirse a otros polímeros similares, con ratio de enlaces también 1:1, pero que tuviesen otra alternancia de enlaces, por ejemplo, 2  $\beta$ 1,3:2  $\beta$ 1,4, etc. (la ratio de enlaces sería 1:1 en este caso, pero la unidad de repetición sería un tetrasacárido  $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ ).

Un octavo aspecto de la presente invención se refiere al uso del ácido nucleico del primer aspecto de la invención, la construcción genética del segundo aspecto de la invención, el vector del tercer aspecto de la invención, la célula del cuarto aspecto de la invención o el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano del séptimo aspecto de la invención para la producción de laminaribiosa.

La laminaribiosa en la presente invención se refiere a un disacárido 3-beta-D-glucosil-D-glucosa (o también denominado  $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-3)-D-glucopiranososa). Esto es, un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa unidas por enlace  $\beta$ 1,3 (Nº registro CAS 34980-39-7, *Chemical Abstract Service*). Este disacárido tiene aplicación en agricultura, como un inductor de germinación de polen (Patente US 6303587). El disacárido laminaribiosa no existe o es poco abundante de forma libre en la naturaleza; se han detectado cantidades traza de laminaribiosa en algunos tipos de miel de abejas, si bien no está claro si es producto de la degradación de algún polisacárido presente en el néctar de las flores (Alvarez-Suarez JM *et al.* 2010: *Contribution of honey in nutrition and human health: a review. Mediterr. J. Nutr. Metab.* 3:15–23). De forma que la laminaribiosa comercial solo se obtiene por degradación de polímeros polisacarídicos o por síntesis. Ejemplos de producción de laminaribiosa en el estado del arte son: por síntesis química (Patente US6632940); por síntesis enzimática a partir de sacarosa (Kitaoka M *et al.* 1993; *Conversion of sucrose into laminaribiose using sucrose phosphorylase, xylose isomerase and laminaribiose phosphorylase, J. of the Japanese Society of Starch Science*, 40:311-314), así como a partir de la hidrólisis de  $\beta$ 1,3 glucanos (laminarina, curdlan) con endo- $\beta$ 1,3 glucanasas (p.e. Kurakate M *et al.* 2013; *Enzymatic Properties of  $\beta$ -1,3-Glucanase from Streptomyces sp Mo.*; *J. Food Science* 78 (4): C502-C506; doi: 10.1111/1750-3841.12076). En todos los casos se producen otros compuestos además de

laminaribiosa, lo que exige su posterior separación para conseguir laminaribiosa de alta pureza.

Un noveno aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de laminaribiosa que comprende:

- 5 a. cultivar la célula del cuarto aspecto de la invención;
- b. aislar y purificar el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano;
- c. digerir el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano con lichenasa y purificar el producto resultante.

10 La lichenasa en la presente invención se refiere a la enzima conocida por el experto en la materia como EC 3.2.1.73 (también denominada licheninasa, 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohidrolasa, 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohidrolasa o endo-beta-1,3-1,4 glucanasa) que escinde los enlaces  $\beta$ -1,4 adyacentes a enlaces  $\beta$ -1,3 dentro de un glucano lineal. La digestión se puede realizar por los métodos conocidos por el  
15 experto en la materia.

El cultivo de la célula en el noveno aspecto de la invención se puede realizar por cualquier método conocido por el experto en la materia con la condiciones adecuadas para que se produzca el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano, tal y como se ha indicado para el  
20 sexto aspecto de la invención.

El aislamiento y la purificación del poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano en el sexto y en el noveno aspecto de la invención se puede realizar por cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo puede ser realizado por cualquier método físico  
25 (p.e. decantación, filtración, centrifugación), químico (p.e. extracción con ácidos o álcalis) o mecánico (p.e. sonicación, cromatografía).

La purificación de la laminaribiosa en el noveno aspecto de la invención se puede realizar por cualquier método conocido por el experto en la materia.

30 También podría utilizarse para la obtención del poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano de la presente invención y de laminaribiosa, las proteínas codificadas por las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, es decir, las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. Por lo que la presente invención también se refiere a una composición que comprende las proteínas de secuencias SEQ ID NO: 4,  
35 SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 a su uso para la obtención de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano de la presente invención y también para la producción de laminaribiosa, así como a la

células que las comprende, a un método de producción del poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano que comprende cultivar dicha célula y aislar y purificar el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano; así como el método de producción de laminaribiosa que comprende cultivar dichas células, aislar y purificar el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano producido, digerirlo con lichenasa y purificar el producto resultante.

5

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

**FIG. 1** Mapa genético del plásmido pJBPléD\*9091 SEQ ID No: 10 (CECT 8651). Se indica la posición de los genes pleD\* (SEQ ID NO: 1), bgsB (SEQ ID NO: 2), bgsA (SEQ ID NO: 3) y el promotor Plac (SEQ ID NO: 8) tras su clonación en el vector pJB3Tc19. tetR, Tetracycline Repressor; tetA, tetracycline resistance protein; oriV, origen de replicación; oriT, origen de transferencia conjugativa; Amp, gen de resistencia a ampicilina; trfA, proteína de replicación plasmídica, Pneo, promotor de Neomicina; XbaI, EcoRI, sitios de restricción/clonación.

20

**FIG. 2** Cantidad de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano, medido como peso seco del polímero respecto al peso seco total del cultivo, presente en la biomasa total de los cultivos de las cepas *Sinorhizobium meliloti* 8530 pJBPléD\*9091 (CECT 8652) y *Sinorhizobium meliloti* 8530 (pJB3Tc19, vector vacío).

25

**FIG. 3** Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Fig. 3A) y estructura (Fig. 3B) del poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano producido por la cepa *Sinorhizobium meliloti* 8530 pJBpléD\*9091 (CECT 8652). A y B se refieren a las dos unidades de glucosa identificadas, la unidad A sustituida en posición  $\rightarrow$ 4), la B sustituida en posición  $\rightarrow$ 3. A1, A2...A6 y B1, B2,...B6 indican cada uno de los carbonos de cada unidad de glucosa, A o B, respectivamente. En la figura 3B se marca entre corchetes la unidad repetitiva, correspondiente al disacárido laminaribiosa.

30  
35

**FIG. 4** Hidrólisis del poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano producido por *Sinorhizobium meliloti* 8530 pJBPlED\*9091 (CECT 8652) con la enzima liquenasa y separación de los productos por cromatografía de capa fina. Digestión con la hidrolasa liquenasa de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano producido por *Sinorhizobium meliloti* 8530 pJBPlED\*9091 (carril 2), lichenan de *Cetraria islandica* (carril 4) y  $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano de cebada (carril 6), y separación de los productos por cromatografía de capa fina. Carril 7, mezcla de glucosa (Glc) y maltooligosacáridos de distinto tamaño (Glc2, maltosa; Glc3, maltotriosa; Glc4, maltotetrosa; Glc5, maltopentosa; Glc6, maltohexosa).

## 10 EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

### 15 **EJEMPLO 1: Producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano con bacterias de CECT 8652 (SmepJBPlED\*9091; *Sinorhizobium meliloti* 8530 transformada con el plásmido pJBPlED\*9091),**

Se construyó el plásmido pJBPlED\*9091 cuya secuencia consiste en la SEQ ID NO: 10 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* (Paul R. *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), el gen *bgsB* de secuencia SEQ ID NO: 2, procedente de *Sinorhizobium meliloti*, y el gen *bgsA* de secuencia SEQ ID NO: 3, procedente de *Sinorhizobium meliloti*, en el vector pJB3Tc19 (Blatny JM *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\*9091 (SEQ ID NO: 10; CECT 8651). En esta construcción, el tándem de genes *pleD\*-bgsB-bgsA* (SEQ ID NO: 7) quedó bajo el control transcripcional del promotor *lac* de secuencia SEQ ID NO: 8 (Figura 1) (es decir, la SEQ ID NO: 9, *Plac-pleD\*-bgsB-bgsA*, está comprendida en la SEQ ID NO: 10).

Se introdujo el plásmido SEQ ID NO: 10 (pJBPlED\*9091; CECT 8651) en la estirpe bacteriana *Sinorhizobium meliloti* 8530 mediante conjugación, dando lugar a la cepa recombinante *Sinorhizobium meliloti* CECT 8652 (también referida en la presente



memoria como SmepJBPlE\*9091). También se obtuvo la cepa SmepJB3Tc19, derivada de la mencionada bacteria *S. meliloti* 8530 (Sme) tras introducirle por conjugación el vector pJB3Tc19 (vector vacío).

5 Para determinar la producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano, las bacterias recombinantes fueron cultivadas en frascos que contenían el caldo denominado “Medio Mínimo de Robertsen modificado” (Robertsen BK *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, 10 vitaminas, manitol y glutamato de sodio, e incubados durante 3 días a 28°C en agitación continua (180 revoluciones por minuto, rpm, en agitador orbital).

Para determinar cuantitativamente la producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano por los distintos cultivos bacterianos, se ha utilizado un método basado en otros métodos 15 descritos en la bibliografía para el aislamiento de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucanos vegetales (Paulsen BS *et al.* 2002 *Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens* J. Chromatography A 967:163-171). Para ello, las bacterias se cultivaron como se ha descrito anteriormente y posteriormente se filtró el cultivo a través de un cedazo con tamaño de poro de 500 20  $\mu$ m, recuperando el líquido filtrado, que fue posteriormente sometido a centrifugación. Las células precipitadas fueron liofilizadas y su peso cuantificado con una balanza de precisión. El material atrapado en el tamiz o cedazo fue recuperado, dispuesto en un tubo de 50 ml y resuspendido en 30 ml de agua hirviendo. Tras mantenerlo hirviendo durante 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 4.000 rpm 25 durante 20 min. El sobrenadante fue desechado y el material precipitado fue sometido a 4 ciclos más de hervido, enfriado y centrifugado, como el descrito anteriormente. El material obtenido fue liofilizado y pesado en una balanza de precisión. Se determinó la proporción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano obtenido respecto al peso total de la biomasa de cada cultivo (Figura 2).

30 El material insoluble en agua fue sujeto a análisis químico para determinar su composición en azúcares así como su estructura. El análisis de monosacáridos, mediante separación por GLC/MS (Cromatografía Gas-Líquido/Espectrometría de Masas) de derivados metil glucósidos per-O-trimetilsililados (Chaplin MF, 1982; *A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography*. Anal. Biochem. 123:336-341) indicó 35



que el único monosacárido presente era glucosa (glucopiranososa). El análisis de metilación, utilizando el método de Ciucanu y Costello (Ciucanu I y Costello CE, 2003; *Elimination of oxidative degradation during the per-O-methylation of carbohydrates*. J. American Chemical Society 125:16213-16219), indicó que dichas glucopiranosas  
5 estaban sustituidas en posiciones  $\rightarrow 3$ ) y  $\rightarrow 4$ ). El estudio de RMN (Resonancia Magnética Nuclear) permitió la asignación de carbonos mediante experimentos bidimensionales espectroscopia de correlación-filtro de doble *quantum* (DQF-COSY), espectroscopía de correlación total (TOCSY), espectroscopia de efecto nuclear Overhauser en marco rotatorio (ROESY), y espectroscopía de correlación de *quantum simple heteronuclear* (HSQC), y confirmó estas sustituciones en las posiciones  $\rightarrow 3$  y  
10  $\rightarrow 4$ ), en una proporción 1:1 (Figura 3), notablemente diferente a los  $\beta$ -glucanos EM  $\beta 1,3$ - $\beta 1,4$  descritos en vegetales y líquenes en los que la proporción de enlaces  $\beta 1,3$  es varias veces inferior a los  $\beta 1,4$  (ver estado del arte arriba).

15 El polímero además fue sensible a la digestión con la enzima lichenasa, lo que confirma la presencia de glucopiranosas sustituidas en posición  $\rightarrow 4$  adyacentes a glucopiranosas sustituidas en posición  $\rightarrow 3$ . Además, la digestión del polímero con la enzima lichenasa generó un único producto de movilidad cromatográfica similar a un dímero de glucosa (Figura 4, carril 2), lo que implica que este poli- $\beta 1,3$ - $\beta 1,4$ -  
20  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$  y confirma la alternancia de enlaces  $\beta 1,3$  y  $\beta 1,4$  a lo largo de la cadena polisacáridica. Esta estructura es totalmente novedosa respecto a otros  $\beta$ -glucanos EM  $\beta 1,3$ - $\beta 1,4$  descritos previamente (ver estado del arte previamente indicado).

25 Puesto que las condiciones de cultivo fueron estándar y no optimizadas para la producción de poli- $\beta 1,3$ - $\beta 1,4$ -D-glucano, es esperable que la cantidad de poli- $\beta 1,3$ - $\beta 1,4$ -D-glucano producido por las bacterias transformadas con el tándem de genes pleD\*-bgsB-bgsA sea muy superior en condiciones y tiempos de cultivo optimizados.

## 30 **EJEMPLO 2: Producción de laminaribiosa a partir del poli- $\beta 1,3$ - $\beta 1,4$ -D-glucano de la presente invención.**

El poli- $\beta 1,3$ - $\beta 1,4$ -D-glucano producido en la presente invención consiste en un polímero lineal de glucopiranosas unidas por enlaces alternantes  $\beta 1,3$  y  $\beta 1,4$ , de  
35 acuerdo a los datos de RMN (Figura 3) y de digestión con la enzima lichenasa (Fig. 4). Puesto que la lichenasa rompe específicamente enlaces  $\beta 1,4$  adyacentes a enlaces

$\beta$ 1,3, el producto resultante de la digestión de nuestro poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano es exclusivamente un disacárido 3- $\beta$ -D-glucosil-D-glucosa, también conocido como laminaribiosa.

5 Metodología: 5 mg de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano producido en la presente invención fueron mezclados con 10 unidades (U) de una lichenasa comercial (*endo*-1,3(4)- $\beta$ -  
Glucanasa de *Bacillus* sp.; EC 3.2.1.73; *Megazyme International*, Irlanda), en 1 ml de  
10 agua. El mismo tratamiento se dio a iguales cantidades de  $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucanos de  
cebada y liquen. Las mezclas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 14-16  
horas (h). Así mismo se dispusieron controles consistentes en los polímeros  
15 incubados en las mismas condiciones pero en ausencia de lichenasa. Todas las  
muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm, se recogieron los sobrenadantes y se  
liofilizaron. Los liofilizados se resuspendieron en agua y se sometieron a  
cromatografía en capa fina (TLC) en placas de *silica gel 60 Alugram Sil G/UV*  
(Macherey-Nagel, Alemania) usando butanol:acético:agua (2:1:1) como eluyente. Los  
20 carbohidratos fueron detectados con una mezcla de orcinol:ácido sulfúrico.

En la figura 4 se observa que la digestión con lichenasa del polímero bacteriano (carril  
2) produce como único producto un disacárido. Este resultado, además, correlaciona  
25 perfectamente con la estructura deducida a partir de los datos de RMN. De acuerdo a  
la estructura descrita del poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano y la especificidad de sustrato de la  
lichenasa, este disacárido es laminaribiosa. En cambio, la hidrólisis, con la misma  
enzima lichenasa, de los polímeros de liquen y cebada generan mezclas de  
oligosacáridos que contienen 3 o más glucosas (trímeros, tetrámeros, pentámeros,  
etc.).

Por lo tanto, mediante una digestión enzimática con lichenasa se consigue, a partir del  
poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano producido por la construcción genética de la presente  
invención en las bacterias de la presente invención, que se genere laminaribiosa como  
30 único producto. Este método de producción de laminaribiosa permite la obtención de  
únicamente laminaribiosa, por lo que presenta ventajas frente a otros procesos  
descritos en el estado del arte, particularmente se facilita la posterior purificación de la  
laminaribiosa al no generarse otros tipos de oligosacáridos.

35 En relación a otros métodos conocidos de producción de laminaribiosa, en particular  
los basados en hidrólisis de glucanos, nuestro método difiere en 1) el uso de un

sustrato diferente (poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano bacteriano en lugar de poli- $\beta$ 1,3 glucanos) y 2) el uso de una glucanasa diferente (lichenasa). Aporta además una ventaja, pues la eficiencia del proceso es superior, al ser laminaribiosa el único producto resultante de la hidrólisis, lo que facilita la posterior purificación del disacárido.

5

## REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico recombinante que comprende:
  - a. una subunidad (a) que comprende un ácido nucleico de secuencia SEQ ID NO: 1;
  - b. una subunidad (b) que comprende un ácido nucleico con al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 2; y
  - c. una subunidad (c) que comprende un ácido nucleico con al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 3.
2. Ácido nucleico según la reivindicación 1 donde la subunidad (a) consiste en la SEQ ID NO: 1.
3. Ácido nucleico según la reivindicación 1 donde la subunidad (b) consiste en la SEQ ID NO: 2.
4. Ácido nucleico según la reivindicación 1 donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 3.
5. Ácido nucleico según la reivindicación 1 donde la subunidad (a) consiste en la SEQ ID NO: 1; la subunidad (b) consiste en la SEQ ID NO: 2; y la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 3.
6. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el ácido nucleico es un ácido desoxirribonucleico.
7. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la subunidad (b) está unida al extremo 3' de la subunidad (a) y la subunidad (c) está unida al extremo 3' de la subunidad (b), donde la unión se realiza directamente o a través de un espaciador.
8. Ácido nucleico según la reivindicación 7 donde el ácido nucleico es SEQ ID NO: 7.
9. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que además comprende un promotor constitutivo o inducible unido de forma operativa.

10. Ácido nucleico según la reivindicación 9 donde el promotor es constitutivo.
11. Ácido nucleico según la reivindicación 10 donde el promotor es la SEQ ID NO: 8.
- 5 12. Ácido nucleico según la reivindicación 11 donde el ácido nucleico es SEQ ID NO: 9.
13. Construcción genética que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 10 14. Vector que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la construcción genética según la reivindicación 13.
- 15 15. Vector según la reivindicación 14 cuya secuencia consiste en la SEQ ID NO: 10.
- 16 16. Célula, que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, la construcción genética según la reivindicación 13 o el vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde dicha célula se selecciona de la lista que comprende: bacteria, cianobacteria y levadura.
- 20 17. Célula según la reivindicación 16 donde dicha célula es una bacteria.
18. Célula según la reivindicación 17 donde dicha bacteria es del orden Rhizobiales.
- 25 19. Célula según la reivindicación 18 donde la bacteria es del género *Sinorhizobium*.
20. Célula según la reivindicación 19 donde dicha bacteria es de la especie *Sinozhizobium meliloti*.
- 30 21. Célula según la reivindicación 20 donde dicha bacteria es de la cepa 8530.
22. Célula según la reivindicación 21 donde dicha célula es CECT 8652.
23. Uso del ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, la construcción genética según la reivindicación 13, el vector según cualquiera de las
- 35

reivindicaciones 14 o 15, o la célula según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 para la producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano.

24. Método de producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano que comprende:

- 5
- a. cultivar la célula según las reivindicaciones 16 a 22;
  - b. aislar y purificar el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano producido por la célula del paso (a).

10 25. Poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano que consiste en un polímero lineal de glucosas unidas por enlaces  $\beta$ 1,3 y  $\beta$ 1,4 alternantes donde la relación de enlaces  $\beta$ 1,3: $\beta$ 1,4 es 1:1.

15 26. Uso del ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, la construcción genética según la reivindicación 13, el vector según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, o la célula según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 para la producción de laminaribiosa.

27. Método de producción de laminaribiosa que comprende:

- 20
- a. cultivar la célula según las reivindicaciones 16 a 22;
  - b. aislar y purificar el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano producido por la célula del paso (a) y según la reivindicación 25;
  - c. Digerir el poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano con lichenasa y purificar el producto resultante.

DIBUJOS

FIG. 1

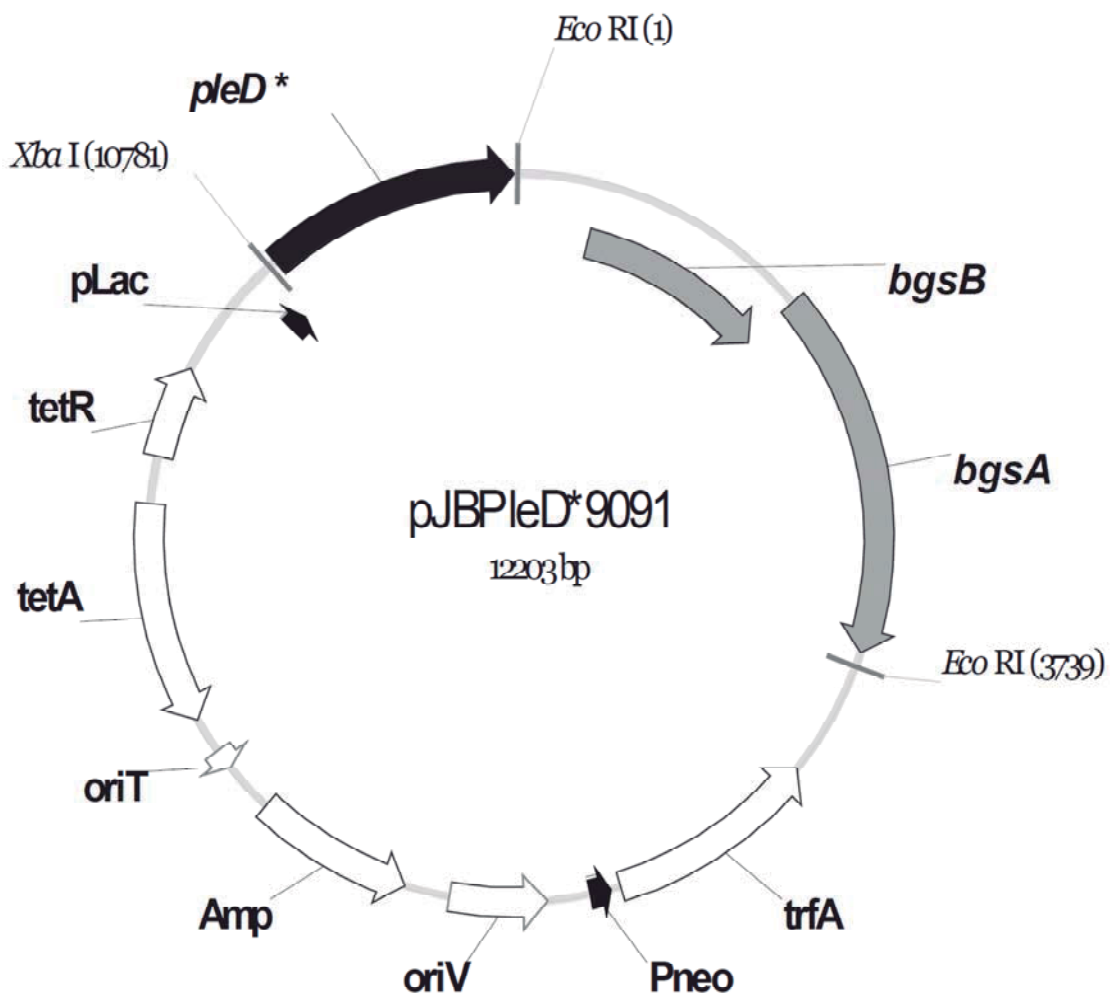


FIG. 2

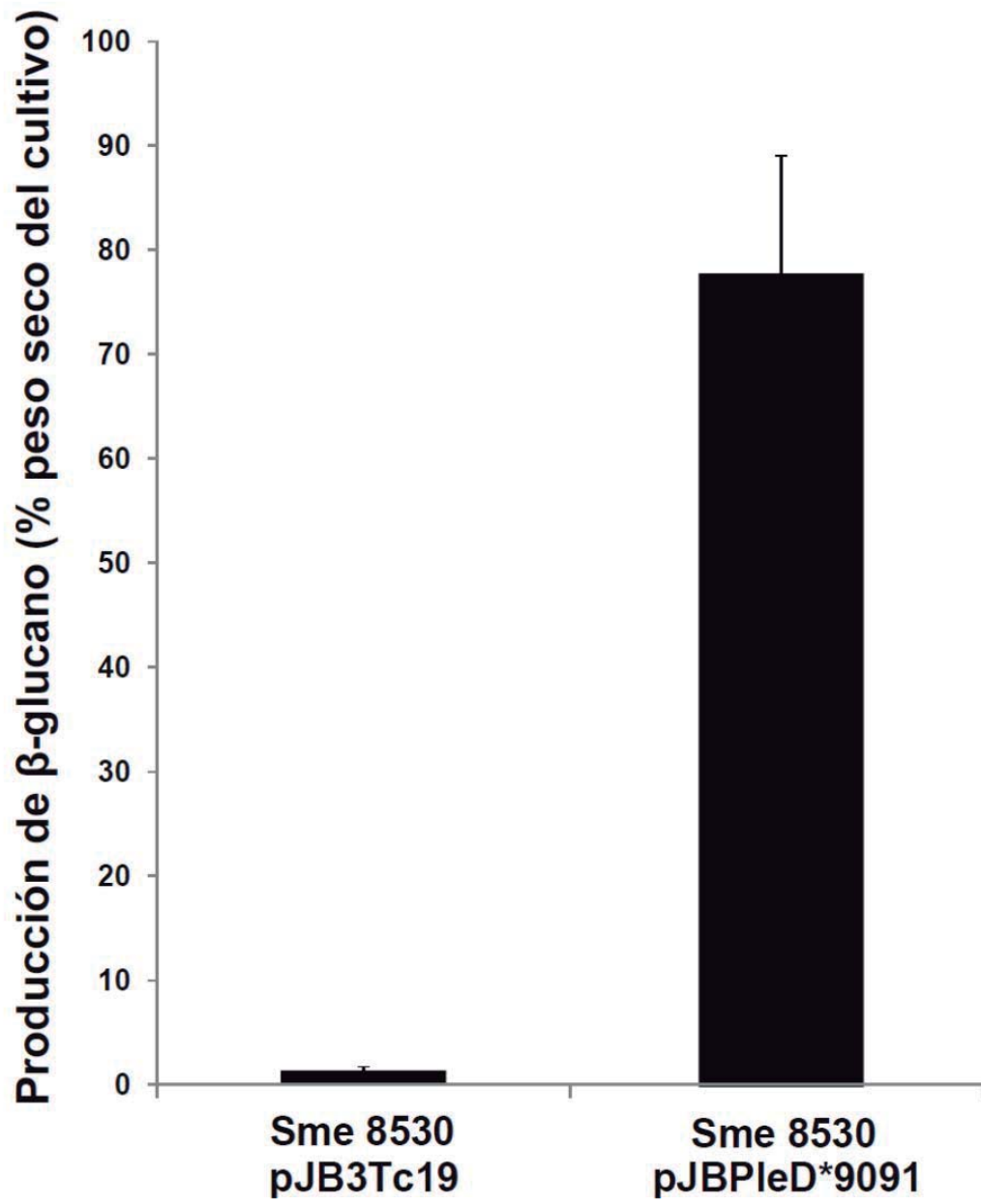




FIG. 3 A

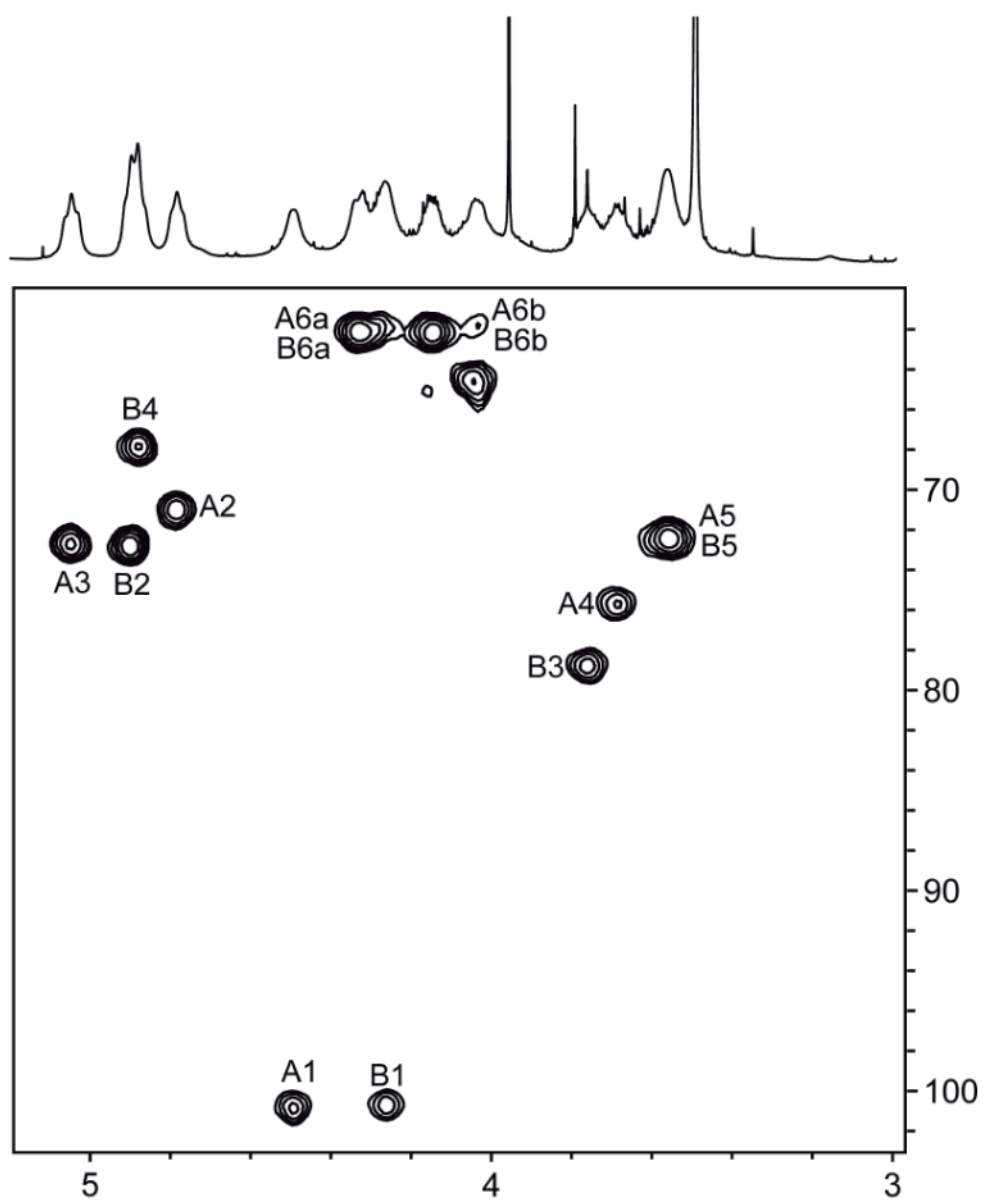


FIG. 3 B

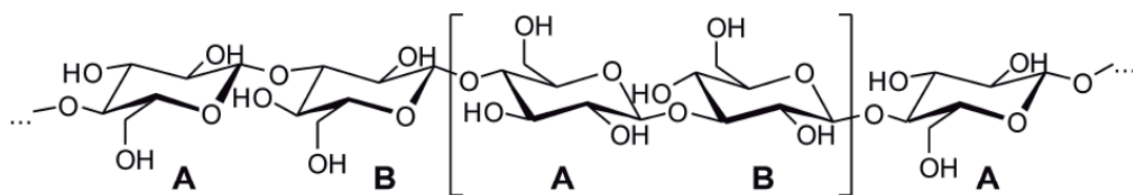
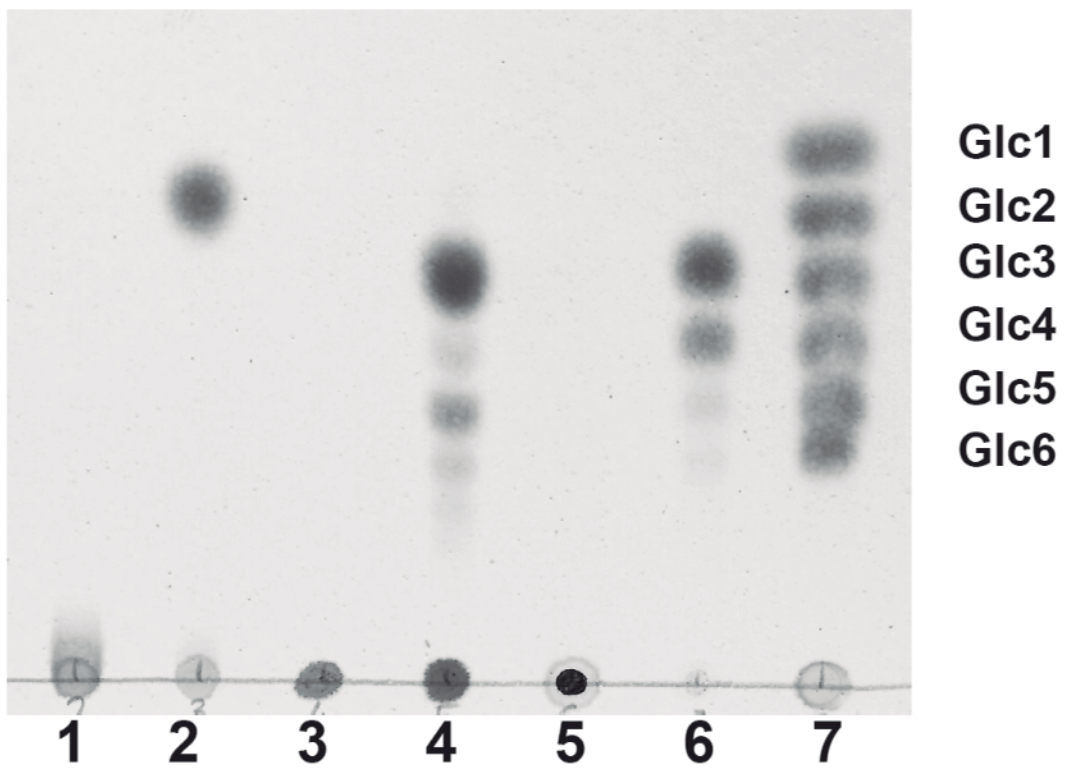


FIG. 4



## RESUMEN

### **Método para la producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano**

- 5 La presente invención se refiere a un ácido nucleico recombinante que comprende los genes *pleD\**, *bgsB* y *bgsA*. También se refiere a una construcción genética, vector y una célula que lo comprende. Además, se refiere al uso de los mismos para la producción de poli- $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-D-glucano y de laminaribiosa, así como los métodos para producir los mismos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)  
 Universidad de Sevilla

<120> Método para la producción de poli-beta 1,3-beta 1,4-D-glucano

<130> ES1641.952

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 1362  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> pl eD\*

<400> 1  
 atgagcggcc ggatcctcgt cgtcgacgac atcgaggcca atgtccgcct gcttgaggcc 60  
 aagctgacgg ccgagtacta ttaggtctcc accgcatgg acgggcccgc ggcctggct 120  
 atggccgagc gcgatctgcc cgacatcatt ctgctggacg tcatgatgcc cggcatggac 180  
 ggcttcaccg tctgccgtaa gctgaaggac gatccgacta cccgccacat cccggtggtg 240  
 ctgatcaccg cgctcgacgg gcgtggcgac cgcatccagg gcctggaatc gggcgcttcg 300  
 gacttcctga ccaagccgat cgacgacgtc atgctgttcg cccgcgtgcg cagcctgacc 360  
 cgcttcaagc tggatgatga cgaactgcgt cagcgcgagg cctcgggccc ccgcatgggc 420  
 gtgatcgccg gcgcccgcgc gcgcctggac ggtctggggc gtcgggtgct gatcgtcgac 480  
 gacaacgaac gccaggctca acgcgtcgcc gccgagctgg gcgtcgaaca ccgcccgggtg 540  
 atcgagagcg accctgagaa ggccaagatc agcgcgggag gtcgggtcga cctggtcatc 600  
 gtcaacgctg cggccaagaa cttcgatggc ctgctgctca ccgccgcgct gcggtccgag 660  
 gaacgcaccc gccagttgcc cgtgctggcc atggtcgatc ccgatgatcg tggccgatg 720  
 gtcaaggcgc tggagatcgg cgtgaacgac atcctgtcgc gcccgatcga tccgcaggaa 780  
 ctgtccgcgc gcgtcaagac gcagatccag cgcaagcgt aactgacta tctgcgcaac 840  
 aatctggatc actcgctgga gctggccgtc accgaccagc tgaccggcct gcacaatcgc 900  
 cgctacatga ccggtcagct cgactcgctg gtcaagcgcg cgacactggg cggcgatccg 960  
 gtttcggccc tgctgatcga catcgatttc ttcaagaaaa tcaacgacac cttcggtcac 1020  
 gatatcggcg acgaggtgct gcgaggttc gccttgctgc tggcctcgaa cgtccgcgcc 1080  
 attgatctgc cttgccgcta tggcggggaa gagttcgtgg tgatcatgcc cgacaccgcc 1140  
 ctggctgacg ccctgcgat cggcgagcgg atccggatgc atgtctccgg ctcgcccttc 1200  
 acggtcggcc atggccgcga aatgctgaac gtcaccatct cgatcggcgt ctcggccacg 1260  
 gcgggagcgg gcgacacgcc cgaagccctg ctcaagcgcg ccgacgaagg cgtttatcag 1320  
 gccaaggcct cgggtcggaa cgcggtggtc ggcaaggccc cc 1362

<210> 2  
<211> 1230  
<212> DNA  
<213> Si norhi zobi um mel i l oti

<400> 2  
atgatcctca atcatcggct cacgcgtatt accgtcggca tcctcctcct ggcgcttgca 60  
attgccgtcc tgctgcccgg attgactggc tacagcagcc tggatgggac ggtaaacgca 120  
cgccttgccg tcataaatgc gccgatcgac ggcgagatcg agaagccggc gcctcgaatc 180  
ggaacgccgg tggcagaggg tgaacgctc gcgacgatcc gtaaccagcg ggtcaacagg 240  
gcgatcctgg cgtcgtgctg caccgatcat cgaaccgccg tcgagcgcgt cgcggcgctg 300  
cggcgggagc gggatgaact cgcgcgattg cgggatgatc ttgccgggcg gctcgacatc 360  
ttcaggaacg cgaccatcgc cagcctggag cgcgaggtcc agatcctgca gaaaagggtc 420  
gagggtgctgc gcgcgcagga cgtcgtggca agggttgacc tcgtccggcg gcaggacctg 480  
gagccaagg ggatcttcac ccgcaagatg gtggaggcgg cgcaagccgc cgggtcggcc 540  
gccggcggcg agctcgagat cagcaatttg acgggtggagt tgctgcagca acgcctcaac 600  
gccgtgcgtc aggggatatt cctcgtcggc gacggccaga acgacgtgcc ttactcccgg 660  
cagcggcagg acgaggtgat cgttcgcatc cacgatctca atacgcgaat cgcggagaat 720  
gaggcacggg caaacagac ggaccagcag atagccgagg aggagaggcg ggttctaagt 780  
ctcgaagccg cgacgatccc gtcgcccttc gatggcgtcg tgtggagccg taacgtcatt 840  
agcggttcca atgtcgttct gaacaacgag atgatgcgca tcctcgattg ccgcgagttg 900  
ttcgtcgata ttctggtccc tgaagtcgat tatgacgaga tctatcccgg ccgcgaggcg 960  
gagggtccggc ttttcggtcg cggcgtatgt ttccggggcc gcgtacaggc ggtcaagggg 1020  
tcgtccgagg tcgtggaaaa ggactcgtg gcggccaacg agccggagac ggaggagcga 1080  
aatgcccgca tccgcgtcac gctcgtccg tcggcactca acaccgattt tgcgaatttc 1140  
tgtcaggttg ggcgaacggc gcaggttcgt ttctccaagc gcagccttca cctggcgcag 1200  
tgggttcaaa gcttgtggtt cagtctcttc 1230

<210> 3  
<211> 1992  
<212> DNA  
<213> Si norhi zobi um mel i l oti

<400> 3  
gtggttcagt ctcttctagc gctggcgccg accttaatcg tcatgcctt ttttctcctc 60  
ggcccgttca actggctcgc ccacaggagc tggctcgcgc ccgttacctg cgcgttcgctc 120  
gctgccatcg cgctgcgtta catgctctgg cgcttcacag aaaccgtgct tccctatccg 180  
aacgacggcc ccaatttcta ttgggtctgg ttcgtgttca tcgtcgagtt cctcgccttt 240  
tcggaggtcg tgctcttctc catcctgatg agccgctacg tcgaccgcag cgccgagggg 300  
aatcggctcg agcggcagtt ttttgagcgc gatgaacggg agctccccac ggtcgcgctc 360  
ttcatcccga cctataacga gcctctcgac gttctcgaac gcacgatcgt cggggcgctt 420

gcgctcgacc atccaagga caagctgaat gtctatgtgc tcgacgacgg ccggcgcgac 480  
 tggctcagga ccttctgcga ggggcgcggt gcgatccatg tgacgcgcag cgacaacgcg 540  
 catgccaagg ccggcaacat gaacaacggt ttgcgcgtca gttcaggcga tttcatcgcc 600  
 gtcttcgatg ccgatttcgt accctatcgc agtttctcc ggcgcacctt gcccttcttc 660  
 atggacgaca cgatcggcat cgtgcagaca ccgcagcact tcttcaacgt cgatccgatc 720  
 cagtccaatc tcggactgga gaacctatgg cccgatgagc agcgcctggt tttcgacgag 780  
 atcgcgccga gccgcgacgg ctgggacgtg agcttctgct gcggctcctg ttcgatcgca 840  
 aggcgcaagg cggtagacgc catcggcgggt tttccaaccg agtcgatcac cgaggatcta 900  
 ctgacgacgc tgtcgatgct caacaggggg ttcaagacgc gttatctcaa cgagcggcctt 960  
 tcgatggggc tggcggccga gaatctcacc ggctatctcg tccagcgcga gcgctggtgc 1020  
 caaggcggta tccagacgct ctacctgcac aacggcccct tgcgcggggc cggcctctcg 1080  
 ctctttcagc gcgtcatggt cctgccgatg tcgtggctcg tgcaatatct ggtccgtttc 1140  
 atcgtgcttc tcattcctat cgtctatctg tggttcggcg ccctgccgct ctacttcacg 1200  
 gatgtcgccg actacgtctc gaaccagggt cccctgctgg cggcctatct cctgctgatg 1260  
 ttctggctca cgccgacgcg ctaccttcg ctggcttcca ccgccgctcg taccttctcg 1320  
 accttccgca tgctgccaac cgtcctgtcg agcctcgtca ggcccttcgg caagcccttc 1380  
 aaggtgacc cgaagggcag cagcaacgag gcaaacgtct tcgacgccta taccttcacc 1440  
 tggatcgccg gcttcatcgt ggttacggcg ttgggactcc tgatcaacat cgttccggag 1500  
 acggcgcggg tagaggggtc gttctcggcg atcgcggcgc tttggtcggg catcaacatc 1560  
 gtggtgctga tcatcgcctc gcttatctgc ttcgagaagc cgcggcgcct gctgcaggcg 1620  
 ttcaagctcg acgagccggt ggatgtggac ggtgtcgaag gccggctcgt gagcctctca 1680  
 cttgataagg cgggtggtggc ggtttcgacg gaaacgcggt tcaaatcgac caaggtcaga 1740  
 ctgaacatcg aaggcttcgc gccgctcgaa gcggatctga agcaggtgac acagcggcgc 1800  
 ggggacatca cgcgcaccgg cgacaagcag cgttactacc ttcatcttca ctacgacctg 1860  
 cgtggagtcg agcgggacaa gatgatcatc aagctctaca ccgggcgcta ttcccgggac 1920  
 gttcccgata tcgacaagat cgccgtttcc gtaaatttgc tgttgccgcg tttcggctcg 1980  
 acgcaaccg cc 1992

<210> 4  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> Secuenci a arti fi ci al

<220>  
 <223> pl eD\*

<400> 4

Met Ser Ala Arg Ile Leu Val Val Asp Asp Ile Glu Ala Asn Val Arg  
 1 5 10 15

Leu Leu Glu Ala Lys Leu Thr Ala Glu Tyr Tyr Glu Val Ser Thr Ala  
20 25 30

Met Asp Gly Pro Thr Ala Leu Ala Met Ala Ala Arg Asp Leu Pro Asp  
35 40 45

Ile Ile Leu Leu Asp Val Met Met Pro Gly Met Asp Gly Phe Thr Val  
50 55 60

Cys Arg Lys Leu Lys Asp Asp Pro Thr Thr Arg His Ile Pro Val Val  
65 70 75 80

Leu Ile Thr Ala Leu Asp Gly Arg Gly Asp Arg Ile Gln Gly Leu Glu  
85 90 95

Ser Gly Ala Ser Asp Phe Leu Thr Lys Pro Ile Asp Asp Val Met Leu  
100 105 110

Phe Ala Arg Val Arg Ser Leu Thr Arg Phe Lys Leu Val Ile Asp Glu  
115 120 125

Leu Arg Gln Arg Glu Ala Ser Gly Arg Arg Met Gly Val Ile Ala Gly  
130 135 140

Ala Ala Ala Arg Leu Asp Gly Leu Gly Gly Arg Val Leu Ile Val Asp  
145 150 155 160

Asp Asn Glu Arg Gln Ala Gln Arg Val Ala Ala Glu Leu Gly Val Glu  
165 170 175

His Arg Pro Val Ile Glu Ser Asp Pro Glu Lys Ala Lys Ile Ser Ala  
180 185 190

Gly Gly Pro Val Asp Leu Val Ile Val Asn Ala Ala Ala Lys Asn Phe  
195 200 205

Asp Gly Leu Arg Phe Thr Ala Ala Leu Arg Ser Glu Glu Arg Thr Arg  
210 215 220

Gln Leu Pro Val Leu Ala Met Val Asp Pro Asp Asp Arg Gly Arg Met  
225 230 235 240

Val Lys Ala Leu Glu Ile Gly Val Asn Asp Ile Leu Ser Arg Pro Ile  
245 250 255

Asp Pro Gln Glu Leu Ser Ala Arg Val Lys Thr Gln Ile Gln Arg Lys  
260 265 270

Arg Tyr Thr Asp Tyr Leu Arg Asn Asn Leu Asp His Ser Leu Glu Leu  
275 280 285

Ala Val Thr Asp Gln Leu Thr Gly Leu His Asn Arg Arg Tyr Met Thr

290

295

300

Gly 305 Gln Leu Asp Ser Leu 310 Val Lys Arg Ala Thr 315 Leu Gly Gly Asp Pro 320

Val Ser Ala Leu 325 Leu Ile Asp Ile Asp Phe 330 Phe Lys Lys Ile Asn 335 Asp

Thr Phe Gly His 340 Asp Ile Gly Asp Glu 345 Val Leu Arg Glu Phe 350 Ala Leu

Arg Leu Ala 355 Ser Asn Val Arg Ala 360 Ile Asp Leu Pro Cys 365 Arg Tyr Gly

Gly Glu 370 Glu Phe Val Val Ile 375 Met Pro Asp Thr Ala 380 Leu Ala Asp Ala

Leu 385 Arg Ile Ala Glu Arg 390 Ile Arg Met His Val 395 Ser Gly Ser Pro Phe 400

Thr Val Ala His 405 Gly Arg Glu Met Leu Asn 410 Val Thr Ile Ser Ile 415 Gly

Val Ser Ala Thr 420 Ala Gly Glu Gly Asp 425 Thr Pro Glu Ala 430 Leu Leu Lys

Arg Ala Asp 435 Glu Gly Val Tyr Gln 440 Ala Lys Ala Ser Gly 445 Arg Asn Ala

Val Val Gly Lys Ala Ala 450

<210> 5  
<211> 410  
<212> PRT  
<213> Sinorhizobium meliloti

<400> 5

Met 1 Ile Leu Asn 5 His Arg Leu Thr Arg 10 Ile Thr Val Gly 15 Ile Leu Leu

Leu Ala Leu 20 Ala Ile Ala Val Leu 25 Leu Pro Gly Leu Thr Gly 30 Tyr Ser

Ser Leu 35 Asp Gly Thr Val Asn 40 Ala Arg Leu Ala Val 45 Ile Asn Ala Pro

Ile 50 Asp Gly Glu Ile Glu 55 Lys Pro Ala Pro Arg 60 Ile Gly Thr Pro Val

Ala 65 Glu Gly Glu Thr 70 Leu Ala Thr Ile Arg 75 Asn Gln Arg Val 80 Asn Arg



Ala Ile Leu Ala Ser 85 Leu Arg Thr Asp His 90 Arg Thr Ala Val Glu Arg 95

Val Ala Ala Leu 100 Arg Arg Glu Arg Asp 105 Glu Leu Ala Arg Leu Arg Asp 110

Asp Leu Ala 115 Gly Arg Leu Asp Ile 120 Phe Arg Asn Ala Thr Ile Ala Ser 125

Leu Glu Arg Glu Val Gln Ile 135 Leu Gln Lys Arg Val 140 Glu Val Ser Arg

Ala Gln Asp Val Val Ala 150 Arg Val Asp Leu Val 155 Arg Arg Gln Asp Leu 160

Glu Ser Lys Gly Ile 165 Phe Thr Arg Lys Met 170 Val Glu Ala Ala Gln Ala 175

Ala Gly Ala Ala 180 Ala Gly Gly Glu Leu 185 Glu Ile Ser Asn Leu Thr Val 190

Glu Leu Leu 195 Gln Gln Arg Leu Asn 200 Ala Val Arg Gln Gly Ile Phe Leu 205

Val Gly Asp Gly Gln Asn Asp 215 Val Pro Tyr Ser Arg 220 Gln Arg Gln Asp

Glu Val Ile Val Arg Ile His Asp Leu Asn Thr Arg Ile Ala Glu Asn 225 230 235 240

Glu Ala Arg Ala Lys 245 Gln Thr Asp Gln Gln Ile Ala Glu Glu Glu Arg 250 255

Arg Val Leu Ser 260 Leu Glu Ala Ala Thr Ile Pro Ser Pro Phe Asp Gly 265 270

Val Val Trp Ser Arg Asn Val Ile Ser Gly Ser Asn Val Val Leu Asn 275 280 285

Asn Glu Met Met Arg Ile Leu Asp Cys Arg Glu Leu Phe Val Asp Ile 290 295 300

Leu Val Pro Glu Val Asp Tyr Asp Glu Ile Tyr Pro Gly Arg Glu Ala 305 310 315 320

Glu Val Arg Leu Phe Gly Arg Gly Asp Val Phe Arg Gly Arg Val Gln 325 330 335

Ala Val Lys Gly Ser Ser Ala Val Val Glu Lys Asp Ser Leu Ala Ala 340 345 350

Asn Glu Pro Glu Thr Glu Glu Arg Asn Ala Arg Ile Arg Val Thr Leu  
355 360 365

Ala Pro Ser Ala Leu Asn Thr Asp Phe Ala Asn Phe Cys Gln Val Gly  
370 375 380

Arg Thr Ala Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Ser Leu His Leu Ala Gln  
385 390 395 400

Trp Val Gln Ser Leu Trp Phe Ser Leu Phe  
405 410

<210> 6

<211> 664

<212> PRT

<213> Sinorhizobium meliloti

<400> 6

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

Phe Phe Leu Leu Gly Pro Phe Asn Trp Ser Arg His Arg Ser Trp Ser  
20 25 30

Arg Ala Val Thr Cys Ala Phe Val Ala Ala Ile Ala Leu Arg Tyr Met  
35 40 45

Leu Trp Arg Phe Thr Glu Thr Val Leu Pro Tyr Pro Asn Asp Gly Pro  
50 55 60

Asn Phe Tyr Trp Val Trp Phe Val Phe Ile Val Glu Phe Leu Ala Phe  
65 70 75 80

Ser Glu Val Val Leu Phe Leu Ile Leu Met Ser Arg Tyr Val Asp Arg  
85 90 95

Ser Ala Glu Gly Asn Arg Leu Glu Arg Gln Phe Phe Glu Arg Asp Glu  
100 105 110

Arg Glu Leu Pro Thr Val Asp Val Phe Ile Pro Thr Tyr Asn Glu Pro  
115 120 125

Leu Asp Val Leu Glu Arg Thr Ile Val Gly Ala Leu Ala Leu Asp His  
130 135 140

Pro Lys Asp Lys Leu Asn Val Tyr Val Leu Asp Asp Gly Arg Arg Asp  
145 150 155 160

Trp Leu Arg Thr Phe Cys Glu Gly Arg Gly Ala Ile His Val Thr Arg  
165 170 175

Ser Asp Asn Ala His Ala Lys Ala Gly Asn Met Asn Asn Gly Leu Arg  
180 185 190

Val Ser Ser Gly Asp Phe Ile Ala Val Phe Asp Ala Asp Phe Val Pro  
 195 200 205

Tyr Arg Ser Phe Leu Arg Arg Thr Leu Pro Phe Phe Met Asp Asp Thr  
 210 215 220

Ile Gly Ile Val Gln Thr Pro Gln His Phe Phe Asn Val Asp Pro Ile  
 225 230 235 240

Gln Ser Asn Leu Gly Leu Glu Asn Leu Trp Pro Asp Glu Gln Arg Leu  
 245 250 255

Phe Phe Asp Glu Ile Ala Pro Ser Arg Asp Gly Trp Asp Val Ser Phe  
 260 265 270

Cys Cys Gly Ser Cys Ser Ile Ala Arg Arg Lys Ala Val Asp Ala Ile  
 275 280 285

Gly Gly Phe Pro Thr Glu Ser Ile Thr Glu Asp Leu Leu Thr Thr Leu  
 290 295 300

Ser Met Leu Asn Arg Gly Phe Lys Thr Arg Tyr Leu Asn Glu Arg Leu  
 305 310 315 320

Ser Met Gly Leu Ala Ala Glu Asn Leu Thr Gly Tyr Phe Val Gln Arg  
 325 330 335

Glu Arg Trp Cys Gln Gly Gly Ile Gln Thr Leu Tyr Leu His Asn Gly  
 340 345 350

Pro Leu Arg Gly Pro Gly Leu Ser Leu Phe Gln Arg Val Met Phe Leu  
 355 360 365

Pro Met Ser Trp Leu Val Gln Tyr Leu Val Arg Phe Ile Val Leu Leu  
 370 375 380

Ile Pro Ile Val Tyr Leu Trp Phe Gly Ala Leu Pro Leu Tyr Phe Thr  
 385 390 395 400

Asp Val Ala Asp Tyr Val Ser Asn Gln Val Pro Leu Leu Ala Ala Tyr  
 405 410 415

Phe Leu Leu Met Phe Trp Leu Thr Pro Thr Arg Tyr Leu Pro Leu Val  
 420 425 430

Ser Thr Ala Val Gly Thr Phe Ser Thr Phe Arg Met Leu Pro Thr Val  
 435 440 445

Leu Ser Ser Leu Val Arg Pro Phe Gly Lys Pro Phe Lys Val Thr Pro  
 450 455 460

Lys Gly Ser Ser Asn Glu Ala Asn Val Phe Asp Ala Tyr Thr Phe Thr  
465 470 475 480

Trp Ile Ala Gly Phe Ile Val Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ile Asn  
485 490 495

Ile Val Pro Glu Thr Ala Arg Val Glu Gly Ser Phe Ser Ala Ile Ala  
500 505 510

Ala Leu Trp Ser Gly Ile Asn Ile Val Val Leu Ile Ile Ala Ser Leu  
515 520 525

Ile Cys Phe Glu Lys Pro Arg Arg Leu Leu Gln Ala Phe Lys Leu Asp  
530 535 540

Glu Pro Val Asp Val Asp Gly Val Glu Gly Arg Leu Val Ser Leu Ser  
545 550 555 560

Leu Asp Lys Ala Val Val Ala Val Ser Thr Glu Thr Arg Phe Lys Ser  
565 570 575

Thr Lys Val Arg Leu Asn Ile Glu Gly Phe Ala Pro Leu Glu Ala Asp  
580 585 590

Leu Lys Gln Val Thr Gln Arg Arg Gly Asp Ile Thr Arg Thr Gly Asp  
595 600 605

Lys Gln Arg Tyr Tyr Leu His Leu His Tyr Asp Leu Arg Gly Val Glu  
610 615 620

Arg Asp Lys Met Ile Ile Lys Leu Tyr Thr Gly Arg Tyr Ser Arg Asp  
625 630 635 640

Val Pro Asp Ile Asp Lys Ile Ala Val Ser Val Asn Leu Leu Leu Arg  
645 650 655

Ala Phe Gly Arg Thr Arg Thr Ala  
660

<210> 7

<211> 5044

<212> DNA

<213> Secuenci a arti fi ci al

<220>

<223> pl eD\*-bsgB-bsgA

<400> 7

atgagcgcgcc ggatcctcgt cgtcgacgac atcgaggcca atgtccgcct gcttgaggcc 60

aagctgacgg ccgagtacta tgaggtctcc accgcatgg acgggcccac gcccttgct 120

atggccgcgc gcatctgcc cgacatcatt ctgctggacg tcatgatgcc cggcatggac 180

ggcttcaccg tctgccgtaa gctgaaggac gatccgacta cccgccacat cccggtggtg 240

ctgatcaccg	cgctcgacgg	gcgtggcgac	cgcatccagg	gcctggaatc	gggcgcttcg	300
gacttcctga	ccaagccgat	cgacgacgtc	atgctgttcg	cccgcgtgcg	cagcctgacc	360
cgcttcaagc	tggatgatcga	cgaactgcgt	cagcgcgagg	cctcgggccg	ccgcatgggc	420
gtgatcgccg	gcgccgccgc	gcgcctggac	ggtctggggc	gtcgggtgct	gatcgtcgac	480
gacaacgaac	gccaggctca	acgcgtcgcc	gccgagctgg	gcgtcgaaca	ccgcccgggtg	540
atcgagagcg	accctgagaa	ggccaagatc	agcgccggcg	gtccggtcga	cctgggtcatc	600
gtcaacgctg	cggccaagaa	cttcgatggc	ctgcgcttca	ccgccgcgct	gcggtccgag	660
gaacgcaccc	gccagttgcc	cgtgctggcc	atggtcgatc	ccgatgatcg	tggccgcatg	720
gtcaaggcgc	tggagatcgg	cgtgaacgac	atcctgtcgc	gcccgatcga	tccgcaggaa	780
ctgtccgcgc	gcgtcaagac	gcagatccag	cgcaagcgt	acactgacta	tctgcgcaac	840
aatctggatc	actcgctgga	gctggccgtc	accgaccagc	tgaccggcct	gcacaatcgc	900
cgctacatga	ccggtcagct	cgactcgctg	gtcaagcgcg	cgacactggg	cggcgatccg	960
gtttcggccc	tgctgatcga	catcgatttc	ttcaagaaaa	tcaacgacac	cttcggtcac	1020
gatatcggcg	acgaggtgct	gcgcgagttc	gccttgcgtc	tggcctcgaa	cgtccgcgcc	1080
attgatctgc	cttgccgcta	tggcggggaa	gagttcgtgg	tgatcatgcc	cgacaccgcc	1140
ctggctgacg	ccctgcgcat	cgccgagcgg	atccggatgc	atgtctccgg	ctcgccttc	1200
acggtcggcc	atggccgcga	aatgctgaac	gtcaccatct	cgatcggcgt	ctcggccacg	1260
gcgggagcgg	gcgacacgcc	cgaagccctg	ctcaagcgcg	ccgacgaagg	cgtttatcag	1320
gccaaggcct	cgggtcggaa	cgcggtggtc	ggcaaggccg	cccatcacca	tcaccatcac	1380
tgaattcgcc	cttgtcccat	ttctatctcc	ctcgttcgtg	aaagatggcg	atccaggcga	1440
cccgtccctt	gccaggggaa	agttcagcgg	ccttccgacc	tatcgagaaa	aaatgtcgac	1500
gcgctatcct	taaaccttag	agcgggatga	ggaaaaatgt	gtgcggtttt	ccgcccgcac	1560
cccgcgtctc	aacttcttgg	aatcgatcac	gttcatgctt	tcaggtcgac	ccgacctaa	1620
agcatcgtga	tctagagtaa	tgcggggact	ctcgttcacc	cgccgagggt	ttgvcagtt	1680
caccaccgaa	acatgcaaat	ttgagggttg	ttcaacacag	aataccattc	aatcgtgacg	1740
aaacgcggcg	aagcggctcg	agtccggggc	tagcgtcgca	gaatagttgc	ggcagcgtat	1800
cagccgaacc	ggctgtcctc	agtgagtaat	tggacatgat	cctcaatcat	cggctcacgc	1860
gtattaccgt	cggcatcctc	ctcctggcgc	ttgcaattgc	cgctcctgctg	cccggattga	1920
ctggctacag	cagcctggat	gggacggtaa	acgcacgcct	tgccgtcata	aatgcgccga	1980
tcgacggcga	gatcgagaag	ccggcgcctc	gaatcggaac	gccggtggca	gagggtgaaa	2040
cgctcgcgac	gatccgtaac	cagcgggtca	acagggcgat	cctggcgtcg	ctgcgcaccg	2100
atcatcgaac	cgccgtcgag	cgcgtcgcgg	cgctcggggc	ggagcgggat	gaactcgcgc	2160
gattgcggga	tgatcttgcc	gggvcggctcg	acatcttcag	gaacgcgacc	atcggcagcc	2220
tggagcgcga	ggtccagatc	ctgcagaaaa	gggtcgaggt	gtcgcgcgcg	caggacgtcg	2280

tggcaaggg	tgacctcgtc	cggcggcagg	acctggagtc	caaggggatc	ttcacccgca	2340
agatggtgga	ggcggcgcaa	gccgccggtg	cggccgccgg	cggcgagctc	gagatcagca	2400
atttgacgg	ggagttgctg	cagcaacgcc	tcaacgccgt	gcgtcagggg	atattcctcg	2460
tcggcgacgg	ccagaacgac	gtgccttact	cccggcagcg	ccaggacgag	gtgatcgttc	2520
gcatccacga	tctcaatacg	cgaatcgcgg	agaatgaggc	acgggcaaaa	cagacggacc	2580
agcagatagc	cgaggaggag	aggcgggttc	taagtctcga	agccgcgacg	atcccgtcgc	2640
ccttcgatgg	cgtcgtgtgg	agccgtaacg	tcattagcgg	ttccaatgtc	gttctgaaca	2700
acgagatgat	gcgcatcctc	gattgccgcg	agttgttcgt	cgatattctg	gtccctgaag	2760
tcgattatga	cgagatctat	cccggccgcg	aggcggaggt	ccggcttttc	ggtcgcggcg	2820
atgtgttccg	gggccgcgta	caggcgggtca	agggatcgtc	cgcggtcgtg	gaaaaggact	2880
cgctggcggc	caacgagccg	gagacggagg	agcgaaatgc	ccgcatccgc	gtcacgctcg	2940
ctccgtcggc	actcaacacc	gattttgcga	atttctgtca	ggttgggcca	acggcgcagg	3000
ttcgtttctc	caagcgcagc	cttcacctgg	cgcagtgggt	tcaaagcttg	tggttcagtc	3060
tcttctagcg	ctggcgccga	ccttaatcgt	catcgccttt	tttctcctcg	gcccgttcaa	3120
ctggtcgcgc	cacaggagct	ggtcgcgcgc	cgttacctgc	gcgttcgctg	ctgccatcgc	3180
gctgcgttac	atgctctggc	gcttcacaga	aaccgtgctt	ccctatccga	acgacggccc	3240
caatttctat	tgggtctggt	tcgtgttcat	cgtcgagttc	ctcgcctttt	cggaggtcgt	3300
gctcttctc	atcctgatga	gccgctacgt	cgaccgcagc	gccgagggga	atcggctcga	3360
gcggcagttt	tttgagcgcg	atgaacggga	gctccccacg	gtcgacgtct	tcatcccgac	3420
ctataacgag	cctctcgacg	ttctcgaacg	cacgatcgtc	ggggcgcttg	cgctcgacca	3480
tccaaggac	aagctgaatg	tctatgtgct	cgacgacggc	cggcgcgact	ggctcaggac	3540
cttctgcgag	gggcgcgggtg	cgatccatgt	gacgcgcagc	gacaacgcgc	atgccaaggc	3600
cggcaacatg	aacaacggtt	tgcgcgtcag	ttcaggcgat	ttcatcgccg	tcttcgatgc	3660
cgatttcgta	ccctatcgca	gtttctccg	gcgcaccttg	cccttcttca	tggacgacac	3720
gatcggcatc	gtgcagacac	cgcagcactt	cttcaacgtc	gatccgatcc	agtccaatct	3780
cggactggag	aacctatggc	ccgatgagca	gcgcctgttt	ttcgacgaga	tcgcgccgag	3840
ccgcgacggc	tgggacgtga	gcttctgctg	cggctcctgt	tcgatcgcaa	ggcgcaaggc	3900
ggtagacgcc	atcggcgggtt	ttccaaccga	gtcgatcacc	gaggatctac	tgacgacgct	3960
gtcgatgctc	aacagggggt	tcaagacgcg	ttatctcaac	gagcggcttt	cgatggggct	4020
ggcggccgag	aatctcaccg	gctatctcgt	ccagcgcgag	cgctggtgcc	aaggcggtat	4080
ccagacgctc	tacctgcaca	acggcccctt	gcgcgggccc	ggcctctcgc	tctttcagcg	4140
cgatcatgtt	ctgccgatgt	cgtggctcgt	gcaatatctg	gtccgtttca	tcgtgcttct	4200
cattcctatc	gtctatctgt	ggttcggcgc	cctgccgctc	tacttcacgg	atgtcgccga	4260
ctacgtctcg	aaccaggttc	ccctgctggc	ggcctatctc	ctgctgatgt	tctggctcac	4320
gccgacgcgc	taccttccgc	tggctctccac	cgccgtcggg	accttctcga	ccttccgcat	4380

gctgccaacc gtcctgtcga gcctcgtcag gcccttcggc aagcccttca aggtgacccc 4440  
gaagggcagc agcaacgagg caaacgtctt cgacgcctat accttcacct ggatcgccgg 4500  
cttcatcgtg gttacggcgt tgggactcct gatcaacatc gttccggaga cggcgcgggt 4560  
agaggggtcg ttctcggcga tcgcggcgct ttggtcgggc atcaacatcg tggtgctgat 4620  
catcgcctcg cttatctgct tcgagaagcc gcggcgcctg ctgcaggcgt tcaagctcga 4680  
cgagccggtg gatgtggacg gtgtcgaagg ccggctcgtg agcctctcac ttgataaggc 4740  
ggtggtggcg gtttcgacgg aaacgcggtt caaatcgacc aaggtcagac tgaacatcga 4800  
aggcttcgcg ccgctcgaag cggatctgaa gcaggtgaca cagcggcgcg gggacatcac 4860  
gcgaccggc gacaagcagc gttactacct tcattctcac tacgacctgc gtggagtcga 4920  
gcgggacaag atgatcatca agctctacac cgggcgctat tcccgggacg ttcccgatat 4980  
cgacaagatc gccgtttccg taaatttgct gttgcgcgct ttcggtcgca cgcaaccgc 5040  
ctga 5044

<210> 8  
<211> 123  
<212> DNA  
<213> Secuenci a arti fi ci al

<220>  
<223> pl ac

<400> 8  
gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat 60  
gcttccggct cgatgtttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 120  
cta 123

<210> 9  
<211> 5249  
<212> DNA  
<213> Secuenci a arti fi ci al

<220>  
<223> pl ac-pl eD\*-bsgB-bsgA

<400> 9  
gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat 60  
gcttccggct cgatgtttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 120  
ctatgacat gattacgcca agcttgcctg cctgcaggtc gactctagaa ataattttgt 180  
ttaactttaa gaaggagata tacatatgag cgcccggatc ctcgctcgtc acgacatcga 240  
ggccaatgtc cgcctgcttg aggccaagct gacggccgag tactatgagg tctccaccgc 300  
catggacggg ccgacggccc tggctatggc cgcgcgcgat ctgcccgaca tcattctgct 360  
ggacgtcatg atgcccggca tggacggctt caccgtctgc cgtaagctga aggacgatcc 420  
gactaccgc cacatcccgg tggtgctgat caccgcgctc gacgggcgtg gcgaccgcat 480  
ccagggcctg gaatcgggcg cttcggactt cctgaccaag ccgatcgacg acgtcatgct 540

gttcgcccgc	gtgcgagcc	tgacccgctt	caagctggtg	atcgacgaac	tgcgtcagcg	600
cgaggcctcg	ggccgccga	tggcggtgat	cgccggcgcc	gccgcgcgcc	tggacggtct	660
ggcggttcg	gtgctgatcg	tcgacgacaa	cgaacgccag	gctcaacgcg	tcgccgccga	720
gctgggctgc	gaacaccgcc	cggtgatcga	gagcgaccct	gagaaggcca	agatcagcgc	780
cgcggttccg	gtcgacctgg	tcatcgtcaa	cgctgcggcc	aagaacttcg	atggcctgcg	840
cttcaccgcc	gcgctgcggt	ccgaggaacg	cacccgccag	ttgcccgctgc	tggccatggt	900
cgatcccgat	gatcgtggcc	gcatggtcaa	ggcgtggag	atcggcgtga	acgacatcct	960
gtcgcgcccg	atcgatccgc	aggaactgtc	cgcgcgcgtc	aagacgcaga	tccagcgcaa	1020
gcgctacact	gactatctgc	gcaacaatct	ggatcactcg	ctggagctgg	ccgtcaccga	1080
ccagctgacc	ggcctgcaca	atcgccgcta	catgaccggt	cagctcgact	cgctggtcaa	1140
gcgcgcgaca	ctggcgggcg	atccggtttc	ggccctgctg	atcgacatcg	atttcttcaa	1200
gaaaatcaac	gacaccttcg	gtcacgatat	cgcgacgag	gtgctgcgcg	agttcgcctt	1260
gcgtctggcc	tcgaacgtcc	gcgccattga	tctgccttgc	cgctatggcg	gggaagagtt	1320
cgtggtgatc	atgcccgaca	ccgccctggc	tgacgccctg	cgcatcgccg	agcggatccg	1380
gatgcatgtc	tccggctcgc	ccttcacggt	cgcccatggc	cgcgaaatgc	tgaacgtcac	1440
catctcgatc	ggcgtctcgg	ccacggcggg	cgagggcgac	acgcccgaag	ccctgctcaa	1500
gcgcgccgac	gaaggcgttt	atcaggccaa	ggcctcgggt	cggaacgcgg	tggtcggcaa	1560
ggccgcccac	caccatcacc	atcactgaat	tcgcccttgt	cccatttcta	tctccctcgt	1620
tcgtgaaaga	tggcgatcca	ggcgaccggt	cccttgccag	gggaaagttc	agcggccttc	1680
cgacctatcg	cagaaaaatg	tcgacgcgct	atccttaaac	cttagagcgg	gatgaggaaa	1740
aatgtgtgcg	gttttccgcc	cgcaccccgc	gtctcaactt	cttggaatcg	atcacgttca	1800
tgctttcagg	tcgacccgac	ctaagagcat	cgtgatctag	agtaatgcgg	ggactctcgt	1860
tcacccgccg	aggttttgcg	cagttcacca	ccgaaacatg	caaatttgag	ggttgttcaa	1920
cacagaatac	cattcaatcg	tgacgaaacg	cgcggaagcg	gctcgagtcc	ggcgtagcgc	1980
tcgcagaata	gttgcggcag	cgtatcagcc	gaaccggctg	tcctcagtga	gtaattggac	2040
atgatcctca	atcatcggct	cacgcgtatt	accgtcggca	tcctcctcct	ggcgcttgca	2100
attgccgtcc	tgctgcccg	attgactggc	tacagcagcc	tggatgggac	ggtaaacgca	2160
cgctttgccg	tcataaatgc	gccgatcgac	ggcgagatcg	agaagccggc	gcctcgaatc	2220
ggaacgccgg	tggcagaggg	tgaacgctc	gcgacgatcc	gtaaccagcg	ggtcaacagg	2280
gcgatcctgg	cgctcgctgcg	caccgatcat	cgaaccgccg	tcgagcgcg	cgcggcgctg	2340
cgcggggagc	gggatgaact	cgcgcgattg	cgggatgatc	ttgccgggcg	gctcgacatc	2400
ttcaggaacg	cgaccatcgc	cagcctggag	cgcgaggctc	agatcctgca	gaaaagggtc	2460
gagggtgctgc	gcgcgagga	cgctcgtggca	agggttgacc	tcgtccggcg	gcaggacctg	2520
gagtccaagg	ggatcttcac	ccgcaagatg	gtggaggcgg	cgcaagccgc	cggtgcggcc	2580
gccggcggcg	agctcgagat	cagcaatttg	acgggtggagt	tgctgcagca	acgcctcaac	2640



gccgtgcgtc	aggggatatt	cctcgtcggc	gacggccaga	acgacgtgcc	ttactcccgg	2700
cagcgccagg	acgaggtgat	cgttcgcata	cacgatctca	atacgcgaat	cgcggagaat	2760
gaggcacggg	caaaacagac	ggaccagcag	atagccgagg	aggagaggcg	ggttctaagt	2820
ctcgaagccg	cgacgatccc	gtcgcccttc	gatggcgtcg	tgtggagccg	taacgtcatt	2880
agcggttcca	atgtcgttct	gaacaacgag	atgatgcgca	tcctcgattg	ccgcgagttg	2940
ttcgtcgata	ttctgggtccc	tgaagtcgat	tatgacgaga	tctatcccgg	ccgcgaggcg	3000
gaggtccggc	ttttcggtcg	cggcgatgtg	ttccggggcc	gcgtacaggc	ggtcaagggg	3060
tcgtccgcgg	tcgtggaaaa	ggactcgtcg	gcggccaacg	agccggagac	ggaggagcga	3120
aatgcccgca	tccgcgtcac	gctcgtcctc	tcggcactca	acaccgattt	tgcaaatctc	3180
tgtcaggttg	ggcgaacggc	gcaggttcgt	ttctccaagc	gcagccttca	cctggcgcag	3240
tgggttcaaa	gcttgtggtt	cagtctcttc	tagcgtggc	gccgacctta	atcgtcatcg	3300
cctttttct	cctcggcccg	ttcaactggt	cgcgccacag	gagctggtcg	cgcgccgtta	3360
cctgcgcgtt	cgtcgctgcc	atcgcgctgc	gttacctgct	ctggcgttcc	acagaaaccg	3420
tgcttcccta	tccgaacgac	ggccccaatt	tctattgggt	ctggttcgtg	ttcatcgtcg	3480
agttcctcgc	cttttcggag	gtcgtgctct	tcctcatcct	gatgagccgc	tacgtcgacc	3540
gcagcgccga	ggggaatcgg	ctcgagcggc	agttttttga	gcgcgatgaa	cgggagctcc	3600
ccacggtcga	cgcttctatc	ccgacctata	acgagcctct	cgacgttctc	gaacgcacga	3660
tcgtcggggc	gcttgcgctc	gaccatccca	aggacaagct	gaatgtctat	gtgctcgacg	3720
acggccggcg	cgactggctc	aggaccttct	gcgagggggc	cggtgcgatc	catgtgacgc	3780
gcagcgacaa	cgcgcatgcc	aaggccggca	acatgaacaa	cggtttgcgc	gtcagttcag	3840
gcgatttcat	cgccgtcttc	gatgccgatt	tcgtacccta	tcgcagtttc	ctccggcgca	3900
ccttgccctt	cttcatggac	gacacgatcg	gcatcgtgca	gacaccgag	cacttcttca	3960
acgtcgatcc	gatccagtcc	aatctcggac	tggagaacct	atggcccgat	gagcagcgcc	4020
tgttttcga	cgagatcgcg	ccgagccgcg	acggctggga	cgtgagcttc	tgctgcggct	4080
cctgttcgat	cgcaaggcgc	aaggcggtag	acgccatcgg	cggttttcca	accgagtcga	4140
tcaccgagga	tctactgacg	acgctgtcga	tgctcaacag	ggggttcaag	acgcgttatc	4200
tcaacgagcg	gctttcgatg	gggctggcgg	ccgagaatct	caccggctat	ttcgtccagc	4260
gcgagcgctg	gtccaaggc	ggtatccaga	cgctctacct	gcacaacggc	cccttgcgcg	4320
ggcccggcct	ctcgtctttt	cagcgcgtca	tgttcctgcc	gatgtcgtgg	ctcgtgcaat	4380
atctggtccg	tttcatcgtg	cttctcattc	ctatcgtcta	tctgtggttc	ggcgcctgc	4440
cgctctactt	cacggatgtc	gccgactacg	tctcgaacca	ggttcccctg	ctggcggcct	4500
atttctgct	gatgttctgg	ctcacgccga	cgcgctacct	tccgctggtc	tccaccgccg	4560
tcggtacctt	ctcgaccttc	cgcatgctgc	caaccgtcct	gtcgagcctc	gtcaggccct	4620
tcggcaagcc	cttcaaggtg	accccgaagg	gcagcagcaa	cgaggcaaac	gtcttcgacg	4680

cctatacctt cacctggatc gccggcttca tcgtggttac ggcgttggga ctcctgatca	4740
acatcgttcc ggagacggcg cgggtagagg ggtcgttctc ggcgatcgcg gcgctttggt	4800
cgggcatcaa catcgtgggtg ctgatcatcg cctcgcttat ctgcttcgag aagccgcggc	4860
gcctgctgca ggcgttcaag ctcgacgagc cggtgatgt ggacggtgtc gaaggccggc	4920
tcgtgagcct ctacttgat aaggcgggtg tggcggtttc gacggaaacg cggttcaaat	4980
cgaccaaggt cagactgaac atcgaaggct tcgcgccgct cgaagcggat ctgaagcagg	5040
tgacacagcg gcgcggggac atcacgcgca ccggcgacaa gcagcgttac taccttcac	5100
ttactacga cctgcgtgga gtcgagcggg acaagatgat catcaagctc tacaccgggc	5160
gctattcccg ggacgttccc gatatcgaca agatcgccgt ttccgtaa	5220
atcgtgttcg gcgctttcgg tcgcacgcga accgcctga	5249

<210> 10  
 <211> 12203  
 <212> DNA  
 <213> Secuenci a arti fi ci al

<220>  
 <223> Pl ásmi do pJBPI eD\*9091

<400> 10	
aattcgcctt tgtcccattt ctatctccct cgttcgtgaa agatggcgat ccaggcgacc	60
cgtcccttgc caggggaaag ttcagcggcc ttccgaccta tcgcagaaaa atgtcgacgc	120
gctatcctta aaccttagag cgggatgagg aaaaatgtgt gcggttttcc gcccgcatcc	180
cgcgtctcaa cttcttggaa tcgatcacgt tcatgctttc aggtcgacct gacctagag	240
catcgtgatc tagagtaatg cggggactct cgttcacccg ccgaggtttt gcgcagttca	300
ccaccgaaac atgcaaattt gagggttggt caacacagaa taccattcaa tcgtgacgaa	360
acgcggcgaa gcggctcgag tccgggcgta gcgtcgcaga atagttgcgg cagcgtatca	420
gccgaaccgg ctgtcctcag tgagtaattg gacatgatcc tcaatcatcg gctcacgcgt	480
attaccgtcg gcatcctcct cctggcgctt gcaattgccg tcctgctgcc cggattgact	540
ggctacagca gcctggatgg gacggtaaac gcacgccttg ccgtcataaa tgcgccgatc	600
gacggcgaga tcgagaagcc ggcgcctcga atcggaacgc cgggtggcaga gggtgaaacg	660
ctcgcgacga tccgtaacca gcgggtcaac agggcgatcc tggcgtcgct gcgcaccgat	720
catcgaaccg ccgtcgagcg cgtcgcggcg ctgcggcggg agcgggatga actcgcgcga	780
ttgcgggatg atcttgccgg gcggctcgac atcttcagga acgcgacctat cgcagcctg	840
gagcgcgagg tccagatcct gcagaaaagg gtcgaggtgt cgcgcgcgca ggacgtcgtg	900
gcaaggggtg acctcgtccg gcggcaggac ctggagtcca aggggatctt caccgcgaag	960
atggtggagg cggcgcaagc cgccgggtgc gccgccggcg gcgagctcga gatcagcaat	1020
ttgacggtgg agttgctgca gcaacgcctc aacgccgtgc gtcaggggat attcctcgtc	1080
ggcgacggcc agaacgacgt gccttactcc cggcagcgcc aggacgaggt gatcgttcgc	1140
atccacgatc tcaatacgcg aatcgcggag aatgaggcac gggcaaaaaca gacggaccag	1200

cagatagccg	aggaggagag	gcggttcta	agtctcgaag	ccgcgacgat	cccgtcgccc	1260
ttc gatggcg	tcgtgtggag	ccgtaacgtc	attagcggtt	ccaatgtcgt	tctgaacaac	1320
gagatgatgc	gcatcctcga	ttgccgcgag	ttgttcgtcg	atattctggt	ccctgaagtc	1380
gattatgacg	agatctatcc	cggccgcgag	gcggagggtcc	ggcttttcgg	tcgcgggcgat	1440
gtgttccggg	gccgcgtaca	ggcggtaag	ggatcgtccg	cggtcgtgga	aaaggactcg	1500
ctggcggcca	acgagccgga	gacggaggag	cgaatgccc	gcatccgct	cacgctcgct	1560
ccgtcggcac	tcaacaccga	ttttgcgaat	ttctgtcagg	ttgggcgaac	ggcgcaggtt	1620
cgtttctcca	agcgcagcct	tcacctggcg	cagtgggttc	aaagcttggt	gttcagtctc	1680
ttctagcgt	ggcggcacc	ttaatcgtca	tcgccttttt	tctcctcggc	ccgttcaact	1740
ggtcgcgcca	caggagctgg	tcgcgcgccg	ttacctgcgc	gttcgctcgt	gccatcgcgc	1800
tgcgttacat	gctctggcgc	ttcacagaaa	ccgtgcttcc	ctatccgaac	gacggcccca	1860
atttctattg	ggtctgggtc	gtgttcatcg	tcgagttcct	cgccttttcg	gaggtcgtgc	1920
tcttctcat	cctgatgagc	cgctacgtcg	accgcagcgc	cgaggggaat	cggctcgagc	1980
ggcagttttt	tgagcgcgat	gaacgggagc	tccccacggt	cgacgtcttc	atccccacct	2040
ataacgagcc	tctcgacgtt	ctcgaacgca	cgatcgtcgg	ggcgcttgcg	ctcgaccatc	2100
ccaaggacaa	gctgaatgtc	tatgtgctcg	acgacggccg	gcgcgactgg	ctcaggacct	2160
tctgcgaggg	gcgcgggtcg	atccatgtga	cgcgacgca	caacgcgcat	gccaaaggccg	2220
gcaacatgaa	caacggtttg	cgcgtcagtt	caggcgattt	catcgccgtc	ttc gatgccg	2280
atttctgacc	ctatcgcagt	ttctcggc	gcacctggcc	cttcttcatg	gacgacacga	2340
tcggcatcgt	gcagacaccg	cagcacttct	tcaacgtcga	tccgatccag	tccaatctcg	2400
gactggagaa	cctatggccc	gatgagcagc	gcctgttttt	cgacgagatc	gcgccgagcc	2460
gcgacggctg	ggacgtgagc	ttctgctgcg	gctcctgttc	gatcgcaagg	cgcaaggcgg	2520
tagacgccat	cggcggtttt	ccaaccgagt	cgatcaccga	ggatctactg	acgacgctgt	2580
cgatgctcaa	caggggggtc	aagacgcggt	atctcaacga	gcggcttttcg	atggggctgg	2640
cggccgagaa	tctcaccggc	tatttcgtcc	agcgcgagcg	ctggtgcca	ggcggtatcc	2700
agacgctcta	cctgcacaac	ggccccctgc	gcgggcccgg	cctctcgtc	tttcagcgcg	2760
tcatgttct	gccgatgtcg	tggtcgtgc	aatatctggt	ccgtttcatc	gtgcttctca	2820
ttcctatcgt	ctatctgtgg	ttcggcggcc	tgccgctcta	cttcacggat	gtcggcggact	2880
acgtctcga	ccaggttccc	ctgctggcgg	cctatttctc	gctgatgttc	tggtcaccgc	2940
cgacgcgcta	ccttccgctg	gtctccaccg	ccgtcggtag	cttctcgacc	ttccgcatgc	3000
tgccaaccgt	cctgtcgagc	ctcgtcaggc	ccttcggcaa	gcccttcaag	gtgaccccga	3060
agggcagcag	caacgaggca	aacgtcttcg	acgcctatac	cttcacctgg	atcgccggct	3120
tcatcgtggt	tacggcgttg	ggactcctga	tcaacatcgt	tccggagacg	gcgcgggtag	3180
aggggtcgtt	ctcggcgatc	gcggcgcttt	ggtcgggcat	caacatcgtg	gtgctgatca	3240

tcgcctcgct	tatctgcttc	gagaagccgc	ggcgcctgct	gcaggcgttc	aagctcgacg	3300
agccggtgga	tgtggacggt	gtcgaaggcc	ggctcgtgag	cctctcactt	gataaggcgg	3360
tgggtggcgg	ttcgacggaa	acgcggttca	aatcgaccaa	ggtcagactg	aacatcgaag	3420
gcttcgcgcc	gctcgaagcg	gatctgaagc	aggtgacaca	gcggcgcggg	gacatcacgc	3480
gcaccggcga	caagcagcgt	tactaccttc	atcttacta	cgacctgctg	ggagtcgagc	3540
gggacaagat	gatcatcaag	ctctacaccg	ggcgtattc	ccgggacggt	cccgatatcg	3600
acaagatcgc	cgtttccgta	aatttgctgt	tgcgcgcttt	cggtcgcacg	cgaaccgcct	3660
gatcagcgg	ctgcaggttg	ggcgggatgc	ctccggtcta	cctgcccttc	ggggcataga	3720
gcggtcggga	gaagggcgaa	ttcactggcc	gtcgttttac	aacgtcgtga	ctgggaaaac	3780
cctggcgta	cccaacttaa	tcgccttgca	gcacatcccc	ctttcgccag	ctggcgtaat	3840
agcgaagagg	cccgcaccga	tcgcccttcc	caacagttgc	gcagcctgaa	tggcgaatgg	3900
cgctgatgc	ggtatcttct	ccttacgcat	ctgtgcggta	tttcacaccg	catatatggt	3960
gcactctcag	tacaatctgc	tctgatgccg	catagttaag	ccagccccga	caccgcgcaa	4020
caccgcgta	cgcgccctga	cgggcttgtc	tgctcccggc	atccgcttac	agacaagctg	4080
tgaccgtctc	cgggagctgc	atgtgtcaga	ggttttcacc	gtcatcaccg	aaacgcgcga	4140
gacgaaagg	cctcgtgata	cgcctatctt	tataggttaa	tgtcatgata	ataatggttt	4200
cttagacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aaccctatt	tgtttatttt	4260
tctaaataca	ttcaaataatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	4320
aatcatgcag	gtgctgaacc	cccagccgga	actgacccca	caaggcccta	gcgtttgcaa	4380
tgcaccagg	catcattgac	ccaggcgtgt	tccaccaggc	cgctgcctcg	caactcttcg	4440
caggcttcgc	cgacctgctc	gcgccacttc	ttcacgcggg	tggaatccga	tccgcacatg	4500
aggcgggaag	tttccagctt	gagcgggtac	ggctcccgg	gcgagctgaa	atagtcgaac	4560
atccgtcggg	ccgtcggcga	cagcttgccg	tacttctccc	atatgaattt	cgtgtagtgg	4620
tcgccagcaa	acagcacgac	gatttcctcg	tcgatcagga	cctggcaacg	ggacgttttc	4680
ttgccacgg	ccaggacgcg	gaagcgggtc	agcagcgaca	ccgattccag	gtgccaacg	4740
cggtcggacg	tgaagcccat	cgccgtcgcc	tgtaggcgcg	acaggcattc	ctcggccttc	4800
gtgtaatacc	ggccattgat	cgaccagccc	aggtcctggc	aaagctcgta	gaacgtgaag	4860
gtgatcggct	cgccgatagg	ggtgcgcttc	gcgtactcca	acacctgctg	ccacaccagt	4920
tcgtcatcgt	cggcccgcag	ctcgacgccg	gtgtaggtga	tcttcacgtc	cttggtgacg	4980
tggaaaatga	ccttgttttg	cagcgcctcg	cgcgggattt	tcttggttcg	cgtggtgaac	5040
aggcagagc	gggccgtgtc	gtttggcatc	gctcgcacg	tgtccggcca	cggcgcgaata	5100
tcgaacaagg	aaagctgcat	ttccttgatc	tgctgcttcg	tgtgtttcag	caacgcggcc	5160
tgcttggcct	cgctgacctg	ttttgccagg	tcctcgccgg	cggtttttcg	cttcttggtc	5220
gtcatagttc	ctcgcgtgtc	gatggtcatc	gacttcgcca	aacctgccgc	ctcctgttcg	5280
agacgacgcg	aacgctccac	ggcggccgat	ggcgcgggca	gggcaggggg	agccagttgc	5340

acgctgtcgc gctcgatcct ggccgtagct tgctggacca tcgagccgac ggactggaag	5400
gtttcgcggg gcgcacgcat gacggtgcgg cttgcatgg tttcggcatc ctcggcggaa	5460
aaccccgct cgatcagttc ttgcctgtat gccttccggt caaacgtccg attcattcac	5520
cctccttgcg ggattgcccc ggaattaatt ccccgatcg atccgtcgat cttgatcccc	5580
tgcgccatca gatccttggc ggcaagaaag ccatccagtt tactttgcag ggcttcccaa	5640
ccttaccaga gggcgcccc gctggcaatt ccggttcgct tgctgtccat aaaaccgccc	5700
agtctagcta tcgccatgta agcccactgc aagctacctg ctttctcttt gcgcttgctg	5760
ttcccttgt ccagatagcc cagtagctga cattcatccg gggtcagcac cgtttctgcg	5820
gactggcttt ctacgtggct gccatTTTTT gggtaggctc gttcgcggcc gaggggcgca	5880
gcccctgggg ggatgggggt ccgcgttagc gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac	5940
cccccttcgg cgtgcgcggt cacgcgccag ggcgcagccc tggttaaaaa caaggtttat	6000
aatattggt taaaagcag gtaaaagac aggttagcgg tggccgaaaa acgggcgaa	6060
acccttcaa atgctggatt ttctgcctgt ggacagcccc tcaaagtca ataggtgcgc	6120
ccctcatctg tcatactct gccctcaag tgtcaaggat cgcgcccctc atctgtcagt	6180
agtcgcgccc ctcaagtgc aataccgag ggcacttacc cccaggcttg tccacatcat	6240
ctgtgggaaa ctgcgtaaa atcaggcgtt ttcgccgatt tgcgaggctg gccagctcca	6300
cgtcgccggc cgaaatcgag cctgccctc atctgtcaac gccgcgccgg gtgagtcggc	6360
ccctcaagtg tcaacgtccg ccctcatct gtcagtgagg gccaagtttt ccgcgtggta	6420
tccacaacgc cggcgccct acatggctct gctgtagtga gtgggttgcg ctccggcagc	6480
ggtcctgatc ccccgagaa aaaaaggatc tcaagaagat cttttgatct tttctacggg	6540
gtctgacgct cagtggaacg aaaactcac ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa	6600
aaggatctc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat	6660
atatgagtaa acttggctct acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc	6720
gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat	6780
acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc	6840
ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc	6900
tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag	6960
ttcgccagtt aatagtttc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg	7020
ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg	7080
atcccccattg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttcggt cctccgatcg ttgtcagaag	7140
taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt	7200
catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga	7260
atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca acacgggata ataccgccc	7320
acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc	7380

aaggatccta	ccgctgttga	gatccagttc	gatgtaacct	actcgtgcac	ccaactgatc	7440
ttcagcatct	tttactttca	ccagcgtttc	tgggtgagca	aaaacaggaa	ggcaaaatgc	7500
cgcaaaaaag	ggaataaggg	cgacacggaa	atgttgaata	ctcatactct	tcctttttca	7560
atattattga	agcatttata	agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	7620
ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcg	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgggtc	7680
gatcgacgga	tcttttccgc	tgcataacct	tgcttccggg	tcattatagc	gattttttcg	7740
gtatatccat	cctttttcgc	acgatataca	ggattttgcc	aaagggttcg	tgtagacttt	7800
ccttggtgta	tccaacggcg	tcagccgggc	aggataggtg	aagtaggcc	acccgcgagc	7860
gggtgttct	tcttactgt	cccttattcg	cacctggcgg	tgctcaacgg	gaatcctgct	7920
ctgcgaggct	ggccgtaagc	tctaagaaac	cattattatc	atgacattaa	cctataaaaa	7980
taggcgtatc	acgaggccct	ttcgtcttca	agaattaatt	cactggccgt	cgttttacaa	8040
cgctcgtgact	gggaaaacct	tggcgttacc	caacttaatc	gccttgcagc	acatccccct	8100
ttcgccagca	gatccgtccc	tatcgtttcc	acgatcagcg	atcggctcgt	tgccctgcgc	8160
cgctccaaag	cccgcgacgc	agcgcggca	ggcagagcaa	gtagagggca	gcgctgcaa	8220
tccatgcca	cccgttccac	gttgttatag	aagccgata	gatcgccgtg	aagaggaggg	8280
gtccgacgat	cgaggtcagg	ctggtgagcg	ccgccagtga	gccttgcagc	tgcccctggc	8340
gttctcatc	cacctgcctg	gacaacattg	cttgcagcgc	cggcattccg	atgccacccg	8400
aagcaagcag	gacatgatc	gggaacgcca	tccatccccg	tgtcgcgaag	gcaagcagga	8460
tgtagcctgt	gccgtcggca	atcattccga	gcatgagtgc	ccgcctttcg	ccgagccggg	8520
cggctacagg	gccggtgatc	attgcctggg	cgagtgaatg	cagaatgcca	aatgcggcaa	8580
gcgaaatgcc	gatcgtggtc	ggttcccagt	gaaagcgatc	ctcgccgaaa	atgacccaaa	8640
gcgcgccgg	cacctgtccg	acaagttgca	tgatgaagaa	gaccgccatc	agggcggcga	8700
cgacggtcat	gccccgggcc	caccgaacga	agctgagcgg	gttgagagcc	tcccggcgta	8760
acggccggcg	ttcgcctttg	tgcgactccg	gaaaaggaa	acagcccgtc	aggaaattga	8820
ggccgttcaa	ggctgccgcg	gcgaagaacg	gagcgtgggg	ggagaaaccg	cccatcagcc	8880
caccgagcac	aggtcccgcg	accatcccga	acccgaaaca	ggcgtcatg	aagccgaagt	8940
gccgcgcgcg	ctcatcgcca	tcagtgatat	cggcaatata	agcgcgggct	accgccccag	9000
tcgccccggt	gatgccggcc	acgatccgcc	cgatatagag	aacccaaagg	aaaggcgctg	9060
tcgccatgat	ggcgtagtgc	acagtggcgc	cggccagcga	gacgagcaag	attggccgcc	9120
gcccgaacg	atccgacagc	gcgcccagca	caggtgcgca	ggcaaattgc	accaacgcat	9180
acagcgcag	cagaatgcca	tagtgggagg	tgacgtcgtt	cgagtgaacc	agatcgcgca	9240
ggaggccccg	cagcaccggc	ataatcaggc	cgatgccgac	agcgtcgagc	gcgacagtgc	9300
tcagaattac	gatcaggggt	atgttgggtt	tcacgtctgg	cctccggacc	agcctccgct	9360
ggtccgattg	aacgcgcgga	ttctttatca	ctgataagtt	ggtggacata	ttatgtttat	9420
cagtataaaa	gtgtcaagca	tgacaaagtt	gcagccgaat	acagtgatcc	gtgccgcctt	9480

agacctgttg	aacgaggctcg	gcgtagacgg	tctgacgaca	cgcaaactgg	cggaacggtt	9540
gggggttcag	cagccggcgc	tttactggca	cttcaggaac	aagcgggagc	tgctcgacgc	9600
actggccgaa	gccatgctgg	cggagaatca	tagcacttcg	gtgccgagag	ccgacgacga	9660
ctggcgctca	tttctgactg	ggaatgcccg	cagcttcagg	caggcgctgc	tcgcctaccg	9720
cgatggcgcg	cgcatccatg	ccggcacgcg	accgggagca	ccgcagatgg	aaacggccga	9780
cgcgagctt	cgcttctct	gcgaggcggg	tttttcggcc	ggggacgccg	tcaatgcgct	9840
gatgacaatc	agctacttca	ctgttggggc	cgtgcttgag	gagcaggccg	gcgacagcga	9900
gtccggcgag	cgcggcggca	ccgttgaaca	ggctccgctc	tcgccgctgt	tgccggccgc	9960
gatagacgcc	ttcgacgaag	ccggtccgga	cgcagcgctc	gagcaggggac	tcgcggtgat	10020
tgtcgatgga	ttggcgaaaa	ggaggctcgt	tgtcaggaac	gttgaaggac	cgagaaaggg	10080
tgacgattga	tcaggaccgc	tgccggagcg	caaccctctc	actacagcag	agccatgtag	10140
acaacatccc	ctcccccttt	ccaccgcgtc	agagccccgt	agcggccgct	acgggctttt	10200
tcatgccctg	ccctagcgtc	caagcctcac	gccgcgctcg	gcctctctgg	cggccttctg	10260
gcgctcctgc	tgccggcgtc	gctcgtgggc	cgcggcgggt	ccgcgcgccg	gcctcgtgcg	10320
ctggcgctcg	cgggcgaggt	ccagggcggc	cgtcttcacg	ttctgccttg	cgcagatgag	10380
atagatcgac	ggatctgcat	gttctttcct	gcgttatccc	ctgattctgt	ggataaccgt	10440
attaccgcct	ttgagtgagc	tgataccgct	cgccgcagcc	gaacgaccga	gcgagcgcgag	10500
tcagtgagcg	aggaagcggg	agagcgccca	atacgcaaac	cgcctctccc	cgcgcggttg	10560
ccgattcatt	aatgcagctg	gcacgacagg	tttcccgact	ggaaagcggg	cagtgcgagc	10620
aacgcaatta	atgtgagtta	gctcactcat	taggcacccc	aggctttaca	ctttatgctt	10680
ccggctcgta	tgttgtgtgg	aattgtgagc	ggataacaat	ttcacacagg	aaacagctat	10740
gacatgatt	acgccaagct	tgcatgcctg	caggtcgact	ctagaaataa	ttttgtttta	10800
ctttaagaag	gagatataca	tatgagcgcc	cggatcctcg	tcgtcgacga	catcgaggcc	10860
aatgtccgcc	tgcttgaggc	caagctgacg	gccgagtact	atgaggtctc	caccgccatg	10920
gacgggccga	cggccctggc	tatggccgcg	cgcgatctgc	ccgacatcat	tctgctggac	10980
gtcatgatgc	ccggcatgga	cggcttcacc	gtctgccgta	agctgaagga	cgatccgact	11040
accgccaca	tcccgggtgt	gctgatcacc	gcgctcgacg	ggcgtggcga	ccgcatccag	11100
ggcctggaat	cgggcgcttc	ggacttctct	accaagccga	tcgacgacgt	catgctgttc	11160
gcccgcgtgc	gcagcctgac	ccgcttcaag	ctgggtgatcg	acgaactgcg	tcagcgcgag	11220
gcctcgggcc	gccgcatggg	cgtgatcgcc	ggcggccgag	cgcgcctgga	cggctctgggc	11280
ggtcgggtgc	tgatcgtcga	cgacaacgaa	cgccaggctc	aacgcgtcgc	cgccgagctg	11340
ggcgtcgaac	accgcccgtg	gatcgagagc	gaccctgaga	aggccaagat	cagcgcgggc	11400
ggtccggtcg	acctggatcat	cgtcaacgct	gcggccaaga	acttcgatgg	cctgcgcttc	11460
accgccgcgc	tgccgtccga	ggaacgcacc	cgccagttgc	ccgtgctggc	catggtcgat	11520

cccgatgac	gtggccgcat	ggtcaaggcg	ctggagatcg	gCGtgaacga	catcctgtcg	11580
cgcccgatcg	atccgcagga	actgtccgcg	cgCGtcaaga	cgCagatcca	gCGcaagcgC	11640
tacactgact	atctgcgcaa	caatctggat	cactcgctgg	agctggccgt	caccgaccag	11700
ctgaccggcc	tgCacaatcg	ccgctacatg	accggtcagc	tcgactcgct	ggtcaagcgC	11760
gCGacactgg	gCGgCgatcc	ggtttcggcc	ctgctgatcg	acatcgattt	cttcaagaaa	11820
atcaacgaca	ccttcggTca	cgatatcggc	gacgaggtgc	tgCGcgagtt	cgCcttgcgt	11880
ctggcctcga	acgtccgCGc	cattgatctg	ccttgccgct	atggcgggga	agagttcgtg	11940
gtgatcatgc	ccgacaccgc	cctggctgac	gccctgcgca	tcgCCgagcg	gatccggatg	12000
catgtctccg	gctcgccctt	cacggtcgcc	catggccgCG	aaatgctgaa	cgTcaccatc	12060
tcgatcggcg	tctcggccac	ggcgggCGag	ggcGacacgc	ccgaagccct	gctcaagcgC	12120
gccgacgaag	gcgtttatca	ggccaaggcc	tcgggtcGga	acgCGgtggt	cggcaaggcc	12180
gcccacacc	atcaccatca	ctg				12203



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

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación asignada  
por el DEPOSITANTE:

Plásmido pJBPléD\*9091

Número de orden atribuido por la  
AUTORIDAD INTERNACIONAL DE  
DEPÓSITO:

CECT 8651

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en I venía acompañado:

de una descripción científica

de una designación taxonómica propuesta

(Márquese lo que corresponda)

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta autoridad internacional de depósito acepta el microorganismo identificado en I, que ha recibido el 10 de junio de 2014 (fecha del depósito inicial)<sup>1</sup>

IV. RECEPCIÓN DE UNA PETICIÓN DE CONVERSIÓN

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)

V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

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: 22 de julio de 2014

Fdo.: Dr. 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	DECLARACIÓN DE VIABILIDAD, expedida en virtud de la Regla 10.2 por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada en la parte inferior de esta página
NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE SE EXPIDE LA DECLARACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD	
I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Juan Sanjuan Pinilla Dpto. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos Estación Experimental del Zaidín, CSIC C/ Prof. Albareda 1 18008 Granada	Número de orden atribuido por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: CECT 8651 Fecha del depósito o de la transferencia <sup>1</sup> : 10 de junio de 2014
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado en II ha sido controlada el 26 de junio de 2014 <sup>2</sup> . En esa fecha el microorganismo	
<input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> era viable <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> ya no era viable	

<sup>1</sup> Indíquese la fecha del depósito inicial o, si se ha efectuado un nuevo depósito o una transferencia, la más reciente de las fechas pertinentes (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

<sup>2</sup> En los casos previstos en la Regla 10.2.a)ii) y iii), menciónese el control de viabilidad más reciente.

<sup>3</sup> Márquese el recuadro correspondiente.



IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA EFECTUADO EL CONTROL DE LA VIABILIDAD<sup>4</sup>

V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

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: 22 de julio de 2014

Fdo.: Dr. José Miguel López Coronado



<sup>4</sup> Deberá cumplimentarse si se ha solicitado esta información y si los resultados del control fuesen negativos.

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		
I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO		
Referencia de identificación asignada por el DEPOSITANTE:  SmepJBPlE*9091	Número de orden atribuido por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: CECT 8652	
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA		
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)		
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN		
Esta autoridad internacional de depósito acepta el microorganismo identificado en I, que ha recibido el 10 de junio de 2014 (fecha del depósito inicial) <sup>1</sup>		
IV. RECEPCIÓN DE UNA PETICIÓN DE CONVERSIÓN		
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)		
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO		
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: 22 de julio de 2014 Fdo.: Dr. 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		DECLARACIÓN DE VIABILIDAD, expedida en virtud de la Regla 10.2 por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada en la parte inferior de esta página
NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE SE EXPIDE LA DECLARACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD		
I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Juan Sanjuan Pinilla Dpto. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos Estación Experimental del Zaidín, CSIC C/ Prof. Albareda 1 18008 Granada		Número de orden atribuido por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: CECT 8652 Fecha del depósito o de la transferencia <sup>1</sup> : 10 de junio de 2014
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD		
La viabilidad del microorganismo identificado en II ha sido controlada el 26 de junio de 2014 <sup>2</sup> . En esa fecha el microorganismo		
<input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> era viable		
<input type="checkbox"/> <sup>3</sup> ya no era viable		

<sup>1</sup> Indíquese la fecha del depósito inicial o, si se ha efectuado un nuevo depósito o una transferencia, la más reciente de las fechas pertinentes (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

<sup>2</sup> En los casos previstos en la Regla 10.2.a)ii) y iii), menciónese el control de viabilidad más reciente.

<sup>3</sup> Márquese el recuadro correspondiente.

IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA EFECTUADO EL CONTROL DE LA VIABILIDAD<sup>4</sup>

V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

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: 22 de julio de 2014  
Fdo.: Dr. José Miguel López Coronado



<sup>4</sup> Deberá cumplimentarse si se ha solicitado esta información y si los resultados del control fuesen negativos.