

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 520**

51 Int. Cl.:

C12P 7/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2006** **E 06804251 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013** **EP 1929025**

54 Título: **Producción de alcoholes de cuatro carbonos por fermentación**

30 Prioridad:

29.09.2005 US 721677 P
16.06.2006 US 814470 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2014

73 Titular/es:

BUTAMAX (TM) ADVANCED BIOFUELS LLC
(100.0%)
200 POWDER MILL ROAD
WILMINGTON DE 19803, US

72 Inventor/es:

DONALDSON, GAIL K.;
HUANG, LIXUAN LISA;
MAGGIO-HALL, LORI ANN;
NAGARAJAN, VASANTHA;
NAKAMURA, CHARLES E. y
SUH, WONCHUL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 446 520 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de alcoholes de cuatro carbonos por fermentación.

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de la microbiología industrial y la producción de alcoholes. Más específicamente, se produce 1-butanol por medio de la fermentación industrial de un microorganismo recombinante.

Antecedentes de la invención

10 El butanol es un importante producto químico industrial, útil como un aditivo para combustibles, como una materia prima química en la industria del plástico y como un disolvente de calidad alimentaria en la industria de los alimentos y los condimentos. Cada año se producen de 4,5 a 5,5 millones de toneladas de butanol por medios petroquímicos, y probablemente aumentará la necesidad de esta materia prima química.

15 Se conocen métodos para la síntesis química de 1-butanol, tales como el Proceso Oxo, el Proceso Reppe y la hidrogenación de crotonaldehído (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6ª edición, 2003, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co., Weinheim, Alemania, volumen 5, páginas 716-719). En estos procedimientos se utilizan materiales de partida procedentes de productos petroquímicos, y los procedimientos son generalmente costosos y poco respetuosos con el medio ambiente. La producción de 1-butanol a partir de materias primas de origen vegetal minimizaría las emisiones de gases de efecto invernadero y representaría un progreso en la técnica.

20 También se conocen métodos para producir 1-butanol por biotransformación de otros productos químicos orgánicos. Por ejemplo, Muramoto et al. (Documento JP 63017695) describen un método para la producción de alcoholes, incluyendo butanol, a partir de aldehídos usando cepas de *Pseudomonas*. Además, Kuehnle et al. (Documento EP 1149918) describen un procedimiento para preparar 1-butanol y 2-butanol mediante la oxidación de hidrocarburos por diversas cepas de *Rhodococcus ruber*.

25 También se conocen métodos para producir butanol por fermentación, siendo el procedimiento más popular aquél con que se produce una mezcla de acetona, 1-butanol y etanol, procedimiento al que se hace referencia como proceso ABE (Blaschek et al., Patente de EE.UU. nº 6.358.717). La fermentación hasta acetona-butanol-etanol (ABE) por *Clostridium acetobutylicum* es una de las fermentaciones industriales conocidas más antiguas, y se han presentado las rutas y los genes responsables de la producción de estos disolventes [Girbal et al., Trends in Biotechnology 16: 11-16 (1998)]. Sin embargo, la fermentación real ha sido bastante complicada y difícil de controlar. La fermentación ABE ha decaído continuamente desde los años 1950, y casi todo el butanol es ahora producido por rutas petroquímicas, como se describió anteriormente. En una fermentación ABE típica, el *C. acetobutylicum* produce primero los ácidos butírico, propiónico, láctico y acético, el pH del cultivo disminuye, el cultivo experimenta un desplazamiento metabólico en "mariposa", y luego se forman 1-butanol, acetona, isopropanol y etanol. En fermentaciones ABE convencionales, el rendimiento de 1-butanol a partir de glucosa es pequeño, típicamente alrededor del 15 por ciento, y raras veces excede del 25 por ciento. En consecuencia, la concentración de 1-butanol en las fermentaciones ABE convencionales es normalmente inferior al 1,3 por ciento.

35 Los intentos para maximizar la producción de 1-butanol del proceso ABE mediante la eliminación de todos los demás subproductos disolventes no han resultado totalmente satisfactorios y, por consiguiente, el procedimiento permite producir cantidades significativas de acetona, que no es útil como aditivo para la gasolina. Un procedimiento para la producción de butanol por fermentación en que el 1-butanol fuera el único producto representaría un avance en la técnica.

40 Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento ambientalmente responsable y económicamente eficaz para la producción de 1-butanol como único producto. La presente invención se enfrenta a esta necesidad a través del descubrimiento de un huésped microbiano recombinante para producción que expresa una ruta biosintética del 1-butanol.

Sumario de la invención

45 La invención proporciona un microorganismo recombinante que tiene una ruta biosintética del 1-butanol genéticamente diseñada. El microorganismo genéticamente diseñado puede ser utilizado para la producción comercial de 1-butanol. En consecuencia, la invención proporciona una célula huésped microbiana recombinante que comprende moléculas de DNA heterólogas que codifican polipéptidos que catalizan las conversiones de sustrato a producto:

- 50 a) acetil-CoA a acetoacetil-CoA,
b) acetoacetil-CoA a 3-hidroxi butiril-CoA,
c) 3-hidroxi butiril-CoA a crotonil-CoA,
d) crotonil-CoA a butiril-CoA,

e) butiril-CoA a butiraldehído, y

f) butiraldehído a 1-butanol;

en donde dicha célula huésped microbiana produce 1-butanol.

En otra realización, la invención proporciona un método para la producción de 1-butanol, que comprende:

5 i) proporcionar una célula huésped microbiana recombinante que comprende moléculas de DNA heterólogas que codifican polipéptidos que catalizan las conversiones de sustrato a producto:

a) acetil-CoA a acetoacetil-CoA,

b) acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacil-CoA,

c) 3-hidroxiacil-CoA a crotonil-CoA,

10 d) crotonil-CoA a butiril-CoA,

e) butiril-CoA a butiraldehído, y

f) butiraldehído a 1-butanol; y

ii) poner la célula huésped de (i) en contacto con un sustrato carbonado fermentable bajo unas condiciones mediante las cuales se produce 1-butanol.

15 Breve descripción de las figuras y las descripciones de secuencias

La invención puede ser entendida más a fondo a partir de la descripción detallada, la figura y las descripciones de secuencias adjuntas siguientes, que forman una parte de esta solicitud.

En la Figura 1 se muestra la ruta biosintética del 1-butanol. Los pasos marcados como "a", "b", "c", "d", "e" y "f" representan las conversiones de sustrato a producto descritas más adelante.

20 Las secuencias siguientes se ajustan a 37 C.F.R. 1.821-1.825 ("Requisitos para Solicitudes de Patente que Contienen Descripciones de Secuencias de Nucleótidos y/o Secuencias de Aminoácidos – las Reglas de Secuencias") y son coherentes con la Norma ST.25 (1998) de la Organización Mundial para la Propiedad Intelectual (WIPO; del inglés, World Intellectual Property Organization) y los requisitos de listas de secuencias de la EPO y el PCT [Reglas 5.2 y 49.5 (a-bis), y la Sección 208 y el Anexo C de las Instrucciones Administrativas]. Los símbolos y
25 el formato utilizados para los datos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos cumplen con las reglas expuestas en 37 C.F.R. §1.822.

Tabla 1

| Sumario de números de ID. SEC. de genes y proteínas | | |
|---|-----------------------------------|----------------------------|
| Descripción | nº de ID. SEC. del ácido nucleico | nº de ID. SEC. del péptido |
| Acetil-CoA acetiltransferasa thIA de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 | 1 | 2 |
| Acetil-CoA acetiltransferasa thIB de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 | 3 | 4 |
| Acetil-CoA acetiltransferasa de <i>Escherichia coli</i> | 128 | 129 |
| Acetil-CoA acetiltransferasa de <i>Bacillus subtilis</i> | 130 | 131 |
| Acetil-CoA acetiltransferasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 132 | 133 |
| 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 | 5 | 6 |
| 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de <i>Bacillus subtilis</i> | 134 | 135 |
| 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de <i>Ralstonia eutropha</i> | 136 | 137 |
| 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de <i>Alcaligenes eutrophus</i> | 138 | 139 |
| Crotonasa de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 | 7 | 8 |

| Sumario de números de ID. SEC. de genes y proteínas | | |
|--|-----------------------------------|----------------------------|
| Descripción | nº de ID. SEC. del ácido nucleico | nº de ID. SEC. del péptido |
| Crotonasa de <i>Escherichia coli</i> | 140 | 141 |
| Crotonasa de <i>Bacillus subtilis</i> | 142 | 143 |
| Crotonasa de <i>Aeromonas caviae</i> | 144 | 145 |
| Supuesta trans-enoil-CoA reductasa de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 | 9 | 10 |
| Butiril-CoA deshidrogenasa de <i>Euglena gracilis</i> | 146 | 147 |
| Butiril-CoA deshidrogenasa de <i>Streptomyces collinus</i> | 148 | 149 |
| Butiril-CoA deshidrogenasa de <i>Streptomyces coelicolor</i> | 150 | 151 |
| Butiraldehído deshidrogenasa de <i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B594 | 11 | 12 |
| Butiraldehído deshidrogenasa de <i>Clostridium acetobutylicum</i> | 152 | 153 |
| Butanol deshidrogenasa bdhB de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 | 13 | 14 |
| Butanol deshidrogenasa bdhA de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 | 15 | 16 |
| Butanol deshidrogenasa de <i>Clostridium acetobutylicum</i> | 152 | 153 |
| Butanol deshidrogenasa de <i>Escherichia coli</i> | 154 | 155 |

Las ID. SEC. números 17-44 son las secuencias nucleotídicas de cebadores oligonucleotídicos usados para multiplicar los genes de la ruta biosintética del 1-butanol.

Las ID. SEC. números 45-72 son las secuencias nucleotídicas de cebadores oligonucleotídicos usados para secuenciación.

- 5 Las ID. SEC. números 73-75 son las secuencias nucleotídicas de cebadores oligonucleotídicos usados para construir los vectores de transformación descritos en el Ejemplo 9.

La ID. SEC. nº 76 es la secuencia de nucleótidos del gen CAC0462 optimizado en cuanto a codones, al que se hace referencia en esta memoria como CaTER.

- 10 La ID. SEC. nº 77 es la secuencia de nucleótidos del gen EgTER optimizado en cuanto a codones, al que se hace referencia en esta memoria como EgTER (opt.).

La ID. SEC. nº 78 es la secuencia de nucleótidos del gen *ald* optimizado en cuanto a codones, al que se hace referencia en esta memoria como ald (opt.).

La ID. SEC. nº 79 es la secuencia de nucleótidos del plásmido pFP988.

- 15 Las ID. SEC. números 80-127, 160-185 y 190-207 son las secuencias de ácido nucleico de cebadores de clonación, secuenciación, o exploración por PCR empleados para la clonación, secuenciación o exploración de los genes de la ruta biosintética del 1-butanol descrita en esta memoria, y se describen con mayor detalle en las Tablas 4 y 5.

La ID. SEC. nº 156 es la secuencia de nucleótidos del grupo génico *cscBKA*.

La ID. SEC. nº 157 es la secuencia de aminoácidos de la sacarosa hidrolasa (CscA).

La ID. SEC. nº 158 es la secuencia de aminoácidos de la D-fructocinasa (CscK).

- 20 La ID. SEC. nº 159 es la secuencia de aminoácidos de la sacarosa permeasa (CscB).

La ID. SEC. nº 186 es la secuencia de nucleótidos del gen *tery* optimizado en cuanto a codones, descrito en el Ejemplo 17.

La ID. SEC. nº 187 es la secuencia de aminoácidos de la butiril-CoA deshidrogenasa (ter) codificada por el gen *tery* optimizado en cuanto a codones (ID. SEC. nº 186).

La ID. SEC. nº 188 es la secuencia de nucleótidos del gen *aldy* optimizado en cuanto a codones, descrito en el Ejemplo 17.

La ID. SEC. nº 189 es la secuencia de aminoácidos de la butiraldehído deshidrogenasa (ald) codificada por el gen *aldy* optimizado en cuanto a codones (ID. SEC. nº 188).

- 5 La ID. SEC. nº 208 es la secuencia de nucleótidos del DNA molde empleado en el Ejemplo 14.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se refiere a métodos para la producción de 1-butanol usando microorganismos recombinantes. La presente invención satisface diversas necesidades comerciales e industriales. El butanol es una importante materia prima química industrial con una diversidad de aplicaciones, siendo particularmente significativo su potencial como combustible o aditivo para combustibles. Aunque es un alcohol de sólo cuatro carbonos, el butanol tiene un contenido energético similar al de la gasolina y puede ser combinado con cualquier combustible fósil. El butanol es preferido como combustible o aditivo para combustibles ya que sólo produce CO₂ y poco o nada de SO_x y NO_x cuando se quema en el motor estándar de combustión interna. Además, el butanol es menos corrosivo que el etanol, el aditivo para combustibles más preferido hasta la fecha.

15 Además de su utilidad como biocombustible o aditivo para combustibles, el butanol tiene el potencial de incidir en los problemas de distribución de hidrógeno en la industria emergente de las pilas de combustible. Hoy día, las pilas de combustible están plagadas de cuestiones de seguridad asociadas con el transporte y la distribución de hidrógeno. El butanol puede ser fácilmente reformado en cuanto a su contenido de hidrógeno y puede ser distribuido a través de las gasolineras existentes en la pureza requerida para las pilas de combustible o los vehículos.

20 Finalmente, la presente invención permite producir butanol a partir de fuentes carbonadas de origen vegetal, evitando el negativo impacto ambiental asociado con los procesos petroquímicos estándares para la producción de butanol.

Se van a utilizar las definiciones y abreviaturas siguientes para la interpretación de las reivindicaciones y la memoria descriptiva.

25 La expresión "invención" o "presente invención", como se emplea en esta memoria, es una expresión no restrictiva y con ella no se pretende hacer referencia a ninguna realización individual de la invención particular, sino que abarca todas las posibles realizaciones como las descritas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

"ABE" es la abreviatura del proceso de fermentación hasta Acetona-Butanol-Etanol.

30 La expresión "rutas biosintéticas del 1-butanol" significa la ruta enzimática para producir 1-butanol a partir de acetil-coenzima A (acetil-coA).

La expresión "acetil-CoA acetiltransferasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA y coenzima A (CoA). Las acetil-CoA acetiltransferasas preferidas son acetil-CoA acetiltransferasas con preferencias de sustrato (reacción en dirección hacia adelante) por un acil-CoA de cadena corta y acetil-CoA y son clasificadas como E.C. 2.3.1.9 (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego); aunque también serán funcionales las enzimas con una variedad de sustratos más amplia (E.C. 2.3.1.16). Las acetil-CoA acetiltransferasas son asequibles de diversas fuentes, tales como, por ejemplo, *Escherichia coli* [números de GenBank: NP_416728 (ID. SEC. nº 129), NC_000913 (ID. SEC. nº 128)]; secuencia de aminoácidos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), secuencia de nucleótidos del NCBI], *Clostridium acetobutylicum* [números de GenBank: NP_349476.1 (ID. SEC. nº 2), NC_003030 (ID. SEC. nº 1); NP_149242 (ID. SEC. nº 4), NC_001988 (ID. SEC. nº 3)], *Bacillus subtilis* [números de GenBank: NP_390297 (ID. SEC. nº 131), NC_000964 (ID. SEC. nº 130)] y *Saccharomyces cerevisiae* [números de GenBank: NP_015297 (ID. SEC. nº 133), NC_001148 (ID. SEC. nº 132)].

La expresión "3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de acetoacetil-CoA en 3-hidroxiacil-CoA. Las 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas pueden ser dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), con una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxiacil-CoA o (R)-3-hidroxiacil-CoA y son clasificadas como E.C. 1.1.1.35 y E.C. 1.1.1.30, respectivamente. Además, las 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas pueden ser dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), con una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxiacil-CoA o (R)-3-hidroxiacil-CoA y son clasificadas como E.C. 1.1.1.157 y E.C. 1.1.1.36, respectivamente. Las 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas son asequibles de diversas fuentes, tales como, por ejemplo, *C. acetobutylicum* [números de GenBank: NP_349314 (ID. SEC. nº 6), NC_003030 (ID. SEC. nº 5)], *B. subtilis* [números de GenBank: AAB09614 (ID. SEC. nº 135), U29084 (ID. SEC. nº 134)], *Ralstonia eutropha* [números de GenBank: YP_294481 (ID. SEC. nº 137), NC_007347 (ID. SEC. nº 136)] y *Alcaligenes eutrophus* [números de GenBank: AAA21973 (ID. SEC. nº 139), J04987 (ID. SEC. nº 138)].

55 El término "crotonasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de 3-hidroxiacil-CoA en crotonil-CoA y H₂O. Las crotonasas pueden tener una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxiacil-CoA o (R)-3-hidroxiacil-CoA

y son clasificadas como E.C. 4.2.1.17 y E.C. 4.2.1.55, respectivamente. Las crotonasas son asequibles de diversas fuentes, tales como, por ejemplo, *E. coli* [números de GenBank: NP_415911 (ID. SEC. nº 141), NC_000913 (ID. SEC. nº 140)], *C. acetobutylicum* [números de GenBank: NP_349318 (ID. SEC. nº 8), NC_003030 (ID. SEC. nº 7)], *B. subtilis* [números de GenBank: CAB13705 (ID. SEC. nº 143), Z99113 (ID. SEC. nº 142)] y *Aeromonas caviae* [números de GenBank: BAA21816 (ID. SEC. nº 145), D88825 (ID. SEC. nº 144)].

La expresión "butiril-CoA deshidrogenasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de crotonil-CoA en butiril-CoA. Las butiril-CoA deshidrogenasas pueden ser dependientes de NADH o dependientes de NADPH y son clasificadas como E.C. 1.3.1.44 y E.C. 1.3.1.38, respectivamente. Las butiril-CoA deshidrogenasas son asequibles de diversas fuentes, tales como, por ejemplo, *C. acetobutylicum* [números de GenBank: NP_347102 (ID. SEC. nº 10), NC_003030 (ID. SEC. nº 9)], *Euglena gracilis* [números de GenBank: Q5EU90 (ID. SEC. nº 147), AY741582 (ID. SEC. nº 146)], *Streptomyces collinus* [números de GenBank: AAA92890 (ID. SEC. nº 149), U37135 (ID. SEC. nº 148)] y *Streptomyces coelicolor* [números de GenBank: CAA22721 (ID. SEC. nº 151), AL939127 (ID. SEC. nº 150)].

La expresión "butiraldehído deshidrogenasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de butiril-CoA en butiraldehído, usando NADH o NADPH como cofactor. Las butiraldehído deshidrogenasas con una preferencia por NADH son conocidas como E.C. 1.2.1.57 y son asequibles de, por ejemplo, *Clostridium beijerinckii* [números de GenBank: AAD31841 (ID. SEC. nº 12), AF157306 (ID. SEC. nº 11)] y *C. acetobutylicum* [números de GenBank: NP_149325 (ID. SEC. nº 153), NC_001988 (ID. SEC. nº 152)].

La expresión "butanol deshidrogenasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de butiraldehído en 1-butanol, usando NADH o NADPH como cofactor. Las butanol deshidrogenasas son asequibles de, por ejemplo, *C. acetobutylicum* [números de GenBank: NP_149325 (ID. SEC. nº 153), NC_001988 (ID. SEC. nº 152; nota: esta enzima posee actividad tanto aldehído como alcohol deshidrogenasa); NP_349891 (ID. SEC. nº 14), NC_003030 (ID. SEC. nº 13); y NP_349892 (ID. SEC. nº 16), NC_003030 (ID. SEC. nº 15)] y *E. coli* [números de GenBank: NP_417484 (ID. SEC. nº 155), NC_000913 (ID. SEC. nº 154)].

La expresión "un anaerobio facultativo" se refiere a un microorganismo que puede crecer en ambientes tanto aeróbicos como anaeróbicos.

La expresión "sustrato carbonado" o "sustrato carbonado fermentable" se refiere a una fuente carbonada capaz de ser metabolizada por organismos huésped de la presente invención y, particularmente, a fuentes carbonadas seleccionadas del grupo que consiste en monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, y sustratos de un carbono o mezclas de los mismos.

El término "gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que es capaz de expresarse como una proteína específica, incluyendo opcionalmente secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificadoras 5') y siguen (secuencias no codificadoras 3') a la secuencia de codificación. "Gen nativo" se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificadoras que no se hallan juntas en la naturaleza. En consecuencia, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que procedan de fuentes diferentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras procedentes de la misma fuente pero dispuestas de un modo diferente al hallado en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su posición natural en el genoma de un organismo. Un gen "extraño" o "heterólogo" se refiere a un gen no hallado normalmente en el organismo huésped pero que se introduce en el organismo huésped por transferencia génica. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que ha sido introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "secuencia de codificación" se refiere a una secuencia de DNA que codifica una secuencia de aminoácidos específica. "Secuencias reguladoras adecuadas" se refiere a secuencias de nucleótidos situadas corriente arriba (secuencias no codificadoras 5'), dentro de, o corriente abajo (secuencias no codificadoras 3') de una secuencia de codificación y que influyen en el procesamiento o la estabilidad del RNA, la transcripción, o la traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitio de procesamiento de RNA, sitio de unión de agentes efectores, y estructura de tallo-bucle.

El término "promotor" se refiere a una secuencia de DNA capaz de controlar la expresión de una secuencia de codificación o un RNA funcional. En general, una secuencia de codificación está situada en 3' con respecto a una secuencia promotora. Los promotores pueden proceder de un gen nativo en su totalidad o pueden estar compuestos de diferentes elementos procedentes de diferentes promotores hallados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de DNA sintéticos. Los expertos en la técnica entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares, o en diferentes fases del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. A los promotores que causan que un gen se exprese la mayoría de las veces en la mayoría de los tipos celulares se hace comúnmente referencia como "promotores constitutivos". Se reconoce además que, puesto que no se han definido completamente los límites exactos de las secuencias reguladoras en la mayoría de los casos, fragmentos de DNA de diferentes longitudes pueden tener una actividad

promotora idéntica.

La expresión "operativamente ligado" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de una resulte afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está operativamente ligado a una secuencia de codificación cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia de codificación (es decir, que la secuencia de codificación está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias de codificación pueden estar operativamente ligadas a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

El término "expresión", como se emplea en esta memoria, se refiere a la transcripción y la acumulación estable de RNA sentido (mRNA) o antisentido procedente del fragmento de ácido nucleico de la invención. "Expresión" se puede también referir a la traducción de mRNA en un polipéptido.

Como se emplea en esta memoria, el término "transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico a un organismo huésped, para dar lugar a una herencia genéticamente estable. A los organismos huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se hace referencia como organismos "transgénicos" o "recombinantes" o "transformados".

Los términos "plásmido", "vector" y "casete" se refieren a un elemento extracromosómico que porta a menudo genes que no son parte del metabolismo central de la célula, y que está normalmente en forma de fragmentos de DNA circular de doble cadena. Tales elementos pueden ser secuencias que se replican autónomamente, secuencias que se integran en el genoma, secuencias de nucleótidos o fagos, lineales o circulares, de un DNA o RNA de cadena sencilla o doble, procedentes de cualquier fuente, en que diversas secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una construcción única que es capaz de introducir en una célula un fragmento promotor y una secuencia de DNA para un producto génico seleccionado junto con una apropiada secuencia 3' no traducida. "Casete de transformación" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos, además del gen extraño, que facilitan la transformación de una célula huésped particular. "Casete de expresión" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos, además del gen extraño, que permiten una expresión potenciada de ese gen en un huésped extraño.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "degeneración de codones" se refiere a la naturaleza del código genético que permite una variación de la secuencia de nucleótidos sin que resulte afectada la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado. El técnico experto está al corriente de la "preferencia de codones" mostrada por una célula huésped específica en la utilización de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Por lo tanto, cuando se sintetiza un gen para expresión mejorada en una célula huésped, es deseable diseñar el gen de modo que su frecuencia de utilización de codones se aproxime a la frecuencia de utilización preferida de codones de la célula huésped.

La expresión "optimizado en cuanto a codones", cuando se refiere a genes o regiones de codificación de moléculas de ácido nucleico para la transformación de diversos huéspedes, se refiere a la alteración de codones en el gen o las regiones de codificación de las moléculas de ácido nucleico para reflejar la utilización típica de codones del organismo huésped sin que se altere el polipéptido codificado por el DNA.

Las técnicas estándares de DNA recombinante y clonación molecular utilizadas en esta memoria son bien conocidas en este campo técnico y son descritas por J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) (en adelante "Maniatis"); y por T. J. Silhavy, M. L. Bannan y L. W. Enquist, "Experiments with Gene Fusions", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1984); y por F. M. Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987).

La ruta biosintética del 1-butanol

Los microorganismos que utilizan carbohidratos emplean la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la ruta de Entner-Doudoroff y el ciclo de las pentosas fosfato como rutas metabólicas centrales para proporcionar energía y precursores celulares para el crecimiento y el mantenimiento. Estas rutas tienen en común el producto intermedio gliceraldehído-3-fosfato y, finalmente, se forma piruvato directamente o en combinación con la ruta EMP. Posteriormente, el piruvato se transforma en acetil-coenzima A (acetil-CoA) a través de una diversidad de medios, incluyendo la reacción con el complejo de piruvato deshidrogenasa, la piruvato-formiato liasa y la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa. El acetil-CoA actúa como un producto intermedio esencial en, por ejemplo, la generación de ácidos grasos, aminoácidos y metabolitos secundarios. Las reacciones combinadas de conversión de azúcares en acetil-CoA producen energía (por ejemplo, adenosina-5'-trifosfato, ATP) y equivalentes de reducción (por ejemplo, nicotinamida adenina dinucleótido reducido, NADH, y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, NADPH). El NADH y el NADPH deben ser reciclados hasta sus formas oxidadas (NAD^+ y NADP^+ , respectivamente). En presencia de aceptores inorgánicos de electrones (por ejemplo, O_2 , NO_3^- y SO_4^{2-}), los equivalentes de reducción pueden ser utilizados para aumentar la reserva energética; alternatively, se puede formar un subproducto carbonado reducido. La producción de etanol y 1-butanol que resultan de la fermentación de carbohidratos es un ejemplo de lo último.

Esta invención posibilita la producción de 1-butanol a partir de fuentes de carbohidratos con microorganismos recombinantes al proporcionar una ruta biosintética de 1-butanol completa desde acetil-CoA hasta 1-butanol, como se muestra en la Figura 1. Esta ruta biosintética, que no se encuentra generalmente en la comunidad microbiana debido a la ausencia de genes o a la falta de una apropiada regulación génica, comprende las siguientes conversiones de sustrato a producto:

- a) acetil-CoA a acetoacetil-CoA, según es catalizada, por ejemplo, por la acetil-CoA acetiltransferasa;
- b) acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetoil-CoA, según es catalizada, por ejemplo, por la 3-hidroxiacetoil-CoA deshidrogenasa;
- c) 3-hidroxiacetoil-CoA a crotonil-CoA, según es catalizada, por ejemplo, por la crotonasa;
- d) crotonil-CoA a butiril-CoA, según es catalizada, por ejemplo, por la butiril-CoA deshidrogenasa;
- e) butiril-CoA a butiraldehído, según es catalizada, por ejemplo, por la butiraldehído deshidrogenasa; y
- f) butiraldehído a 1-butanol; según es catalizada, por ejemplo, por la butanol deshidrogenasa.

La ruta no requiere ATP y genera NAD^+ y/o NADP^+ , equilibrándose de este modo con las rutas metabólicas centrales que generan acetil-CoA. La capacidad de los organismos naturales para producir 1-butanol por fermentación es rara y es ejemplificada lo más acusadamente por *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium acetobutylicum*. Se han descrito la organización génica y la regulación génica para *Clostridium acetobutylicum* [L. Girbal y P. Soucaille, Trends in Biotechnology 216: 11-16 (1998)]. Sin embargo, muchas de estas actividades enzimáticas están también asociadas con rutas alternas, tales como, por ejemplo, la utilización de hidrocarburos, la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de polihidroxicarboxilatos. De este modo, al proporcionar una ruta recombinante desde acetil-CoA hasta 1-butanol, existen diversas opciones para satisfacer los pasos de reacción individuales, y la persona con experiencia en la técnica será capaz de utilizar secuencias públicamente disponibles para construir las pertinentes rutas. A continuación, en la Tabla 2, se expone una lista de un número representativo de genes conocidos en la técnica y útiles en la construcción de la ruta biosintética del 1-butanol.

Tabla 2

| Fuentes de genes de la ruta del 1-butanol | |
|---|--|
| Gen | Cita de GenBank |
| acetil-CoA acetiltransferasa | NC_000913 <i>Escherichia coli</i> K12, genoma completo gi 49175990 ref NC_000913.2 [49175990] |
| | NC_001988 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, plásmido pSOL1, secuencia completa gi 15004705 ref NC_001988.2 [15004705] |
| | NC_000964 <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> cepa 168, genoma completo gi 50812173 ref NC_000964.2 [50812173] |
| | NC_001148 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cromosoma XVI, secuencia cromosómica completa gi 50593503 ref NC_001148.3 [50593503] |
| | CP000017 <i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS5005, genoma completo gi 71852596 gb CP000017.1 [71852596] |
| | NC_005773 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola 1448A, genoma completo gi 71733195 ref NC_005773.3 [71733195] |
| | CR931997 <i>Corynebacterium jeikeium</i> K411, genoma completo gi 68262661 emb CR931997.1 [68262661] |
| 3-hidroxiacetoil-CoA deshidrogenasa | NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, genoma completo gi 15893298 ref NC_003030.1 [15893298] |
| | U29084 <i>Bacillus subtilis</i> , genes (mmgA), (mmgB), (mmgC) y citrato sintasa III (mmgD), cds completa, y gen (mmgE), cds parcial gi 881603 gb U29084.1 BSU29084[881603] |

| Fuentes de genes de la ruta del 1-butanol | |
|---|--|
| Gen | Cita de GenBank |
| | NC_007347 <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 Raeut01_1, secuencia aleatoria ("shotgun") del genoma completo gi 45517296 ref NZ_AADY01000001.1 [45517296] |
| | J04987 <i>A. eutrophus</i> , genes de beta-cetotiolasa (phbA) y acetoacetil-CoA reductasa (phbB), cds completa gi 141953 gb J04987.1 AFAKTLAACA[141953] |
| | NC_004129 <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5, genoma completo gi 70728250 ref NC_004129.6 [70728250] |
| | NC_000913 <i>Escherichia coli</i> K12, genoma completo gi 49175990 ref NC_000913.2 [49175990] |
| | NC_004557 <i>Clostridium tetani</i> E88, genoma completo gi 28209834 ref NC_004557.1 [28209834] |
| | NC_006350 <i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243, cromosoma 1, secuencia completa gi 53717639 ref NC_006350.1 [53717639] |
| | NC_002947 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440, genoma completo gi 26986745 ref NC_002947.3 [26986745] |
| crotonasa | NC_000913 <i>Escherichia coli</i> K12, genoma completo gi 49175990 ref NC-000913.2 [49175990] |
| | NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, genoma completo gi 15893298 ref NC_003030.1 [15893298] |
| | Z99113 <i>Bacillus subtilis</i> , genoma completo (sección 10 de 21): de 1807106 a 2014934 gi 32468758 emb Z99113.2 BSUB0010[32468758] |
| | D88825 <i>Aeromonas caviae</i> , gen phaC para PHA sintasa, cds completa gi 2335048 dbj D88825.1 [2335048] |
| | NC_006274 <i>Bacillus cereus</i> ZK, genoma completo gi 52140164 ref NC_006274.1 [52140164] |
| | NC_004557 <i>Clostridium tetani</i> E88, genoma completo 28209834 ref NC_004557.1 [28209834] |
| butiril-CoA deshidrogenasa | NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, genoma completo gi 15893298 ref NC_003030.1 [15893298] |
| | AY741582 <i>Euglena gracilis</i> , mRNA de trans-2-enoil-CoA reductasa, cds completa gi 58201539 gb AY741582.1 [58201539] |
| reductasa | U37135 <i>Streptomyces collinus</i> , gen de crotonil-CoA reductasa (ccr), cds completa gi 1046370 gb U37135.1 SCU37135[1046370] |
| | AL939127 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2), genoma completo; segmento 24/29 gi 24429552 emb AL939127.1 SCO939127[244295 52] |
| | AP006716 <i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435, genoma completo gi 68445725 dbj AP006716.1 [68445725] |
| | NC_006274 <i>Bacillus cereus</i> ZK, genoma completo |

| Fuentes de genes de la ruta del 1-butanol | |
|---|--|
| Gen | Cita de GenBank |
| | gi 52140164 ref NC_006274.1 [52140164] |
| NC_004557 | NC_004557 <i>Clostridium tetani</i> E88, genoma completo gi 28209834 ref NC_004557.1 [28209834] |
| butiraldehído deshidrogenasa | AF157306 <i>Clostridium beijerinckii</i> cepa NRRL B593, proteína hipotética, aldehído deshidrogenasa (ald) acilante de coenzima A, acetoacetato: butirato/acetato coenzima A |
| | genes de transferasa (ctfA), acetoacetato:butirato/acetato coenzima A transferasa (ctfB), y acetoacetato descarboxilasa (adc), cds completa gi 47422980 gb AF157306.2 [47422980] |
| | NC_001988 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, plásmido pSOL1, secuencia completa gi 15004705 ref NC_001988.2 [15004705] |
| | AY251646 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> , operón sol, secuencia completa gi 31075382 gb AY251646.1 [31075382] |
| butanol deshidrogenasa | NC_001988 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 plásmido pSOL1, secuencia completa gi 15004705 ref NC_001988.2 [15004705] |
| | NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, genoma completo gi 15893298 ref NC_003030.1 [15893298] |
| | NC_000913 <i>Escherichia coli</i> K12, genoma completo gi 49175990 ref NC_000913.2 [49175990] |
| | NC_003198 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Typhi cepa CT18, genoma completo gi 16758993 ref NC_003198.1 [16758993] |
| | BX571966 <i>Burkholderia pseudomallei</i> cepa K96243, cromosoma 2, secuencia completa gi 52211453 emb BX571966.1 [52211453] |
| | Z99120 <i>Bacillus subtilis</i> , genoma completo (sección 17 de 21): de 3213330 a 3414388 gi 32468813 emb Z99120.2 BSUB0017 32468813 |
| | NC_003366 <i>Clostridium perfringens</i> cepa 13, genoma completo gi 18308982 ref NC_003366.1 [18308982] |
| | NC_004431 <i>Escherichia coli</i> CFT073, genoma completo gi 26245917 ref NC_004431.1 [26245917] |

Huéspedes microbianos para la producción de 1-butanol

Los huéspedes microbianos para la producción de 1-butanol pueden ser seleccionados de entre bacterias, cianobacterias, hongos filamentosos y levaduras. El huésped microbiano utilizado para la producción de 1-butanol es preferiblemente tolerante al 1-butanol para que el rendimiento no se vea limitado por la toxicidad del butanol. Los microbios que son metabólicamente activos en niveles de alto título de 1-butanol no son bien conocidos en la técnica. Aunque se han aislado mutantes tolerantes al butanol de clostridios disolventogénicos, se dispone de poca información en cuanto a la tolerancia de otras cepas bacterianas potencialmente útiles al butanol. La mayoría de los estudios sobre la comparación de la tolerancia a alcoholes en bacterias sugieren que el butanol es más tóxico que el etanol [de Cavalho et al., Microsc. Res. Tech. 64: 215-22 (2004), y Kabelitz et al., FEMS Microbiol. Lett. 220: 223-227 (2003)]. Tomas et al. [J. Bacteriol. 186: 2006-2018 (2004)] comunicaron que la producción de butanol durante la fermentación en *Clostridium acetobutylicum* puede verse limitada por la toxicidad del butanol. El efecto primario del butanol sobre *Clostridium acetobutylicum* es la alteración de las funciones de membrana [Hermann et al., Appl. Environ. Microbiol. 50: 1238-1243 (1985)].

Los huéspedes microbianos seleccionados para la producción de 1-butanol son preferiblemente tolerantes al 1-butanol y son capaces de convertir carbohidratos en 1-butanol. Los criterios para la selección de huéspedes

microbianos adecuados incluyen los siguientes: tolerancia intrínseca al 1-butanol, elevado índice de utilización de glucosa, disponibilidad de herramientas genéticas para manipulación génica, y capacidad para generar alteraciones cromosómicas estables.

- 5 Se pueden identificar cepas huésped adecuadas con tolerancia al 1-butanol mediante una exploración basada en la tolerancia intrínseca de la cepa. La tolerancia intrínseca de los microbios al 1-butanol puede ser medida determinando la concentración de 1-butanol que es responsable de una inhibición del índice de crecimiento del 50% (IC50) cuando se cultivan en un medio mínimo. Los valores de IC50 pueden ser determinados usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden cultivar los microbios de interés en presencia de cantidades variables de 1-butanol y se puede controlar el índice de crecimiento midiendo la densidad óptica a 600 nanómetros.
- 10 El tiempo de duplicación puede ser calculado a partir de la parte logarítmica de la curva de crecimiento y ser utilizado como una medida del índice de crecimiento. La concentración de 1-butanol que produce una inhibición del crecimiento de 50% puede ser determinada a partir de un gráfico del porcentaje de inhibición del crecimiento frente a la concentración de 1-butanol. Preferiblemente, la cepa huésped debería tener una IC50 para 1-butanol de más de aproximadamente 0,5% en peso/volumen.
- 15 El huésped microbiano para la producción de 1-butanol también debería utilizar glucosa a una velocidad elevada. La mayoría de los microbios son capaces de utilizar carbohidratos. Sin embargo, ciertos microbios ambientales no pueden utilizar carbohidratos con elevada eficacia y, por lo tanto, no serían huéspedes adecuados.

- La capacidad para modificar genéticamente el huésped es esencial para la producción de cualquier microorganismo recombinante. El modo de la tecnología para transferencia génica puede ser por electroporación, conjugación, transducción o transformación natural. Se dispone de una gran variedad de plásmidos para conjugación del huésped y de marcadores resistentes a fármacos. Los vectores de clonación se ajustan a los organismos huésped basándose en la naturaleza de marcadores de resistencia a antibióticos que pueden actuar en ese huésped.
- 20

- El huésped microbiano ha de ser además manipulado con objeto de inactivar rutas competitivas para el flujo de carbono suprimiendo diversos genes. Esto requiere la disponibilidad o bien de transposones para dirigir la inactivación o bien de vectores de integración cromosómica. Además, el huésped de producción debería ser sensible a la mutagénesis química para que se pudieran obtener mutaciones para mejorar la tolerancia intrínseca al 1-butanol.
- 25

- Basándose en los criterios anteriormente descritos, los huéspedes microbianos adecuados para la producción de 1-butanol incluyen, pero no se limitan a, miembros de los géneros *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* y *Saccharomyces*. Los huéspedes preferidos incluyen: *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus macerans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- 30

- 35 Construcción del huésped de producción

- Se pueden construir organismos recombinantes que contengan los genes necesarios que codifiquen la ruta enzimática para la conversión de un sustrato carbonado fermentable en 1-butanol, usando técnicas bien conocidas en este campo técnico. En la presente invención, los genes que codifican las enzimas de la ruta biosintética del 1-butanol, es decir, acetil-CoA acetiltransferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa y butanol deshidrogenasa, pueden ser aislados de diversas fuentes, como se describió anteriormente.
- 40

- Los métodos para obtener genes deseados de un genoma bacteriano son comunes y bien conocidos en la técnica de la biología molecular. Por ejemplo, si se conoce la secuencia del gen, se pueden crear bancos genómicos adecuados por digestión con endonucleasas de restricción y se pueden explorar con sondas complementarias a la secuencia génica deseada. Una vez que se ha aislado la secuencia, el DNA puede ser multiplicado usando métodos estándares de multiplicación dirigida con cebadores, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (Mullis, Patente de EE.UU. nº 4.683.202), para obtener cantidades de DNA adecuadas para transformación usando vectores apropiados. Las herramientas para la optimización de codones para expresión en un huésped heterólogo son fácilmente asequibles. Algunas herramientas para la optimización de codones son asequibles basándose en el contenido de GC del organismo huésped. En la Tabla 3 se da el contenido de GC de algunos huéspedes microbianos ejemplares.
- 45
- 50

Tabla 3

| Contenido de GC de huéspedes microbianos | |
|--|---------|
| Cepa | % de GC |
| <i>B. licheniformis</i> | 46 |
| <i>B. subtilis</i> | 42 |
| <i>C. acetobutylicum</i> | 37 |
| <i>E. coli</i> | 50 |
| <i>P. putida</i> | 61 |
| <i>A. eutrophus</i> | 61 |
| <i>Paenibacillus macerans</i> | 51 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 62 |
| <i>Brevibacillus</i> | 50 |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 50 |

Una vez que se han identificado y aislado los genes relevantes de la ruta, se pueden transformar con ellos adecuados huéspedes de expresión por medios bien conocidos en la técnica. Los vectores o casetes útiles para la transformación de una diversidad de células huésped son comunes y son comercialmente asequibles de compañías tales como EPICENTRE® (Madison, Wisconsin, EE.UU.), Invitrogen Corp. (Carlsbad, California, EE.UU.), Stratagene (La Jolla, California, EE.UU.) y New England Biolabs, Inc. (Beverly, Massachusetts, EE.UU.). Típicamente, el vector o el casete contienen secuencias que dirigen la transcripción y traducción del gen relevante, un marcador seleccionable, y secuencias que permiten la replicación autónoma o la integración cromosómica. Los vectores adecuados comprenden una región 5' del gen que contiene controles de iniciación de la transcripción, y una región 3' del fragmento de DNA que controla la terminación de la transcripción. Ambas regiones de control pueden proceder de genes homólogos con respecto a la célula huésped transformada, aunque se ha de entender que dichas regiones de control pueden también proceder de genes que no son nativos con respecto a la especie específica escogida como huésped de producción.

Los promotores o regiones de control de la iniciación, que son útiles para conducir la expresión de las regiones de codificación relevantes de la ruta en la célula huésped deseada, son numerosos y resultan familiares a los expertos en la técnica. Casi cualquier promotor capaz de conducir estos elementos genéticos es adecuado para la presente invención, incluyendo, pero sin limitarse a, *CYC1*, *HIS3*, *GAL1*, *GAL10*, *ADH1*, *PGK*, *PHO5*, *GAPDH*, *ADC1*, *TRP1*, *URA3*, *LEU2*, *ENO*, *TPI*, *CUP1*, *FBA*, *GPD* y *GPM* (útiles para expresión en *Saccharomyces*); *AOX1* (útil para expresión en *Pichia*); *lac*, *ara*, *tet*, *trp*, *IP_L*, *IP_R*, *T7*, *tac* y *trc* (útiles para expresión en *Escherichia coli*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas*); los promotores *amy*, *apr* y *npr* y diversos promotores de fago útiles para expresión en *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Paenibacillus macerans*; *nisA* (útil para expresión en bacterias Gram positivas [Eichenbaum et al., Appl. Environ. Microbiol. 64 (8): 2763-2769 (1998)]; y el promotor sintético P11 [útil para expresión en *Lactobacillus plantarum*; Rud et al., Microbiology 152: 1011-1019 (2006)].

Las regiones de control de la terminación pueden también proceder de diversos genes nativos con respecto a los huéspedes preferidos. Opcionalmente, puede ser innecesario un sitio de terminación; sin embargo, lo más preferido es incluirlo.

Ciertos vectores son capaces de replicarse en una gran variedad de bacterias huésped y pueden ser transferidos por conjugación. Se dispone de la secuencia completa y anotada de pRK404 y tres vectores relacionados, pRK437, pRK442 y pRK442(H). Se ha demostrado que estos derivados son herramientas valiosas para la manipulación genética en bacterias Gram negativas [Scott et al., Plasmid 50 (1): 74-79 (2003)]. Diversos derivados plasmídicos del plásmido Inc P4 RSF1010, que presenta amplia variedad de huéspedes, están también disponibles con promotores que pueden actuar en una diversidad de bacterias Gram negativas. Los plásmidos pAYC36 y pAYC37 tienen promotores activos junto con múltiples sitios de clonación que permiten la expresión de genes heterólogos en bacterias Gram negativas.

También se dispone en gran medida de herramientas para sustitución de genes cromosómicos. Por ejemplo, una variante termosensible del replicón pWV101 de amplia variedad de huéspedes ha sido modificada para construir un plásmido, pVE6002, que puede ser empleado para crear sustitución génica en una variedad de bacterias Gram positivas [Maguin et al., J. Bacteriol. 174 (17): 5633-5638 (1992)]. Además, se dispone de transposomas in vitro para

crear mutaciones aleatorias en una diversidad de genomas de fuentes comerciales tales como EPICENTRE®.

A continuación se describe con mayor detalle la expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en varios huéspedes microbianos preferidos.

Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *E. coli*

- 5 Los vectores o casetes útiles para la transformación de *E. coli* son comunes y son comercialmente asequibles de las compañías anteriormente enumeradas. Por ejemplo, los genes de la ruta biosintética del 1-butanol pueden ser aislados de diversas cepas de *Clostridium*, clonados en un vector pUC19 modificado y usados para transformar *E. coli* NM522, como se describe en el Ejemplo 11. En el Ejemplo 13 se describe la expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en varias cepas distintas de *E. coli*.

10 Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Rhodococcus erythropolis*

Se dispone de una serie de vectores lanzadera de *E. coli*-*Rhodococcus* para expresión en *R. erythropolis*, incluyendo, pero sin limitarse a, pRhBR17 y pDA71 [Kostichka et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 62: 61-68 (2003)]. Además, se dispone de una serie de promotores para expresión de genes heterólogos en *R. erythropolis* [véanse, por ejemplo, Nakashima et al., Appl. Environ. Microbiol. 70: 5557-5568 (2004), y Tao et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005, DOI 10.1007/s00253-005-0064]. Se puede crear una alteración génica dirigida de genes cromosómicos en *R. erythropolis* usando el método descrito por Tao et al., *supra*, y Brans et al. [Appl. Environ. Microbiol. 66: 2029-2036 (2000)].

- 15 Los genes heterólogos requeridos para la producción de 1-butanol, como se describió anteriormente, pueden ser clonados inicialmente en pDA71 o pRhBR71 y ser usados para transformar *E. coli*. Luego se puede transformar *R. erythropolis* con los vectores mediante electroporación, del modo descrito por Kostichka et al., *supra*. Se pueden cultivar los recombinantes en medio sintético que contiene glucosa y se puede seguir la producción de 1-butanol usando métodos conocidos en la técnica.

20 Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Bacillus subtilis*

- 25 Los métodos para la expresión génica y la creación de mutaciones en *B. subtilis* también son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los genes de la ruta biosintética del 1-butanol pueden ser aislados de diversas cepas de *Clostridium*, clonados en un vector pUC19 modificado y usados para transformar *Bacillus subtilis* BE1010, como se describe en el Ejemplo 12. Además, los seis genes de la ruta 1-biosintética pueden ser divididos en dos operones para expresión, como se describe en el Ejemplo 14. Los tres primeros genes de la ruta (*thl*, *hbd* y *crt*) se integraron en el cromosoma de *Bacillus subtilis* BE1010 [Payne y Jackson, J. Bacteriol. 173: 2278-2282 (1991)]. Los tres últimos genes (*EgTER*, *ald* y *bhdB*) fueron clonados en plásmidos de expresión y usados para transformar la cepa de *Bacillus* que porta los genes de 1-butanol integrados.

30 Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Bacillus licheniformis*

- 35 La mayoría de los plásmidos y vectores lanzadera que se replican en *B. subtilis* pueden ser utilizados para transformar *B. licheniformis* mediante transformación con protoplastos o electroporación. Por ejemplo, los genes requeridos para la producción de 1-butanol pueden ser clonados en derivados de plásmidos pBE20 o pBE60 [Nagarajan et al., Gene 114: 121-126 (1992)]. Los métodos para transformar *B. licheniformis* son conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, Fleming et al., Appl. Environ. Microbiol. 61 (11): 3775-3780 (1995)]. Los plásmidos contruidos para expresión en *B. subtilis* pueden ser también usados para transformar *B. licheniformis*, para producir un huésped microbiano recombinante que produzca 1-butanol.

40 Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Paenibacillus macerans*

Se pueden construir plásmidos como los anteriormente descritos para expresión en *B. subtilis* y utilizarlos para transformar *Paenibacillus macerans* mediante transformación con protoplastos, para producir un huésped microbiano recombinante que produzca 1-butanol.

Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Alcaligenes (Ralstonia) eutrophus*

- 45 Los métodos para la expresión génica y la creación de mutaciones en *Ralstonia eutrophus* son conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, Taghavi et al., Appl. Environ. Microbiol. 60 (10): 3585-3591 (1994)]. Los genes para la ruta biosintética del 1-butanol pueden ser clonados en cualquiera de los anteriormente descritos vectores de amplia variedad de huéspedes y ser utilizados en electroporación para generar recombinantes que produzcan 1-butanol. Se ha descrito con detalle la ruta del polihidroxibutirato en *Ralstonia* y se conoce una diversidad de técnicas genéticas para modificar el genoma de *Ralstonia eutrophus*, y estas herramientas pueden ser aplicadas para modificar la ruta biosintética del 1-butanol.

50 Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Pseudomonas putida*

Los métodos para la expresión génica en *Pseudomonas putida* son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo,

Ben-Bassat et al., Patente de EE.UU. nº 6.586.229). Por ejemplo, se pueden insertar los genes de la ruta del butanol en pPCU18 y se puede introducir este DNA ligado en células electrocompetentes de *Pseudomonas putida* DOT-T1 C5aAR1 para generar recombinantes que produzcan 1-butanol.

Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Saccharomyces cerevisiae*

- 5 Los métodos para la expresión génica en *Saccharomyces cerevisiae* son conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, Methods in Enzymology, Volumen 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology (Parte A, 2004, redactado por Christine Guthrie y Gerald R. Fink, Elsevier Academic Press, San Diego, California, EE.UU.). La expresión de genes en levaduras requiere típicamente un promotor, seguido del gen de interés, y un terminador de la transcripción. Se pueden utilizar diversos promotores de levadura en la construcción de casetes de expresión para genes que codifican la ruta biosintética del 1-butanol, incluyendo, pero sin limitarse a, los promotores constitutivos FBA, GPD y GPM y los promotores inducibles GAL1, GAL10 y CUP1. Los terminadores de la transcripción adecuados incluyen, pero no se limitan a, FBA_t, GPD_t, GPM_t, ERG10_t y GAL1_t. Los promotores y terminadores de la transcripción adecuados y los genes de la ruta biosintética del 1-butanol pueden ser clonados en plásmidos de 2 micrómetros (2 µm) de levadura, como se describe en el Ejemplo 17.

15 Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Lactobacillus plantarum*

- El género *Lactobacillus* pertenece a la familia Lactobacillales y, para *Lactobacillus*, se pueden emplear muchos plásmidos y vectores usados en la transformación de *Bacillus subtilis* y *Streptococcus*. Los ejemplos no restrictivos de vectores adecuados incluyen pAMβ1 y derivados del mismo [Renault et al., Gene 183: 175-182 (1996); y O'Sullivan et al., Gene 137: 227-231 (1993)]; pMBB1 y pHW800, un derivado de pMBB1 [Wyckoff et al., Appl. Environ. Microbiol. 62: 1481-1486 (1996)]; pMG1, un plásmido conjugativo [Tanimoto et al., J. Bacteriol. 184: 5800-5804 (2002)]; pNZ9520 [Kleerebezem et al., Appl. Environ. Microbiol. 63: 4581-4584 (1997)]; pAM401 [Fujimoto et al., Appl. Environ. Microbiol. 67: 1262-1267 (2001)]; y pAT392 [Arthur et al., Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1899-1903 (1994)]. También se han presentado varios plásmidos de *Lactobacillus plantarum* [por ejemplo, R. van Kranenburg, N. Golic, R. Bongers, R. J. Leer, W. M. de Vos, R. J. Siezen, M. Kleerebezem, Appl. Environ. Microbiol., marzo de 2005; 71 (3): 1223-1230]. Por ejemplo, en el Ejemplo 18 se describe la expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Lactobacillus plantarum*.

Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus faecalis*

- 30 El género *Enterococcus* pertenece a la familia Lactobacillales y, para *Enterococcus*, se pueden emplear muchos plásmidos y vectores usados en la transformación de *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus*. Los ejemplos no restrictivos de vectores adecuados incluyen pAMβ1 y derivados del mismo [Renault et al., Gene 183: 175-182 (1996); y O'Sullivan et al., Gene 137: 227-231 (1993)]; pMBB1 y pHW800, un derivado de pMBB1 [Wyckoff et al., Appl. Environ. Microbiol. 62: 1481-1486 (1996)]; pMG1, un plásmido conjugativo [Tanimoto et al., J. Bacteriol. 184: 5800-5804 (2002)]; pNZ9520 [Kleerebezem et al., Appl. Environ. Microbiol. 63: 4581-4584 (1997)]; pAM401 [Fujimoto et al., Appl. Environ. Microbiol. 67: 1262-1267 (2001)]; y pAT392 [Arthur et al., Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1899-1903 (1994)]. También se pueden emplear vectores de expresión para *E. faecalis* usando el gen *nisA* de *Lactococcus* [Eichenbaum et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 2763-2769 (1998)]. Además, se pueden emplear vectores para sustitución génica en el cromosoma de *E. faecium* [Nallaaparedy et al., Appl. Environ. Microbiol. 72: 334-345 (2006)]. Por ejemplo, en el Ejemplo 19 se describe la expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Enterococcus faecalis*.

Medios de fermentación

- Los medios de fermentación de la presente invención deben contener sustratos carbonados adecuados. Los sustratos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, monosacáridos tales como glucosa y fructosa, oligosacáridos tales como lactosa y sacarosa, polisacáridos tales como almidón y celulosa o mezclas de los mismos, y mezclas no purificadas de materias primas renovables tales como filtrado de suero de queso, extracto de embrión de maíz, melaza de remolacha azucarera, y malta de cebada. Además, el sustrato carbonado puede ser también un sustrato de un carbono tal como dióxido de carbono o metanol, para el cual se ha demostrado la conversión metabólica en productos intermedios bioquímicos esenciales. Se sabe también que, además de sustratos de uno y dos carbonos, los organismos metilótrofos utilizan diversos compuestos diferentes que contienen carbono, tales como metilamina, glucosamina y una diversidad de aminoácidos, para su actividad metabólica. Por ejemplo, se sabe que las levaduras metilótrofas utilizan el carbono de la metilamina para formar trehalosa o glicerol [Bellion et al., Microb. Growth C1 Compd. (Int. Symp.), 7º (1993), 415-32, redactado por J. Collin Murrel y Don P. Kelly; Editorial Intercept, Andover, Reino Unido]. Similarmente, varias especies de *Candida* metabolizan alanina o ácido oleico [Sulter et al., Arch. Microbiol. 153: 485-489 (1990)]. Por lo tanto, se contempla que la fuente de carbono utilizada en la presente invención pueda abarcar una gran variedad de sustratos que contienen carbono, y dicha fuente estará sólo limitada por la elección del organismo.

Aunque se contempla que todos los sustratos carbonados anteriormente mencionados y las mezclas de los mismos son adecuados en la presente invención, los sustratos carbonados preferidos son la glucosa, la fructosa y la

sacarosa.

Además de una fuente de carbono apropiada, los medios de fermentación deben contener minerales, sales, cofactores, tampones y otros componentes adecuados, conocidos por los expertos en la técnica, adecuados para el crecimiento de los cultivos y la promoción de la ruta enzimática necesaria para la producción de 1-butanol.

5 Condiciones de cultivo

Típicamente, las células se cultivan a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C en un medio apropiado. Los medios de cultivo adecuados de la presente invención son medios comunes comercialmente preparados, tales como caldo Luria Bertani (LB), caldo Sabouraud dextrosa (SD) y caldo de medio de levadura (YM; del inglés, yeast medium). También se pueden utilizar otros medios de cultivo definidos o sintéticos, y el medio apropiado para el cultivo del microorganismo particular será conocido por quien tiene experiencia en la técnica de la ciencia microbiológica o de fermentación. También se puede incorporar al medio de fermentación el uso de agentes conocidos por modular directa o indirectamente la represión por catabolitos, por ejemplo, adenosina-2',3'-monofosfato cíclico.

Los intervalos de pH adecuados para la fermentación están entre 5,0 y 9,0, prefiriéndose un pH de 6,0 a 8,0 como condición inicial.

Las fermentaciones pueden ser llevadas a cabo bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas, prefiriéndose las condiciones anaeróbicas o microaeróbicas.

La cantidad de 1-butanol producida en el medio de fermentación puede ser determinada utilizando diversos métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC; del inglés, high performance liquid chromatography) y cromatografía en fase gaseosa (GC; del inglés, gas chromatography).

Fermentaciones industriales discontinuas y continuas

En el procedimiento presente se emplea un método discontinuo de fermentación. Una fermentación discontinua clásica es un sistema cerrado donde la composición del medio es ajustada al comienzo de la fermentación y no es sometida a alteraciones artificiales durante la fermentación. De este modo, al comienzo de la fermentación, se inocula el organismo u organismos deseados al medio y se permite que tenga lugar la fermentación sin añadir nada al sistema. Sin embargo, típicamente, una fermentación "discontinua" es discontinua con respecto a la adición de fuente de carbono y a menudo se realizan intentos para controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. En sistemas discontinuos, las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en que se detiene la fermentación. En cultivos discontinuos, las células se moderan a través de una fase estática de latencia hasta una fase logarítmica de alto crecimiento y, finalmente, hasta una fase estacionaria donde el índice de crecimiento está reducido o detenido. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria finalmente morirán. Las células en la fase logarítmica son generalmente responsables de la mayor parte de la producción del producto final o el compuesto intermedio.

Una variación del sistema discontinuo estándar es el sistema de alimentación discontinua. Los procedimientos de fermentación con alimentación discontinua son también adecuados en la presente invención y comprenden un sistema discontinuo típico con la excepción de que el sustrato se añade en incrementos conforme avanza la fermentación. Los sistemas de alimentación discontinua son útiles cuando la represión por catabolitos es susceptible de inhibir el metabolismo de las células y cuando es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en los medios. La medición de la concentración real de sustrato en los sistemas de alimentación discontinua es difícil y, por lo tanto, es estimada basándose en los cambios de factores mensurables tales como el pH, el oxígeno disuelto y la presión parcial de gases de desecho tales como el CO₂. Las fermentaciones discontinuas y con alimentación discontinua son comunes y bien conocidas en la técnica, y se pueden hallar ejemplos de ellas en Thomas D. Brock en "Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Segunda Edición (1989), Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, EE.UU., o Mukund V. Deshpande, Appl. Biochem. Biotechnol. 36: 227 (1992).

Aunque la presente invención se lleva a cabo en modo discontinuo, se contempla que el método sea adaptable a métodos de fermentación continua. La fermentación continua es un sistema abierto donde se añade continuamente un medio de fermentación definido a un biorreactor y se extrae simultáneamente una cantidad igual de medio acondicionado para el procesamiento. En general, la fermentación continua mantiene los cultivos con una densidad elevada constante, estando esencialmente las células en crecimiento en fase logarítmica.

La fermentación continua permite la modulación de un factor o cualquier número de factores que afectan al crecimiento celular o a la concentración del producto final. Por ejemplo, en un método se mantendrá un nutriente limitante, tal como la fuente de carbono o el nivel de nitrógeno, en una relación fija y se permitirá que se moderen todos los demás parámetros. En otros sistemas, se pueden alterar continuamente diversos factores que afectan al crecimiento mientras se mantiene constante la concentración celular, medida por la turbidez del medio. En los sistemas continuos se procura mantener las condiciones de crecimiento en estado estacionario y, por lo tanto, la pérdida de células debida al medio que se extrae debe ser equilibrada con respecto al índice de crecimiento celular en la fermentación. Los métodos para modular nutrientes y factores de crecimiento para procesos de fermentación

continua así como las técnicas para maximizar la velocidad de formación de productos son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial, y en Brock, *supra*, se detalla una diversidad de métodos.

- Se contempla que la presente invención pueda ser llevada a la práctica usando procedimientos discontinuos, continuos o de alimentación discontinua y que cualquier modo de fermentación conocido sea adecuado. Además, se contempla que las células puedan ser inmovilizadas sobre un sustrato como catalizadores de célula completa y puedan ser sometidas a condiciones de fermentación para la producción de 1-butanol.

Métodos para el aislamiento de 1-butanol del medio de fermentación

- El 1-butanol bioproducido puede ser aislado del medio de fermentación usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden separar los sólidos del medio de fermentación mediante centrifugación, filtración, decantación o similar. A continuación, se puede aislar el 1-butanol del medio de fermentación, que ha sido tratado del modo anteriormente descrito para separar los sólidos, usando métodos tales como destilación, extracción líquido-líquido o separación basada en membranas. Puesto que el 1-butanol forma una mezcla azeotrópica de bajo punto de ebullición con el agua, la destilación sólo puede ser empleada para someter la mezcla a separación hasta su composición azeotrópica. Se puede utilizar la destilación en combinación con otro método de separación para obtener la separación cerca del azeótropo. Los métodos que pueden ser utilizados en combinación con la destilación para aislar y purificar 1-butanol incluyen, pero no se limitan a, decantación, extracción líquido-líquido, adsorción y técnicas basadas en membranas. Además, se puede aislar el 1-butanol usando destilación azeotrópica con un disolvente de arrastre ("entrainer") (véase, por ejemplo, Doherty y Malone, "Conceptual Design of Distillation Systems", McGraw Hill, New York, 2001).

- La mezcla de 1-butanol-agua forma un azeótropo heterogéneo, por lo que se puede utilizar la destilación en combinación con decantación para aislar y purificar el 1-butanol. En este método, el caldo de fermentación que contiene 1-butanol es sometido a destilación hasta cerca de la composición azeotrópica. A continuación, se condensa la mezcla azeotrópica y se separa el 1-butanol del medio de fermentación mediante decantación. La fase acuosa obtenida por decantación puede ser devuelta a la primera columna de destilación como reflujo. La fase orgánica obtenida por decantación y rica en 1-butanol puede ser adicionalmente purificada por destilación en una segunda columna de destilación.

- El 1-butanol puede ser también aislado del medio de fermentación usando extracción líquido-líquido en combinación con destilación. En este método, el 1-butanol es extraído del caldo de fermentación usando extracción líquido-líquido con un disolvente adecuado. La fase orgánica que contiene 1-butanol es luego sometida a destilación para separar el 1-butanol del disolvente.

- Se puede utilizar también destilación en combinación con adsorción para aislar 1-butanol del medio de fermentación. En este método, se somete el caldo de fermentación que contiene el 1-butanol a destilación hasta cerca de la composición azeotrópica y luego se separa el agua restante mediante el uso de un adsorbente, tal como tamices moleculares (Aden et al., "Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover, Report NREL/TP-510-32438, National Renewable Energy Laboratory, junio de 2002).

- Además, se puede utilizar destilación en combinación con pervaporación para aislar y purificar el 1-butanol del medio de fermentación. En este método, se somete el caldo de fermentación que contiene el 1-butanol a destilación hasta cerca de la composición azeotrópica y luego se separa el agua restante mediante pervaporación a través de una membrana hidrófila [Guo et al., J. Membr. Sci. 245, 199-210 (2004)].

Ejemplos

La presente invención es adicionalmente definida en los Ejemplos siguientes. Se ha de entender que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, sólo se proporcionan a modo de ilustración.

Métodos generales

- Las técnicas estándares de DNA recombinante y clonación molecular utilizadas en los Ejemplos son bien conocidas en este campo técnico y son descritas por J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989) (Maniatis); y por T. J. Silhavy, M. L. Bannan y L. W. Enquist, "Experiments with Gene Fusions", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1984); y por F. M. Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987).

- Los materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de cultivos bacterianos son bien conocidos en la técnica. Pueden hallarse técnicas adecuadas para uso en los ejemplos siguientes, como se exponen en "Manual of Methods for General Bacteriology" [redactado por Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Phillips), American Society for Microbiology, Washington, DC. (1994)] o por Thomas D. Brock en "Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology", Segunda Edición, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, EE.UU. (1989). Todos los reactivos, enzimas de

restricción y materiales empleados para el crecimiento y mantenimiento de células bacterianas se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.), BD Diagnostic Systems (Sparks, Maryland, EE.UU.), Life Technologies (Rockville, Maryland, EE.UU.), o Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, EE.UU.), a menos que se especifique otra cosa.

- 5 En la Tabla 4 se proporcionan los cebadores oligonucleotídicos usados para clonación en los Ejemplos siguientes. En la Tabla 5 se proporcionan los cebadores utilizados para secuenciar o explorar los genes clonados. Todos los cebadores oligonucleotídicos fueron sintetizados por Sigma-Genosys (Woodlands, Texas, EE.UU.).

Tabla 4

| Cebadores oligonucleotídicos de clonación | | | | |
|---|--------------------|--------------------------------------|--------------|---------------------|
| Gen | Nombre del cebador | Secuencia | ID. SEC. nº: | Descripción |
| <i>crt</i> | N3 | CACCATGGAACATAACAAT GTCATCCTTG | 17 | <i>crt</i> directo |
| <i>crt</i> | N4 | CCTCCTATCTATTTTTGAA GCCTTC | 18 | <i>crt</i> inverso |
| <i>hbd</i> | N5 | CACCATGAAAAAGGTATGT GTTATAGGT | 19 | <i>hbd</i> directo |
| <i>hbd</i> | N6 | CATTTGATAATGGGGATTC TTGT | 20 | <i>hbd</i> inverso |
| <i>thlA</i> | N7 | CACCATGAAAGAAGTTGTA ATAGCTAGTGC | 21 | <i>thlA</i> directo |
| <i>thlA</i> | N8 | CTAGCACTTTTCTAGCAAT ATTGCTG | 22 | <i>thlA</i> inverso |
| <i>bdhA</i> | N9 | CACCATGCTAAGTTTTGAT TATTCAATAC | 23 | <i>bdhA</i> directo |
| <i>bdhA</i> | N10 | TTAATAAGATTTTTTAAATA TCTCA | 24 | <i>bdhA</i> inverso |
| <i>bdhB</i> | N11 | CACCATGGTTGATTTTCGAA TATTCAATACC | 25 | <i>bdhB</i> directo |
| <i>bdhB</i> | N12 | TTACACAGATTTTTTGAATA TTTGT | 26 | <i>bdhB</i> inverso |
| <i>thlB</i> | N15 | CACCATGAGAGATGTAGTA ATAGTAAGTGCTG | 27 | <i>thlB</i> directo |
| <i>thlB</i> | N16 | CCGCAATTGTATCCATATT GAACC | 28 | <i>thlB</i> inverso |
| CAC0462 | N17 | CACCATGATAGTAAAAGCA AAGTTTG | 29 | CAC0462 directo |
| CAC0462 | N21 | GCTTAAAGCTTAAAACCGC TTCTGGCG | 30 | CAC0462 inverso |
| <i>ald</i> | N27F1 | CACCATGAATAAAGACACA CTAATACC | 31 | <i>ald</i> directo |
| <i>ald</i> | N28R1 | GCCAGACCATCTTTGAAAA TGCGC | 32 | <i>ald</i> inverso |

| Cebadores oligonucleotídicos de clonación | | | | |
|---|--------------------|--|--------------|---------------------|
| Gen | Nombre del cebador | Secuencia | ID. SEC. nº: | Descripción |
| <i>thlA</i> | N44 | CATGCATGCAAAGGAGGT AGTAGAATGAAAGAAG | 33 | <i>thlA</i> directo |
| <i>thlA</i> | N45 | GTCCTGCAGGGCGCGCCC AATACTTTCTAGCACTTTTC | 34 | <i>thlA</i> inverso |
| <i>hbd</i> | N42 | CATGTCGACAAAGGAGGT CTGTTTAATGAAAAAGGTA TG | 35 | <i>hbd</i> directo |
| <i>hbd</i> | N43 | GTCGCATGCCTTGTAACCT TATTTTGAA | 36 | <i>hbd</i> inverso |
| CAC0462 | N68 | CATAGATCTGGATCCAAAG GAGGGTGAGGAAATGATA GTAAAG | 37 | CAC0462 directo |
| CAC0462 | N69 | CATGTCGACGTGCAGCCTT TTTAAGGTTCT | 38 | CAC0462 inverso |
| <i>crt</i> | N38 | CATGAATTCACGCGTAAAG GAGGTATTAGTCATGGAAC | 39 | <i>crt</i> directo |
| <i>crt</i> | N39 | GTCGGATCCCTTACCTCCT ATCTATTTTG | 40 | <i>crt</i> inverso |
| <i>ald</i> | N58 | CATGCCCCGGGGTCAACCA AAGGAGGAATAGTTCATGA ATAAA | 41 | <i>ald</i> directo |
| <i>ald</i> | N59 | CATGGTTAACAAGAAGTTA GCCGGCAAGTACA | 42 | <i>ald</i> inverso |
| <i>bdhB</i> | N64 | CATGGTTAACAAGGAGG GGTAAATGGTTGATTC GAAT | 43 | <i>bdhB</i> directo |
| <i>bdhB</i> | N65 | CATGGCATGCGTTTAAACG TAGGTTTACACAGATTTT | 44 | <i>bdhB</i> inverso |
| -- | BenF | ACTTCTTTTCGCTGTTTC AC | 73 | -- |
| -- | BenMA R | CATGAAGCTTGCGCGGCC GGGACGCGTTTTTGAAAAT AATGAAAAC | 74 | -- |
| -- | BenBPR | CATGAAGCTTGTTTAAACT CGGTGACCTTGAAAATAAT GAAAACCTATATTGTTTGA AAATAATGAAAACCTATATT G | 75 | -- |
| EgTER(opt) | N85 | CATAGATCTGGATCCAAAG GAGGGTGAGGAAATGGCG ATGTTTACG | 80 | Egter directo |

ES 2 446 520 T3

| Cebadores oligonucleotídicos de clonación | | | | |
|---|-------------------------|--|--------------|----------------------|
| Gen | Nombre del cebador | Secuencia | ID. SEC. nº: | Descripción |
| EgTER(opt) | N86 | GTCGACTTACTGCTGGGC GG | 81 | Egter inverso |
| Ptrc-ald(opt) | T-Ptrc(Bsp EI) | TTCCGTA CTTCGGACGAC TGCACGGTGCACCAATGC TTCTG | 87 | Ptrc directo |
| Ptrc-ald(op) | B-aldopt(S cal) | CGGATCTTAAGTACTTTAA C CCGCCAGCACACAGCGGC GCTGG | 88 | ald inverso |
| ald | AF BamHI | CATTGGATCCATGAATAAA GACACACTAATACCTACAA C | 93 | ald directo |
| ald | AR Aat2 | CATGACGTCAGTAGTGTTA ACAAGAAGTTAGCCGGCA AG | 94 | ald inverso |
| EgTER | Forward 1(E) | CATGTTAACAAGGAGGAA AGATCTATGGCGATGTTTA CGACCACCGCAA | 95 | EgTER SOE directo |
| EgTER | Bottom Reverse I (E) | CCCCTCCTTTGGCGCGCC TTACTGCTGGGCGGCGCT CGGCAGA | 96 | EgTER SOE inverso |
| bdh | Top Forward 2 (B) | GCCCAGCAGTAAGGCGCG CCAAAGGAGGGTTAAAAT GGTTGATTTCGAAT | 97 | bdh SOE directo |
| bdh | Reverse 2 (B) | GTCGACGTCATACTAGTTT ACACAGATTTTTTGAATATT TGT | 98 | bdh SOE inverso |
| --- | Pamy/la cO F | CATTGTACAGAATTCGAGC TCTCGAGGCCCGCACAT ACGAAAAGAC | 99 | Pamy directo |
| --- | Pamy/la cO R | CATTGTACAGTTTAAACAT AGGTCACCCTCATTTTCGT AGGAATTGTTATCC | 100 | Pamy inverso |
| --- | Spac F | CATCTCGAGTAATTCTACA CAGCCCAGTCC | 101 | Pspac directo |
| --- | Spac R | CATGTTTAAACGGTGACCC AAGCTGGGGATCCGCGG | 102 | Pspac inverso |
| thl | Top TF | CATTGGTCACCATTCCCGG GCATGCAAAGGAGGTTAG TAGAATG | 103 | thl SOE directo |
| thl | Bot TR | CCTTTACGCGACCGGTACT AGTCAAGTCGACAGGGCG CGCCCAATACTTTC | 104 | thl SOE inverso |

ES 2 446 520 T3

| Cebadores oligonucleotídicos de clonación | | | | |
|---|--------------------|--|--------------|-------------------------|
| Gen | Nombre del cebador | Secuencia | ID. SEC. nº: | Descripción |
| crt | Top CF | CGCGCCCTGTGCACTTGA CTAGTACCGGTGCGGTAAA GGAGGTATTAGTCATGGAA C | 105 | crt SOE directo |
| crt | Bot CR | CATCGTTTAAACTTGGATC CAGATCCCTTACCTCCTAT | 106 | crt SOE inverso |
| ERG10-ERG10t | OT731 | AAAGCTGGAGCTCCACCG CGGTGGCGGCCGCTCTAG AAGTTTTCAAAGCAGAGTT TCGTTTGAATATTTTACCA | 164 | ERG10-ERG10t directo |
| ERG10-ERG10t | OT732 | TTCAATATGCATGCCTCAG AACGTTTACATTGTATCGA CTGCCAGAACCC | 165 | ERG10-ERG10t inverso |
| GAL1-GAL10 | OT733 | GCAGTCGATACAATGTAAA CGTTCTGAGGCATGCATAT TGAATTTTCAAAAATTCTTA CTTTTTTTTTGGATGGACG CA | 166 | GAL1-GAL10 directo |
| GAL1-GAL10 | OT734 | ACCTGCACCTATAACACAT ACCTTTTCCATGGTAGTTT TTTCTCCTTGACGTTAAAG TATAGAGGTATATTA | 167 | GAL1-GAL10 inverso |
| hbd | OT735 | AAAAACTACCATGGAAAAG GTATGTGTTATAGGTGCAG GTACTATGGGTTCAAGGAAT TGC | 168 | hbd directo |
| hbd | OT736 | GTAAAAAAGAAGGCCGT ATAGGCCTTATTTTGAATA ATCGTAGAAACCTTTTCCT GATTTTCTTCCAAG | 169 | hbd inverso |
| GAL1t | OT737 | ACGATTATTCAAATAAGG CCTATACGGCCTTCTTTTT TTTACTTTGTTTCAGAACAA CTTCTCATTTTTTCTACTC ATAA | 170 | GAL1t directo |
| GAL1t | OT738 | GAATTGGGTACCGGGCCC CCCTCGAGGTGACCGA TGCCTCATAAACTTCGGTA GTTATATTACTCTGAGAT | 171 | GAL1t inverso |
| thIA | OT797 | AAAGTAAGAATTTTGTAAA ATTCAATATGCATGCAAGA AGTTGTAATAGCTAGTGCA GTAAGAAC | 172 | thIA directo |

| Cebadores oligonucleotídicos de clonación | | | | |
|---|--------------------|--|--------------|-----------------------------|
| Gen | Nombre del cebador | Secuencia | ID. SEC. nº: | Descripción |
| thIA | OT798 | GAAAAAGATCATGAGAAAA TCGCAGAACGTAAGGCGC GCCTCAGCACTTTTCTAGC AATATTGCTGTTCTTG | 173 | thIA inverso |
| CUP1 | OT806 | CTCGAAAAATAGGGCGCGC CCCCATTACCGACATTGG GCGC | 174 | CUP1 directo |
| CUP1 | OT807 | ACTGCACTAGCTATTACAA CTTCTTGCATGCGTGATGA TTGATTGATTGATTGA | 175 | CUP1 inverso |
| promotor GPD | OT808 | TCGGTAATGGGGGCGCGC CCTATTTTCGAGGACCTTG TCACCTTGA | 176 | promotor GPD directo |
| promotor GPD | OT809 | TTTCGAATAAACACACATA AACAAACACCCCATGGAAA AGGTATGTGTTATAGGTGC AGG | 177 | promotor GPD inverso |
| promotor FBA1 | OT799 | TACCGGGCCCCCCTCGA GGTCGACGGCGGCCACT GGTAGAGAGCGACTTTGTA TGCCCCA | 178 | promotor FBA1 directo |
| promotor FBA1 | OT761 | CTTGGCCTTCACTAGCATG CTGAATATGTATTACTTGG TTATGGTTATATATGACAAA AG | 179 | promotor FBA1 inverso |
| promotor GPM1 | OT803 | CCCTCACTAAAGGGAACAA AAGCTGGAGCTCGATATC GGCGCGCCACATGCAGT GATGCACGCGCGA | 180 | promotor GPM1 directo |
| promotor GPM1 | OT804 | AAGGATGACATTGTTTAGT TCCATGGTTGTAATATGTG TGTTTGTTTG | 181 | promotor GPM1 inverso |
| crt | OT785 | CACACATATTACAACCATG GAACTAAACAATGTCATCC TTGAAAAGGAAGG | 182 | CRT directo |
| crt | OT786 | ATCATTCATTGGCCATTCA GGCCTTATCTATTTTGA GCCTTCAATTTTCTTTTCT CTATG | 183 | Crt inverso |
| terminador GPM1t | OT787 | CAAAAAATAGATAAGGCCTG AATGGCCAATGAATGATTT GATGATTTCTTTTCCCTC CATTTTT | 184 | terminador GPM1t directo |

| Cebadores oligonucleotídicos de clonación | | | | |
|---|--------------------|---|--------------|-----------------------------|
| Gen | Nombre del cebador | Secuencia | ID. SEC. nº: | Descripción |
| terminador GPM1t | OT805 | GAATTGGGTACCGGGCCC CCCCTCGAGGTGCACTTAT AGTATTATATTTTCTGATTT GGTTATAGCAAGCAGCGTT T | 185 | terminador GPM1t inverso |
| promotor GPD | OT800 | GGGAACAAAAGCTGGAGC TCCACCGCGGTGGGGCGC GCCCTATTTTCGAGGACCT TGTCACCTTGAGCC | 190 | promotor GPD directo |
| promotor GPD | OT758 | TTAAGGTATCTTTATCCAT GGTGTGTTGTTATGTGTGT TTATTCGAAACT | 191 | promotor GPD inverso |
| terminador GPD | OT754 | TTGGGTACCGGGCCCCC CTCGAGGTGCACTGGCCA TTAATCTTTCCCATAT | 192 | terminador GPD directo |
| terminador GPD | OT755 | TGTGTCCTAGCAGGTTAGG GCCTGCAGGGCCGTGAAT TTACTTTAAATCTTG | 193 | terminador GPD inverso |
| promotor FBA1 | OT760 | CGAAAATAGGGCGCGCCA CTGGTAGAGAGCGACTTT GTATGCCCAATTG | 194 | promotor FBA1 directo |
| promotor FBA1 | OT792 | CCCTTGACGAAGTTGGCCT TCACTAGCATGCTGAATAT GTATTACTTGGTTATGGTT ATATATGACAAAAG | 195 | promotor FBA1 inverso |
| terminador FBA1 | OT791 | CCCTTGACGAAGTTGGCCT TCACTAGCATGCTGAATAT GTATTACTTGGTTATGGTT ATATATGACAAAAG | 196 | terminador FBA1 directo |
| terminador FBA1 | OT765 | GGAACAAAAGCTGGAGCT CCACCGCGGTGGTTTAAC GTATAGACTTCTAATATATT TCTCCATACTTGGTATT | 197 | terminador FBA1 inverso |
| ldhL | LDH EcoRV F | GACGTCATGACCACCCGC CGATCCCTTTT | 198 | ldhL directo |
| ldhI | LDH AatII R | GATATCCAACACCAGCGAC CGACGTATTAC | 199 | ldhL inverso |
| Cm | Cm F | ATTTAAATCTCGAGTAGAG GATCCCAACAAACGAAAAT TGGATAAAG | 200 | Cm directo |

| Cebadores oligonucleotídicos de clonación | | | | |
|---|--------------------------|--|--------------|--------------------------|
| Gen | Nombre del cebador | Secuencia | ID. SEC. nº: | Descripción |
| Cm | Cm R | ACGCGTTATTATAAAAGCC AGTCATTAGG | 201 | Cm inverso |
| P11 | P11 F | TCGAGAGCGCTATAGTTGT TGACAGAATGGACATACTA TGATATATTGTTGCTATAG CGCCC | 202 | promotor P11 directo |
| P11 | P11 R | GGGCGCTATAGCAACAATA TATCATAGTATGTCCATTCT GTCAACAACCTATAGCGCTC | 203 | promotor P11 inverso |
| PldhL | PldhL F | GAGCTCGTCGACAAACCA ACATTATGACGTGTCTGGG C | 204 | promotor ldhL directo |
| PldhL | PldhL R | GGATCCTACCATGTTTGTG CAAAATAAGTG | 205 | promotor ldhL inverso |
| PnisA | F-PnisA (EcoRV) | TTCAGTGATATCGACATAC TTGAATGACCTAGTC | 206 | PnisA directo |
| PnisA | R-PnisA (P mel BamHI) | TTGATTAGTTTAACTGTA GGATCCTTTGAGTGCCTCC TTATAATTTA | 207 | PnisA inverso |

Tabla 5

| Cebadores de secuenciación y de exploración por PCR | | | |
|---|----------------------------------|----------------------|--------------|
| Nombre | Secuencia | Especificidad génica | ID. SEC. nº: |
| M13 Directo | GTAAAACGACGGCCAGT | vector TOPO | 45 |
| M13 Inverso | AACAGCTATGACCATG | vector TOPO | 46 |
| N7SeqF1 | GCAGGAGATGCTGACGTAATAA | <i>thlA</i> | 47 |
| N7SeqR1 | CCAACCTGCTTTTCAATAGCTGC | <i>thlA</i> | 48 |
| N15SeqF1 | CAGAGATGGGGTCAAAGAATG | <i>thlB</i> | 49 |
| N16SeqR1 | GTGGTTTTATTCCGAGAGCG | <i>thlB</i> | 50 |
| N5SeqF2 | GGTCTATACTTAGAATCTCC | <i>hbd</i> | 51 |
| N6SeqR2 | CGGAACAGTTGACCTTAATATGGC | <i>hbd</i> | 52 |
| N22SeqF1 | GCCTCATCTGGGTTTGGTCTTG | CAC0426 | 53 |
| N22SeqF2 | CGCCTAGGAGAAAGGACTATAAAA CTGG | CAC0426 | 54 |
| N22SeqF3 | CAGAGTTATAGGTGGTAGAGCC | CAC0426 | 55 |
| N23SeqR1 | CCATCCCGCTGTTCTATTCTTCT | CAC0426 | 56 |
| N23SeqR2 | CCAATCCTCTCCACCCATTACC | CAC0426 | 57 |

| Cebadores de secuenciación y de exploración por PCR | | | |
|---|--|----------------------|--------------|
| Nombre | Secuencia | Especificidad génica | ID. SEC. nº: |
| N23SeqR3 | CGTCCATCCTTAATCTTCCC | CAC0426 | 58 |
| N31SeqF2 | CCAACTATGGAATCCCTAGATGC | <i>ald</i> | 59 |
| N31SeqF3 | GCATAGTCTGCGAAGTAAATGC | <i>ald</i> | 60 |
| N31SeqF4 | GGATCTACTGGTGAAGGCATAACC | <i>ald</i> | 61 |
| N32SeqR1 | GTTAGCCGGCAAGTACACATC | <i>ald</i> | 72 |
| N32SeqR2 | GGCATCATGAGTTCTGTCATGAC | <i>ald</i> | 62 |
| N32SeqR3 | GCCTTCAATGATACTCTTACCAGCC | <i>ald</i> | 63 |
| N32SeqR4 | GCATTTCCAGCAGCTATCATGC | <i>ald</i> | 64 |
| N32SeqR5 | CCTTCCCATATGTGTTTCTTCC | <i>ald</i> | 65 |
| N11SeqF1 | GTTGAAGTAGTACTAGCTATAG | <i>bdhB</i> | 66 |
| N11SeqF2 | GACATAACACACGGCGTAGGGC | <i>bdhB</i> | 67 |
| N12SeqR1 | TAAGTGTACTIONCCAATTAGTG | <i>bdhB</i> | 68 |
| N12SeqR2 | GCCATCTAACACAATATCCCATGG | <i>bdhB</i> | 69 |
| N9SeqF1 | GCGATACATGGGACATGGTTAAAG | <i>bdhA</i> | 70 |
| N10SeqR1 | TGCACTTAACTCGTGTTCATA | <i>bdhA</i> | 71 |
| T7Primer | TAATACGACTCACTATAGGG | vector pET23 | 82 |
| Trc99aF | TTGACAATTAATCATCCGGC | vector pTRc99a | 83 |
| N5SeqF4 | GGTCAACTGTTCCGGAAATTC | <i>hbd</i> | 84 |
| T-ald (BamHI) | TGATCTGGATCCAAGAAGGAGCCC TTCACCATGAATAAAGACACAC | <i>ald</i> | 85 |
| B-ald (EgTER) | CATCGCCATTTCTCACCTCTTTT TTAGCCGGCAAGTACACATCTTCTT TGTC | <i>ald</i> | 86 |
| N3SeqF1 | CCATCATACCATACTGACCC | <i>crt</i> | 107 |
| N3SeqF2 | GCTACTGGAGCATTGCTCAC | <i>crt</i> | 108 |
| N3SeqF3 | CCATTAACAGCTGCTATTACAGGC | <i>crt</i> | 109 |
| N4SeqR3 | GGTCTCGGAATAACACCTGG | <i>crt</i> | 110 |
| N5SeqF3 | CAAGCTTCATAACAGGAGCTGG | <i>hbd</i> | 111 |
| N7SeqR2 | ATCCCACAATCCGTCACTGATC | <i>thIA</i> | 112 |
| N31SeqF1 | CTGAGATAAGAAAGGCCGCA | <i>ald</i> | 113 |
| N62SeqF2 | CAACCCTGGGCGTGTCTG | EgTER | 114 |
| N62SeqF3 | GTGGCGAAGATTGGGAAGCTG | EgTER | 115 |
| N62SeqF4 | GGGAAATGGCAGAAGATGTTACGC | EgTER | 116 |

| Cebadores de secuenciación y de exploración por PCR | | | |
|---|--------------------------|----------------------|--------------|
| Nombre | Secuencia | Especificidad génica | ID. SEC. nº: |
| N63SeqR1 | CGGTCTGATAACCTGCAAAATCGC | EgTER | 117 |
| N63SeqR2 | CACCAGCGCTTTGGCAACAAC | EgTER | 118 |
| N63SeqR3 | GAACGTGCATACAGACCTGCTTC | EgTER | 119 |
| N63SeqR4 | CGGCTGAATAACTTTTGCGG | EgTER | 120 |
| Pamy SeqF2 | GCCTTTGATGACTGATGATTGGC | vector pFP988 | 121 |
| Pamy SeqF | TCTCCGGTAAACATTACGGCAAAC | vector pFP988 | 122 |
| Pamy SeqR | CGGTCAGATGCAATTCGACATGTG | vector pFP988 | 123 |
| SpacF Seq | GAAGTGGTCAAGACCTCACT | promotor Pspac | 124 |
| sacB Up | CGGGTTTGTACTGATAAAGCAGG | sacB | 125 |
| sacB Dn | CGGTTAGCCATTTGCCTGCTTTTA | sacB | 126 |
| HT R | ACAAAGATCTCCATGGACGCGT | vector pHT01 | 127 |
| Scr1 | CCTTTCTTTGTGAATCGG | csc | 160 |
| Scr2 | AGAAACAGGGTGTGATCC | csc | 161 |
| Scr3 | AGTGATCATCACCTGTTGCC | csc | 162 |
| Scr4 | AGCACGGCGAGAGTCGACGG | csc | 163 |

Métodos para determinar la concentración de 1-butanol en medios de cultivo

Se puede determinar la concentración de 1-butanol en los medios de cultivo mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en un método específico de cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC) se utilizó una columna Shodex SH-1011 con una columna protectora Shodex SH-G, ambas adquiridas a Waters Corporation (Milford, Massachusetts, EE.UU.), con detección por índice de refracción (RI; del inglés, *refractive index*). La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando H₂SO₄ 0,01 M como fase móvil con un caudal de 0,5 ml/min y una temperatura de columna de 50 °C. El 1-butanol tenía un tiempo de retención de 52,8 minutos bajo las condiciones empleadas. Alternativamente, se dispone de métodos para cromatografía en fase gaseosa (GC). Por ejemplo, en un método específico de GC se utilizó una columna HP-INNOWax (30 m x 0,53 mm de diámetro interno, 1 µm de espesor de película; Agilent Technologies, Wilmington, Delaware, EE.UU.), con un detector de ionización por llama (FID; del inglés, *flame ionization detector*). El gas portador fue helio a un caudal de 4,5 ml/min, medido a 150 °C con presión de cabeza constante; la división del inyector era 1:25 a 200 °C; la temperatura del horno era 45 °C durante 1 minuto, de 45 a 220 °C a 10 °C/minuto, y 220 °C durante 5 minutos; y la detección con FID se realizó a 240 °C con 26 ml/minuto de helio como gas auxiliar. El tiempo de retención del 1-butanol fue 5,4 minutos. También se utilizó un método de GC similar usando una columna Varian CP-WAX 58 (FFAP) CB (25 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,2 µm de espesor de película; Varian, Inc., Palo Alto, California, EE.UU.).

El significado de las abreviaturas es el siguiente: "s" significa segundos, "min" significa minutos, "h" significa horas, "nm" significa nanómetros, "d" significa días, "µl" significa microlitros, "ml" significa mililitros, "l" significa litros, "mm" significa milímetros, "nm" significa nanómetros, "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "mmol" significa milimoles, "µmol" significa micromoles, "g" significa gramos, "µg" significa microgramos y "ng" significa nanogramos, "PCR" (del inglés, *polymerase chain reaction*) significa reacción en cadena de la polimerasa, "DO" significa densidad óptica, "DO₆₀₀" significa densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm, "DO₅₅₀" significa densidad óptica medida a una longitud de onda de 550 nm, "kDa" significa kilodáltones, "g" significa la constante de gravitación, "rpm" significa revoluciones por minuto, "bp" (del inglés, *base pairs*) significa pares de bases, "kbp" significa pares de kilobases, "% p/v" significa porcentaje en peso/volumen, "% v/v" significa porcentaje en volumen/volumen, "HPLC" significa cromatografía de alta eficacia en fase líquida, y "GC" significa cromatografía en fase gaseosa.

Ejemplo 1

Clonación y expresión de acetil-CoA acetiltransferasa

La finalidad de este Ejemplo fue hacer que se expresara la enzima acetil-CoA acetiltransferasa, a la que también se

hace referencia en esta memoria como acetoacetil-CoA tiolasa, en *E. coli*. El gen *thlA* de acetoacetil-CoA tiolasa fue clonado de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) y hecho expresar en *E. coli*. El gen *thlA* fue multiplicado a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) usando la PCR, lo que dio lugar a un producto de 1,2 kbp.

5 El DNA genómico de *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) fue obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Virginia, EE.UU.) o fue aislado de cultivos de *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824), como se describe más adelante.

10 Se preparó DNA genómico de *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) a partir de cultivos anaeróbicamente desarrollados. La cepa de *Clostridium* fue cultivada en 10 ml de medio de crecimiento clostridial [Lopez-Contreras et al., Appl. Env. Microbiol. 69 (2), 869-877 (2003)], en botellas Bellco para suero taponadas y selladas con cápsula, de 100 ml de capacidad (Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey, EE.UU.), en una cámara anaeróbica a 30 °C. El inóculo era una sola colonia de una placa YTG 2X (Kishii et al., Antimicrobial Agents & Chemotherapy 47 (1), 77-81 (2003)) cultivada en un dispositivo Anaeropak™ MGC de 2,5 l de capacidad (Mitsubishi Gas Chemical America Inc., New York, EE.UU.), a 37 °C.

15 Se preparó DNA genómico usando el kit Gentra Puregene® (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, EE.UU.; número de catálogo: D-6000A) con modificaciones en las instrucciones del fabricante [Wong et al., Current Microbiology 32, 349-356 (1996)]. Se multiplicó por PCR el gen *thlA* a partir de DNA genómico de *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) usando los cebadores N7 y N8 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 21 y 22, respectivamente. Otros reactivos para multiplicación por PCR fueron obtenidos de kits del fabricante, por ejemplo, DNA polimerasa Kod HiFi (Novagen Inc., Madison, Wisconsin, EE.UU.; número de catálogo: 71805-3), y fueron utilizados de acuerdo con el protocolo del fabricante. La multiplicación se llevó a cabo en un dispositivo termociclador de DNA GeneAmp 9700 (PE Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.).

25 Para los estudios de expresión se utilizó la tecnología de clonación Gateway (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, EE.UU.). El vector de entrada pENTR/SD/D-TOPO permitió una clonación direccional y proporcionó una secuencia Shine-Dalgarno para el gen de interés. El vector de destino pDEST14 empleaba un promotor de T7 para la expresión del gen sin etiqueta alguna. El cebador directo incorporaba cuatro bases (CACC) inmediatamente adyacentes al codón de inicio de la traducción para permitir la clonación direccional en pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen), para generar el plásmido pENTRSDD-TOPO $_{thlA}$. Se transformaron células *E. coli* Top10 (Invitrogen) con la construcción pENTR y se sembraron en placas de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se cultivaron durante la noche los transformantes y se preparó DNA plasmídico usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, California, EE.UU.; número de catálogo: 27106) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los clones fueron sometidos a secuenciación con los cebadores directo e inverso de M13 (véase la Tabla 5), proporcionados como ID. SEC. números 45 y 46, respectivamente, para confirmar que los genes estaban insertados en la orientación correcta y para confirmar la secuencia. Se necesitaron cebadores de secuenciación adicionales, N7SeqF1 y N7SeqR1 (véase la Tabla 5), proporcionados como ID. SEC. números 47 y 48, respectivamente, para secuenciar completamente el producto de PCR. Se proporcionan como ID. SEC. nº 1 e ID. SEC. nº 2, respectivamente, la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF; del inglés, open reading frame) para este gen y la prevista secuencia de aminoácidos de la enzima.

40 Para crear un clon de expresión, se transfirió el gen *thlA* al vector pDEST 14 mediante recombinación para generar pDEST14 $_{thlA}$. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14 $_{thlA}$. Se inocularon los transformantes a medio LB complementado con 50 µg/ml de ampicilina y se cultivaron durante la noche. Se utilizó una parte alícuota del cultivo nocturno para inocular a 50 ml de medio LB complementado con 50 µg/ml de ampicilina. El cultivo se incubó a 37 °C con sacudimiento hasta que la DO₆₀₀ alcanzó un valor de 0,6-0,8. Se dividió el cultivo en dos cultivos de 25 ml y se añadió arabinosa a uno de los matraces hasta una concentración final de 0,2% en peso. El matraz testigo negativo no fue sometido a inducción con arabinosa. Los matraces fueron incubados durante 4 horas a 37 °C con sacudimiento. Se recolectaron las células por centrifugación y se resuspendieron los sedimentos celulares de centrifugación en tampón de MOPS 50 mM, pH de 7,0. Las células se rompieron por sonicación o por paso a través de una prensa French. Se centrifugó el lisado de células completas para obtener el sobrenadante o extracto exento de células, y el sedimento de centrifugación o fracción insoluble. Una parte alícuota de cada fracción (lisado de células completas, extracto exento de células y fracción insoluble) fue resuspendida en tampón de carga (MES)-SDS (Invitrogen), calentada a 85 °C durante 10 minutos y sometida a un análisis por SDS-PAGE (gel de Bis-Tris al 4-12 % NuPAGE; número de catálogo: NP0322Box, Invitrogen). Una proteína del peso molecular esperado de aproximadamente 41 kDa, según se dedujo a partir de la secuencia de ácido nucleico, estaba presente en el cultivo inducido pero no en el testigo no inducido.

55 Se midió la actividad acetoacetil-CoA tiolasa en los extractos exentos de células como degradación de un complejo de Mg²⁺-acetoacetil-CoA controlando la disminución de la absorbancia a 303 nm. Las condiciones de ensayo estándares fueron Tris-HCl 100 mM, pH de 8,0, DTT (ditiotreitól) 1 mM y MgCl₂ 10 mM. Se dejó que se equilibrara el cóctel durante 5 minutos a 37 °C y luego se añadió el extracto exento de células. Se inició la reacción con la adición de acetoacetil-CoA 0,05 mM más CoA 0,2 mM. Se midió la concentración de proteína mediante el método Bradford o mediante el kit Bicinchoninic (Sigma; número de catálogo: BCA-1). En ambos casos se utilizó albúmina sérica bovina (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.) como patrón. En un ensayo típico, se determinó que la actividad específica de la proteína ThlA era 16,0 µmol mg⁻¹ min⁻¹ en el cultivo inducido frente a 0,27 µmol mg⁻¹ min⁻¹ en el

cultivo no inducido.

Ejemplo 2

Clonación y expresión de acetil-CoA acetiltransferasa

La finalidad de este Ejemplo fue hacer que se expresara la enzima acetil-CoA acetiltransferasa, a la que también se hace referencia en esta memoria como acetoacetil-CoA tiolasa, en *E. coli*. El gen *thlB* de acetoacetil-CoA tiolasa fue clonado de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) y hecho expresar en *E. coli*. El gen *thlB* fue multiplicado a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) usando la PCR.

Se clonó y expresó el gen *thlB* del mismo modo que el gen *thlA* descrito en el Ejemplo 1. Se multiplicó el DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando los cebadores N15 y N16 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 27 y 28, respectivamente, creándose un producto de 1,2 kbp. El cebador directo incorporaba cuatro bases (CCAC) inmediatamente adyacentes al codón de inicio de la traducción para permitir la clonación direccional en pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen), para generar el plásmido pENTRSDD-TOPO*thlB*. Los clones fueron sometidos a secuenciación con los cebadores directo e inverso de M13, proporcionados como ID. SEC. números 45 y 46, respectivamente, para confirmar que los genes estaban insertados en la orientación correcta y para confirmar la secuencia. Se necesitaron cebadores de secuenciación adicionales, N15SeqF1 y N16SeqR1 (véase la Tabla 5), proporcionados como ID. SEC. números 49 y 50, respectivamente, para secuenciar completamente el producto de PCR. Se proporcionan como ID. SEC. nº 3 e ID. SEC. nº 4, respectivamente, la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF) para este gen y la prevista secuencia de aminoácidos de la enzima.

Para crear un clon de expresión, se transfirió el gen *thlB* al vector pDEST 14 (Invitrogen) mediante recombinación para generar pDEST14*thlB*. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14*thlB* y se indujo la expresión desde el promotor de T7 mediante la adición de arabinosa. Una proteína del peso molecular esperado de aproximadamente 42 kDa, según se dedujo a partir de la secuencia de ácido nucleico, estaba presente en el cultivo inducido pero no en el testigo no inducido. Se llevaron a cabo ensayos enzimáticos como los descritos en el Ejemplo 1. En un ensayo típico, se determinó que la actividad específica de la proteína ThlB era $14,9 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo inducido frente a $0,28 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo no inducido.

Ejemplo 3

Clonación y expresión de 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa

La finalidad de este Ejemplo fue clonar el gen *hbd* de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) y hacer que se expresara en *E. coli*. El gen *hbd* fue multiplicado a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) usando la PCR.

Se clonó y expresó el gen *hbd* usando el método descrito en el Ejemplo 1. Se multiplicó el gen *hbd* a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando los cebadores N5 y N6 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 19 y 20, respectivamente, creándose un producto de 881 bp. El cebador directo incorporaba cuatro bases (CACC) inmediatamente adyacentes al codón de inicio de la traducción para permitir la clonación direccional en pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen), para generar el plásmido pENTRSDD-TOPO*hbd*. Los clones fueron sometidos a secuenciación con los cebadores directo e inverso de M13, proporcionados como ID. SEC. números 45 y 46, respectivamente, para confirmar que los genes estaban insertados en la orientación correcta y para confirmar la secuencia. Se necesitaron cebadores de secuenciación adicionales, N5SeqF2 y N6SeqR2 (véase la Tabla 5), proporcionados como ID. SEC. números 51 y 52, respectivamente, para secuenciar completamente el producto de PCR. Se proporcionan como ID. SEC. nº 5 e ID. SEC. nº 6, respectivamente, la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF) para este gen y la prevista secuencia de aminoácidos de la enzima.

Para crear un clon de expresión, se transfirió el gen *hbd* al vector pDEST 14 (Invitrogen) mediante recombinación para generar pDEST14*hbd*. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14*hbd* y se indujo la expresión desde el promotor de T7 mediante la adición de arabinosa, como se describió en el Ejemplo 1. Una proteína del peso molecular esperado de aproximadamente 31 kDa, según se dedujo a partir de la secuencia de ácido nucleico, estaba presente en el cultivo inducido pero estaba ausente en el testigo no inducido.

Se determinó la actividad hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa midiendo la velocidad de oxidación de NADH, según se mide por la disminución de la absorbancia a 340 nm. Una mezcla de ensayo estándar contenía MOPS 50 mM, pH de 7,0, DTT 0,1 mM y NADH 0,2 mM. Se dejó que se equilibrara el cóctel durante 5 minutos a 37 °C y luego se añadió el extracto exento de células. Se iniciaron las reacciones mediante la adición del sustrato, acetoacetil-CoA 0,1 mM. En un ensayo típico, se determinó que la actividad específica de la proteína BHBD era $57,4 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo inducido frente a $0,885 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo no inducido.

Ejemplo 4

Clonación y expresión de crotonasa

La finalidad de este Ejemplo fue clonar el gen *crt* de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) y hacer que se expresara en *E. coli*. El gen *crt* fue multiplicado a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) usando la PCR.

Se clonó y expresó el gen *crt* usando el método descrito en el Ejemplo 1. Se multiplicó el gen *crt* a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando los cebadores N3 y N4 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 17 y 18, respectivamente, creándose un producto de 794 bp. El cebador directo incorporaba cuatro bases (CACC) inmediatamente adyacentes al codón de inicio de la traducción para permitir la clonación direccional en pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen), para generar el plásmido pENTRSDD-TOPOcrt. Los clones fueron sometidos a secuenciación con los cebadores directo e inverso de M13, proporcionados como ID. SEC. números 45 y 46, respectivamente, para confirmar que los genes estaban insertados en la orientación correcta y para confirmar la secuencia. Se proporcionan como ID. SEC. nº 7 e ID. SEC. nº 8, respectivamente, la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF) para este gen y su prevista secuencia de aminoácidos.

Para crear un clon de expresión, se transfirió el gen *crt* al vector pDEST 14 (Invitrogen) mediante recombinación para generar pDEST14crt. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14crt y se indujo la expresión desde el promotor de T7 mediante la adición de arabinosa, como se describió en el Ejemplo 1. Una proteína del peso molecular esperado de aproximadamente 28 kDa, según se dedujo a partir de la secuencia de ácido nucleico, estaba presente en cantidades mucho mayores en el cultivo inducido que en el testigo no inducido.

Se examinó la actividad crotonasa del modo descrito por Stern [Methods Enzymol. 1 559-566 (1954)]. En un ensayo típico, se determinó que la actividad específica de la proteína crotonasa era 444 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo inducido frente a 47 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo no inducido.

Ejemplo 5

Clonación y expresión de butiril-CoA deshidrogenasa

La finalidad de este Ejemplo fue hacer que se expresara la enzima butiril-CoA deshidrogenasa, a la que también se hace referencia en esta memoria como trans-2-enoil-CoA reductasa, en *E. coli*. El gen CAC0462, un supuesto homólogo de trans-2-enoil-CoA reductasa, fue clonado de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) y hecho expresar en *E. coli*. El gen CAC0462 fue multiplicado a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) usando la PCR.

Se clonó y expresó el gen CAC0462 usando el método descrito en el Ejemplo 1. Se multiplicó el gen CAC0462 a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando los cebadores N17 y N21 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 29 y 30, respectivamente, creándose un producto de 1,3 kbp. El cebador directo incorporaba cuatro bases (CACC) inmediatamente adyacentes al codón de inicio de la traducción para permitir la clonación direccional en pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen), para generar el plásmido pENTRSDD-TOPOCAC0462. Los clones fueron sometidos a secuenciación con los cebadores directo e inverso de M13, proporcionados como ID. SEC. números 45 y 46, respectivamente, para confirmar que los genes estaban insertados en la orientación correcta y para confirmar la secuencia. Se necesitaron cebadores de secuenciación adicionales, N22SeqF1 (ID. SEC. nº 53), N22SeqF2 (ID. SEC. nº 54), N22SeqF3 (ID. SEC. nº 55), N23SeqR1 (ID. SEC. nº 56), N23SeqR2 (ID. SEC. nº 57) y N23SeqR3 (ID. SEC. nº 58) (véase la Tabla 5) para secuenciar completamente el producto de PCR. Se proporcionan como ID. SEC. nº 9 e ID. SEC. nº 10, respectivamente, la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF) para este gen y la prevista secuencia de aminoácidos de la enzima.

Para crear un clon de expresión, se transfirió el gen CAC0462 al vector pDEST 14 (Invitrogen) mediante recombinación para generar pDEST14CAC0462. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14CAC0462 y se indujo la expresión desde el promotor de T7 mediante la adición de arabinosa, como se describió en el Ejemplo 1. Un análisis mediante SDS-PAGE no mostró proteína sobreexpresada del esperado peso molecular en el testigo negativo ni en el cultivo inducido. El gen CAC0462 de *C. acetobutylicum* utilizaba muchos codones raros de *E. coli*. Para evitar problemas con la utilización de codones, se transformaron células BL21-AI que contenían el vector pDEST14CAC0462 con el plásmido pRARE (Novagen). Se repitieron los estudios de expresión con inducción por arabinosa con los cultivos que portaban el vector pRARE. Una proteína del peso molecular esperado de aproximadamente 46 kDa estaba presente en el cultivo inducido pero no en el testigo no inducido.

Se examinó la actividad trans-2-enoil-CoA reductasa del modo descrito por Hoffmeister et al. [J. Biol. Chem. 280, 4329-4338 (2005)]. En un ensayo típico, se determinó que la actividad específica de la proteína TER CAC0462 era 0,694 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo inducido frente a 0,0128 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo no inducido.

Ejemplo 6

Clonación y expresión de butiraldehído deshidrogenasa (acetilante)

La finalidad de este Ejemplo fue clonar el gen *ald* de *C. beijerinckii* (ATCC 35702) y hacer que se expresara en *E. coli*. El gen *ald* fue multiplicado a partir de DNA genómico de *C. beijerinckii* (ATCC 35702) usando la PCR.

Se clonó y expresó el gen *ald* usando el método descrito en el Ejemplo 1. Se multiplicó el gen *ald* a partir de DNA genómico de *C. beijerinckii* (ATCC 35702) (preparado a partir de cultivos anaeróbicamente desarrollados, como se

describió en el Ejemplo 1) por PCR usando los cebadores N27 F1 y N28 R1 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 31 y 32, respectivamente, creándose un producto de 1,6 kbp. El cebador directo incorporaba cuatro bases (CACC) inmediatamente adyacentes al codón de inicio de la traducción para permitir la clonación direccional en pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen), para generar el plásmido pENTRSDD-TOPOald. Los clones fueron sometidos a secuenciación con los cebadores directo e inverso de M13, proporcionados como ID. SEC. números 45 y 46, respectivamente, para confirmar que los genes estaban insertados en la orientación correcta y para confirmar la secuencia. Se necesitaron cebadores de secuenciación adicionales, N31SeqF2 (ID. SEC. nº 59), N31SeqF3 (ID. SEC. nº 60), N31SeqF4 (ID. SEC. nº 61), N32SeqR1 (ID. SEC. nº 72), N31SeqR2 (ID. SEC. nº 62), N31SeqR3 (ID. SEC. nº 63), N31SeqR4 (ID. SEC. nº 64) y N31SeqR5 (ID. SEC. nº 65) (véase la Tabla 5) para secuenciar completamente el producto de PCR. Se proporcionan como ID. SEC. nº 11 e ID. SEC. nº 12, respectivamente, la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF) para este gen y la prevista secuencia de aminoácidos de la enzima.

Para crear un clon de expresión, se transfirió el gen *ald* al vector pDEST 14 (Invitrogen) mediante recombinación para generar pDEST14ald. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14ald y se indujo la expresión desde el promotor de T7 mediante la adición de arabinosa, como se describió en el Ejemplo 1. Una proteína del peso molecular esperado de aproximadamente 51 kDa, según se dedujo a partir de la secuencia de ácido nucleico, estaba presente en el cultivo inducido pero no en el testigo no inducido.

Se determinó la actividad acilante aldehído deshidrogenasa controlando la formación de NADH, según se mide por el aumento de la absorbancia a 340 nm, del modo descrito por Husemann et al. [Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 435-444 (1989)]. En un ensayo típico, se determinó que la actividad específica de la proteína Ald era $0,106 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo inducido frente a $0,01 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo no inducido.

Ejemplo 7

Clonación y expresión de butanol deshidrogenasa

La finalidad de este Ejemplo fue clonar el gen *bdhB* de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) y hacer que se expresara en *E. coli*. El gen *bdhB* fue multiplicado a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) usando la PCR.

Se clonó y expresó el gen *bdhB* usando el método descrito en el Ejemplo 1. Se multiplicó el gen *bdhB* a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando los cebadores N11 y N12 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 25 y 26, respectivamente, creándose un producto de 1,2 kbp. El cebador directo incorporaba cuatro bases (CACC) inmediatamente adyacentes al codón de inicio de la traducción para permitir la clonación direccional en pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen), para generar el plásmido pENTRSDD-TOPObdhB. El codón de inicio de la traducción fue además cambiado de "GTG" a "ATG" por la secuencia del cebador. Los clones fueron sometidos a secuenciación con los cebadores directo e inverso de M13, proporcionados como ID. SEC. números 45 y 46, respectivamente, para confirmar que los genes estaban insertados en la orientación correcta y para confirmar la secuencia. Se necesitaron cebadores de secuenciación adicionales, N11SeqF1 (ID. SEC. nº 66), N11SeqF2 (ID. SEC. nº 67), N12SeqR1 (ID. SEC. nº 68) y N12SeqR2 (ID. SEC. nº 69) (véase la Tabla 5) para secuenciar completamente el producto de PCR. Se proporcionan como ID. SEC. nº 13 e ID. SEC. nº 14, respectivamente, la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF) para este gen y la prevista secuencia de aminoácidos de la enzima.

Para crear un clon de expresión, se transfirió el gen *bdhB* al vector pDEST 14 (Invitrogen) mediante recombinación para generar pDEST14bdhB. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14bdhB y se indujo la expresión desde el promotor de T7 mediante la adición de arabinosa, como se describió en el Ejemplo 1. Una proteína del peso molecular esperado de aproximadamente 43 kDa, según se dedujo a partir de la secuencia de ácido nucleico, estaba presente en el cultivo inducido pero no en el testigo no inducido.

Se determinó la actividad butanol deshidrogenasa a partir de la velocidad de oxidación de NADH, según se mide por la disminución de la absorbancia a 340 nm, del modo descrito por Husemann y Papoutsakis, *supra*. En un ensayo típico, se determinó que la actividad específica de la proteína BdhB era $0,169 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo inducido frente a $0,022 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo no inducido.

Ejemplo 8

Clonación y expresión de butanol deshidrogenasa

La finalidad de este Ejemplo fue clonar el gen *bdhA* de *C. acetobutylicum* 824 y hacer que se expresara en *E. coli*. El gen *bdhA* fue multiplicado a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* 824 usando la PCR.

- 5 Se clonó y expresó el gen *bdhA* usando el método descrito en el Ejemplo 1. Se multiplicó el gen *bdhA* a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* 824 por PCR usando los cebadores N9 y N10 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 23 y 24, respectivamente, creándose un producto de 1,2 kbp. El cebador directo incorporaba cuatro bases (CACC) inmediatamente adyacentes al codón de inicio de la traducción para permitir la clonación direccional en pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen), para generar el plásmido pENTRSDD-TOPObdhA. Los clones, proporcionados como ID. SEC. números 45 y 46, respectivamente, para confirmar que los genes estaban insertados en la orientación correcta y para confirmar la secuencia. Se necesitaron cebadores de secuenciación adicionales, N9SeqF1 (ID. SEC. nº 70 y N10SeqR1 (ID. SEC. nº 71) (véase la Tabla 5) para secuenciar completamente el producto de PCR. Se proporcionan como ID. SEC. nº 15 e ID. SEC. nº 16, respectivamente, la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF) para este gen y la prevista secuencia de aminoácidos de la enzima.

- Para crear un clon de expresión, se transfirió el gen *bdhA* al vector pDEST 14 (Invitrogen) mediante recombinación para generar pDEST14bdhA. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14bdhA y se indujo la expresión desde el promotor de T7 mediante la adición de arabinosa, como se describió en el Ejemplo 1. Una proteína del peso molecular esperado de aproximadamente 43 kDa, según se dedujo a partir de la secuencia de ácido nucleico, estaba presente en el cultivo inducido pero no en el testigo no inducido.

- Se determinó la actividad butanol deshidrogenasa a partir de la velocidad de oxidación de NADH, según se mide por la disminución de la absorbancia a 340 nm, del modo descrito por Husemann y Papoutsakis, *supra*. En un ensayo típico, se determinó que la actividad específica de la proteína BdhA era 0,102 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo inducido frente a 0,028 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el cultivo no inducido.

Ejemplo 9

Construcción de un vector de transformación para los genes de la ruta biosintética del 1-butanol – Ruta inferior

- Para construir un vector de transformación que comprenda los genes que codifican los seis pasos de la ruta biosintética del 1-butanol, los genes que codifican los 6 pasos de la ruta fueron divididos en dos operones. La ruta superior comprende los cuatro primeros pasos, catalizados por la acetil-CoA acetiltransferasa, la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, la crotonasa y la butiril-CoA deshidrogenasa. La ruta inferior comprende los dos últimos pasos, catalizados por la butiraldehído deshidrogenasa y la butanol deshidrogenasa.

La finalidad de este Ejemplo fue construir el operón de la ruta inferior. La construcción del operón de la ruta superior se describe en el Ejemplo 10.

- Se multiplicaron los genes individuales por PCR con cebadores que llevaban incorporados sitios de restricción para una clonación posterior, y los cebadores directos contenían un sitio optimizado de unión al ribosoma de *E. coli* (AAAGGAGG). Los productos de PCR fueron TOPO-clonados en el vector pCR4Blunt-TOPO y se utilizaron para transformar células *E. coli* Top10 (Invitrogen). Se preparó DNA plasmídico a partir de los clones TOPO y se verificó la secuencia de los genes. Se utilizaron enzimas de restricción y DNA ligasa de T4 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, EE.UU.) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para los experimentos de clonación, se purificaron los fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel usando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

- Después de la confirmación de la secuencia, los genes fueron subclonados en un vector pUC19 modificado como una plataforma de clonación. El vector pUC19 fue modificado mediante una digestión con HindIII/SapI, creándose pUC19dHS. La digestión separó el promotor lac adyacente al sitio de clonación múltiple (MCS; del inglés, multiple cloning site), evitándose la transcripción de los operones en el vector.

- Se multiplicó el gen *ald* a partir de DNA genómico de *C. beijerinckii* ATCC 35702 por PCR usando los cebadores N58 y N59 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 41 y 42, respectivamente, creándose un producto de 1,5 kbp. El cebador directo llevaba incorporados los sitios de restricción Aval y BstEII y un sitio de unión al ribosoma (RBS; del inglés, ribosome binding site). El cebador inverso llevaba incorporado el sitio de restricción HpaI. El producto de PCR fue clonado en pCRBlunt II-TOPO, creándose pCRBluntII-ald. Se preparó DNA plasmídico a partir de los clones TOPO y se verificó la secuencia de los genes con los cebadores M13 Directo (ID. SEC. nº 45), M13 Inverso (ID. SEC. nº 46), N31SeqF2 (ID. SEC. nº 59), N31SeqF3 (ID. SEC. nº 60), N31SeqF4 (ID. SEC. nº 61), N32SeqR1 (ID. SEC. nº 72), N31SeqR2 (ID. SEC. nº 62), N31SeqR3 (ID. SEC. nº 63), N31SeqR4 (ID. SEC. nº 64) y N31SeqR5 (ID. SEC. nº 65) (véase la Tabla 5).

- Se multiplicó el gen *bdhB* a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando los

cebadores N64 y N65 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 43 y 44, respectivamente, creándose un producto de 1,2 kbp. El cebador directo llevaba incorporados un sitio de restricción HpaI y un RBS. El cebador inverso llevaba incorporados un PmeI y un sitio de restricción SphI. El producto de PCR fue clonado en pCRBlunt II-TOPO, creándose pCRBluntII-bdhB. Se preparó DNA plasmídico a partir de los clones TOPO y se verificó la secuencia de los genes con los cebadores M13 Directo (ID. SEC. nº 45), M13 Inverso (ID. SEC. nº 46), N11SeqF1 (ID. SEC. nº 66), N11SeqF2 (ID. SEC. nº 67), N12SeqR1 (ID. SEC. nº 68) y N12SeqR2 (ID. SEC. nº 69) (véase la Tabla 5).

Para construir el operón de la ruta inferior, se ligaron conjuntamente un fragmento SphI y HpaI de 1,2 kbp de pCRBluntII-bdhB, un fragmento HpaI y SphI de 1,4 kbp de pCRBluntII-ald, y el fragmento grande de una digestión de pUC19dHS con Aval y SphI. La ligación de tres vías creó pUC19dHS-ald-bdhB.

El vector pUC19dHS-ald-bdhB fue digerido con BstEII y PmeI, liberándose un fragmento de 2,6 kbp que fue clonado en pBenBP, un vector lanzadera de *E. coli-Bacillus subtilis*. El plásmido pBenBP se creó por modificación del vector pBE93, que es descrito por Nagarajan, Documento WO 93/24631 (Ejemplo 4). El promotor de la proteasa neutra (NPR), la secuencia señal y el gen *phoA* de *Bacillus amyloliquefaciens* fueron separados de pBE93 mediante una digestión con NcoI/HindIII. El promotor NPR fue multiplicado por PCR de pBE93 mediante los cebadores BenF y BenBPR, proporcionados por las ID. SEC. números 73 y 75, respectivamente. El cebador BenBPR llevaba incorporados sitios BstEII, PmeI y HindIII cadena abajo del promotor. El producto de PCR fue digerido con NcoI y HindIII, y el fragmento fue clonado en los correspondientes sitios del vector pBE93 para crear pBenBP. El fragmento de operón inferior fue subclonado en los sitios BstEII y PmeI de pBenBP, creándose pBen-ald-bdhB.

Se llevaron a cabo ensayos de actividades butiraldehído deshidrogenasa y butanol deshidrogenasa sobre extractos crudos usando los métodos anteriormente descritos. Se demostraron ambas actividades enzimáticas en niveles superiores a los de la cepa testigo que contenía un vector vacío.

Ejemplo 10 (profético)

Construcción de un vector de transformación para los genes de la ruta biosintética del 1-butanol – Ruta superior

La finalidad de este Ejemplo profético es describir cómo ensamblar el operón de la ruta superior. El planteamiento general es igual al descrito en el Ejemplo 9.

Se multiplica el gen *thIA* a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando el par de cebadores N44 y N45 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 33 y 34, respectivamente, creándose un producto de 1,2 kbp. El cebador directo lleva incorporados un sitio de restricción SphI y un sitio de unión al ribosoma (RBS). El cebador inverso lleva incorporados sitios de restricción AclI y PstI. El producto de PCR es clonado en pCR4 Blunt-TOPO, creándose pCR4 Blunt-TOPO-thIA. Se prepara DNA plasmídico a partir de los clones TOPO y se verifica la secuencia de los genes con los cebadores M13 Directo (ID. SEC. nº 45), M13 Inverso (ID. SEC. nº 46), N7SeqF1 (ID. SEC. nº 47) y N7SeqR1 (ID. SEC. nº 48) (véase la Tabla 5).

Se multiplica el gen *hbd* a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando el par de cebadores N42 y N43 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 35 y 36, respectivamente, creándose un producto de 0,9 kbp. El cebador directo lleva incorporados un sitio de restricción SalI y un RBS. El cebador inverso lleva incorporado un sitio de restricción SphI. El producto de PCR es clonado en pCR4 Blunt-TOPO, creándose pCR4 Blunt-TOPO-hbd. Se prepara DNA plasmídico a partir de los clones TOPO y se verifica la secuencia de los genes con los cebadores M13 Directo (ID. SEC. nº 45), M13 Inverso (ID. SEC. nº 46), N5SeqF2 (ID. SEC. nº 51) y N6SeqR2 (ID. SEC. nº 52) (véase la Tabla 5).

El gen CAC0462 es optimizado en cuanto a codones para expresión en *E. coli* como huésped primario y *B. subtilis* como huésped secundario. El nuevo gen llamado CaTER, proporcionado como ID. SEC. nº 76, es sintetizado por GenScript Corp. (Piscataway, New Jersey, EE.UU.). El gen CaTER es clonado en el vector pUC57 como un fragmento BamHI-SalI e incluye un RBS, produciéndose el plásmido pUC57-CaTER.

Se multiplica el gen *crt* a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando el par de cebadores N38 y N39 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 39 y 40, respectivamente, creándose un producto de 834 bp. El cebador directo lleva incorporados sitios de restricción EcoRI y MluI y un RBS. El cebador inverso lleva incorporado un sitio de restricción BamHI. El producto de PCR es clonado en pCR4 Blunt-TOPO, creándose pCR4 Blunt-TOPO-crt. Se prepara DNA plasmídico a partir de los clones TOPO y se verifica la secuencia de los genes con los cebadores M13 Directo (ID. SEC. nº 45) y M13 Inverso (ID. SEC. nº 46) (véase la Tabla 5).

Después de la confirmación de la secuencia, los genes son subclonados en un vector pUC19 modificado como una plataforma de clonación. El vector pUC19 fue modificado mediante una digestión con SphI/SapI, creándose pUC19dSS. La digestión separó el promotor lac adyacente al MCS, evitándose la transcripción de los operones en el vector.

Para construir el operón de la ruta superior, se digiere pCR4 Blunt-TOPO-crt con EcoRI y BamHI, liberándose un

fragmento de *crt* de 0,8 kbp. También se digiere el vector pUC19dSS con EcoRI y BamHI, liberándose un fragmento de vector de 2,0 kbp. El fragmento de *crt* y el fragmento de vector son ligados entre sí utilizando DNA ligasa de T4 (New England Biolabs) para formar pUC19dSS-*crt*. Se inserta el gen CaTER en pUC19dSS-*crt* digiriendo pUC57-CaTER con BamHI y Sall, liberándose un fragmento de CaTER de 1,2 kbp. Se digiere pUC19dSS-*crt* con BamHI y Sall y se liga el fragmento grande del vector con el fragmento de CaTER, creándose pUC19dSS-*crt*-CaTER. Para completar el operón, se ligan un fragmento Sall y SphI de 884 bp de pCR4 Blunt-TOPO-hbd, un fragmento SphI y PstI de 1,2 kb de *thIA* de pCR4 Blunt-TOPO-*thIA*, y el fragmento grande de una digestión de pUC19dSS-*crt*-CaTER con Sall y PstI. El producto de la ligación de 3 vías es pUC19dSS-*crt*-CaTER-hbd-*thIA*.

Se digiere el vector pUC19dSS-*crt*-CaTER-hbd-*thIA* con MluI y Ascl, liberándose un fragmento de 4,1 kbp que es clonado en un derivado de pBE93 (Caimi, Documento WO 2004/018645, páginas 39-40), un vector lanzadera de *E. coli*-*B. subtilis*, al que se hace referencia como pBenMa. El plásmido pBenMA fue creado por modificación del vector pBE93. El promotor de la proteasa neutra (NPR), la secuencia señal y el gen *phoA* de *Bacillus amyloliquefaciens* son separados de pBE93 mediante una digestión con NcoI/HindIII. El promotor NPR es multiplicado por PCR de pBE93 mediante los cebadores BenF y BenMAR, proporcionados como ID. SEC. números 73 y 74, respectivamente. El cebador BenMAR lleva incorporados sitios MluI, Ascl y HindIII cadena abajo del promotor. El producto de PCR es digerido con NcoI y HindIII, y el fragmento es clonado en los correspondientes sitios del vector pBE93, creándose pBenMA. El fragmento de operón superior es subclonado en los sitios MluI y Ascl de pBenMa, creándose pBen-*crt*-hbd-CaTER-*thIA*.

Ejemplo 11 (profético)

Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *E. coli*

La finalidad de este Ejemplo profético es describir cómo hacer que se exprese la ruta biosintética del 1-butanol en *E. coli*.

Se transforma *E. coli* NM522 (ATCC 47000) con los plásmidos pBen-*crt*-hbd-CaTER-*thIA* y pBen-ald-bdhB, contruidos del modo descrito en los Ejemplos 10 y 9, respectivamente, y se controla la expresión de los genes en cada operón mediante análisis por SDS-PAGE, ensayo enzimático y análisis Western. Para los análisis Western, se generan anticuerpos hacia péptidos sintéticos en Sigma-Genosys (The Woodlands, Texas, EE.UU.). Después de la confirmación de la expresión de todos los genes, se digiere pBen-ald-bdhB con EcoRI y PmeI para liberar el fragmento de promotor NPR-ald-bdhB. La digestión del fragmento con EcoRI produce extremos romos al utilizar el fragmento Klenow de DNA polimerasa (New England Biolabs; número de catálogo: M0210S). El plásmido pBen-*crt*-hbd-CaTER-*thIA* es digerido con PvuII para crear un fragmento de vector linealizado de extremos romos. Se ligan el vector y el fragmento de NPR-ald-bdhB, creándose p1B1 O.1 y p1B1 O.2, que contienen la ruta biosintética completa del 1-butanol con el fragmento de promotor NPR-ald-bdhB en orientaciones opuestas. Se transforma *E. coli* NM522 con los plásmidos p1B1 O.1 y p1B1 O.2 y se controla la expresión de los genes del modo previamente descrito.

Se inocula la cepa NM522 de *E. coli*/p1B1 O.1 o NM522/ p1B1 O.1 a un matraz para sacudimiento de 250 ml de capacidad que contiene 50 ml de medio y se sacude el matraz a 250 rpm y 35 °C. El medio está compuesto de: 5 g/l de dextrosa; MOPS 0,05 M; sulfato amónico 0,01 M; fosfato potásico monobásico 0,005 M; mezcla S10 de metales al 1 % (v/v); extracto de levadura al 0,1 % (p/v); ácidos Casamino al 0,1 % (p/v); 0,1 mg/l de tiamina; 0,05 mg/l de prolina; y 0,002 mg/l de biotina; y es titulado hasta un pH de 7,0 con KOH. La mezcla S10 de metales contiene: MgCl₂ 200 mM, CaCl₂ 70 mM, MnCl₂ 5 mM, FeCl₃ 0,1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, hidrócloruro de tiamina 0,2 mM, CuSO₄ 172 µM, CoCl₂ 253 µM y Na₂MoO₄ 242 µM. Después de un periodo de 18 a 24 horas, se detecta 1-butanol mediante análisis por HPLC o GC, como se describe en la sección Métodos Generales.

Ejemplo 12 (profético)

Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Bacillus subtilis*

La finalidad de este Ejemplo profético es describir cómo hacer que se exprese la ruta biosintética del 1-butanol en *Bacillus subtilis*. Se utiliza un planteamiento igual al descrito en el Ejemplo 11.

Se utilizan los operones superior e inferior contruidos del modo descrito en los Ejemplos 10 y 9, respectivamente. Se transforma *Bacillus subtilis* BE1010 [J. Bacteriol. 173: 2278-2282 (1991)] con los plásmidos p1B1 O.1 y p1B1 O.2 y se controla la expresión de los genes en cada operón del modo descrito en el Ejemplo 11.

Se inocula la cepa B1010 de *B. subtilis*/p1B1 O.1 o BE1010/ p1B1 O.2 a un matraz para sacudimiento de 250 ml de capacidad que contiene 50 ml de medio y se sacude el matraz a 250 rpm y 35 °C durante 18 horas. El medio está compuesto de: 5 g/l de dextrosa; MOPS 0,05 M; ácido glutámico 0,02 M, sulfato amónico 0,01 M; tampón de fosfato potásico monobásico 0,005 M; mezcla S10 de metales (como la descrita en el Ejemplo 11) al 1 % (v/v); extracto de levadura al 0,1 % (p/v); ácidos Casamino al 0,1 % (p/v); 50 mg/l de triptófano; 50 mg/l de metionina; y 50 mg/l de lisina; y es titulado hasta un pH de 7,0 con KOH. Después de un periodo de 18 a 24 horas, se detecta 1-butanol mediante análisis por HPLC o GC, como se describe en la sección Métodos Generales.

Ejemplo 13

Producción de 1-butanol a partir de glucosa usando *E. coli* recombinante

En este Ejemplo se describe la producción de 1-butanol en *E. coli*. La expresión de los genes que codifican los 6 pasos de la ruta biosintética del 1-butanol fue dividida en tres operones. La ruta superior comprendía los cuatro primeros pasos codificados por *thlA*, *hbd*, *crt* y EgTER en un operón. El paso siguiente, codificado por *ald*, fue proporcionado por un segundo operón. El último paso de la ruta, codificado por *yqhD*, fue proporcionado en un tercer operón. Se demostró la producción de 1-butanol en cepas de *E. coli* que comprenden los tres operones.

A menos que se indique otra cosa en el texto, a los cebadores de clonación descritos en este Ejemplo se hace referencia por sus números de ID. SEC. en la Tabla 4, y a los cebadores de secuenciación y de exploración por PCR se hace referencia por sus números de ID. SEC. en la Tabla 5.

Acetil-CoA acetiltransferasa. Se multiplicó el gen *thlA* a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando el par de cebadores N44 y N45 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 33 y 34, respectivamente, creándose un producto de 1,2 kbp. El cebador directo llevaba incorporados un sitio de restricción SphI y un sitio de unión al ribosoma (RBS). El cebador inverso llevaba incorporados sitios de restricción AscI y PstI. El producto de PCR fue clonado en pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, EE.UU.), creándose pCR4Blunt-TOPO-*thlA*. Se preparó DNA plasmídico a partir de los clones TOPO y se verificó la secuencia de los genes con los cebadores M13 Directo (ID. SEC. nº 45), M13 Inverso (ID. SEC. nº 46), N7SeqF1 (ID. SEC. nº 47) y N7SeqR1 (ID. SEC. nº 48) (véase la Tabla 5).

3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. Se multiplicó el gen *hbd* a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando el par de cebadores N42 y N43 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 35 y 36, respectivamente, creándose un producto de 0,9 kbp. El cebador directo llevaba incorporados un sitio de restricción SalI y un RBS. El cebador inverso llevaba incorporado un sitio de restricción SphI. El producto de PCR fue clonado en pCR4Blunt-TOPO, creándose pCR4Blunt-TOPO-*hbd*. Se preparó DNA plasmídico a partir de los clones TOPO y se verificó la secuencia de los genes con los cebadores M13 Directo (ID. SEC. nº 45), M13 Inverso (ID. SEC. nº 46), N5SeqF2 (ID. SEC. nº 51) y N6SeqR2 (ID. SEC. nº 52) (véase la Tabla 5).

Crotonasa. Se multiplicó el gen *crt* a partir de DNA genómico de *C. acetobutylicum* (ATCC 824) por PCR usando el par de cebadores N38 y N39 (véase la Tabla 4), proporcionados como ID. SEC. números 39 y 40, respectivamente, creándose un producto de 834 bp. El cebador directo llevaba incorporados sitios de restricción EcoRI y MluI y un RBS. El cebador inverso llevaba incorporado un sitio de restricción BamHI. El producto de PCR fue clonado en pCR4Blunt-TOPO, creándose pCR4Blunt-TOPO-*crt*. Se preparó DNA plasmídico a partir de los clones TOPO y se verificó la secuencia de los genes con los cebadores M13 Directo (ID. SEC. nº 45) y M13 Inverso (ID. SEC. nº 46) (véase la Tabla 5).

Butiril-CoA deshidrogenasa (trans-2-enoil-CoA reductasa). Se sintetizó el gen CAC0462 para utilización potenciada de codones en *E. coli* como huésped primario y en *B. subtilis* como huésped secundario. El nuevo gen (CaTER, ID. SEC. nº 76) fue sintetizado y clonado por GenScript Corporation (Piscataway, New Jersey, EE.UU.) en el vector pUC57 como un fragmento BamHI-SalI e incluye un RBS.

Se sintetizó un gen alternativo para butiril-CoA deshidrogenasa a partir de *Euglena gracilis* (TER, nº de GenBank: Q5EU90) para utilización potenciada de codones en *E. coli* y *Bacillus subtilis*. El gen fue sintetizado y clonado por GenScript Corporation en pUC57, creándose pUC57::EgTER. Los cebadores N85 y N86 (ID. SEC. números 80 y 81, respectivamente) junto con pUC57::EgTER como DNA molde, proporcionaron un fragmento de PCR que comprendía 1224 bp de DNA de pUC57::EgTER. La secuencia de los 1224 bp se proporciona como ID. SEC. nº 77, donde los bp 1-1218 son la secuencia de codificación (cds) de EgTER(opt). EgTER(opt) es un gen TER optimizado en cuanto a codones, que carece de la presecuencia mitocondrial normal para ser funcional en *E. coli* [Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280: 4329 (2005)].

Se clonó EgTER(opt) en pCR4Blunt-TOPO y se confirmó su secuencia con los cebadores M13 Directo (ID. SEC. nº 45) y M13 Inverso (ID. SEC. nº 46). Se necesitaron los cebadores de secuenciación adicionales N62SeqF2 (ID. SEC. nº 114), N62SeqF3 (ID. SEC. nº 115), N62SeqF4 (ID. SEC. nº 116), N63SeqR1 (ID. SEC. nº 117), N63SeqR2 (ID. SEC. nº 118), N63SeqR3 (ID. SEC. nº 119) y N63SeqR4 (ID. SEC. nº 120) para secuenciar completamente el producto de PCR. La secuencia de EgTER(opt) de 1,2 kbp fue luego escindida con *HincII* y *PmeI* y fue clonada en pET23+ (Novagen) linealizado con *HincII*. La orientación del gen EgTER(opt) con respecto al promotor fue confirmada mediante una exploración de colonias por PCR con los cebadores T7Primer y N63SeqR2 (ID. SEC. números 82 y 118, respectivamente). Para los estudios de expresión, se transformó BL21 (DE3) con el plásmido resultante, pET23+::EgTER(opt).

Se examinó la actividad trans-2-enoil-CoA reductasa del modo descrito por Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280: 4329 (2005). En un ensayo típico, se determinó que la actividad específica de la proteína EgTER(opt) era 1,9 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en el cultivo inducido de BL21 (DE3)/pET23+::EgTER(opt) frente a 0,547 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en el cultivo no inducido.

El gen EgTER(opt) fue luego clonado en el vector pTrc99a bajo el control del promotor trc. El gen EgTER(opt) fue aislado como un fragmento *Bam*HI/*Sall* de 1287 bp de pET23+::EgTER(opt). El vector pTrc99a de 4,2 kbp fue linealizado con *Bam*HI/*Sall*. Se ligaron el vector y el fragmento, creándose pTrc99a-EgTER(opt) de 5,4 kbp. Se confirmaron los clones positivos mediante PCR de colonias con los cebadores Trc99aF y N63SeqR3 (ID. SEC. números 83 y 119, respectivamente), produciéndose un producto de 0,5 kb.

Construcción del plásmido pTrc99a-E-C-H-T que comprende genes que codifican acetil-CoA acetiltransferasa (*thlA*), 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (*hbd*), crotonasa (*crt*) y butiril-CoA deshidrogenasa [trans-2-enoil-CoA reductasa, EgTER(opt)]. Para iniciar la construcción de un operón de cuatro genes que comprende la ruta superior [EgTER(opt), *crt*, *hbd* y *thlA*], se digirió pCR4Blunt-TOPO-*crt* con *Eco*RI y *Bam*HI, liberándose un fragmento de *crt* de 0,8 kbp. También se digirió el vector pUC19dSS (descrito en el Ejemplo 10) con *Eco*RI y *Bam*HI, liberándose un fragmento de vector de 2,0 kbp. El fragmento de *crt* y el fragmento de vector fueron ligados entre sí utilizando DNA ligasa de T4 (New England Biolabs) para formar pUC19dSS-*crt*. Se insertó el gen CaTER en pUC19dSS-*crt* digiriendo pUC57-CaTER con *Bam*HI y *Sall*, liberándose un fragmento de CaTER de 1,2 kbp. Se digirió pUC19dSS-*crt* con *Bam*HI y *Sall* y se ligó el fragmento grande del vector con el fragmento de CaTER, creándose pUC19dSS-*crt*-CaTER. Para completar el operón, se ligaron un fragmento *Sall* y *Sph*I de 884 bp de pCR4Blunt-TOPO-*hbd*, un fragmento *Sph*I y *Pst*I de 1,2 kb de *thlA* de pCR4Blunt-TOPO-*thlA*, y el fragmento grande de una digestión de pUC19dSS-*crt*-CaTER con *Sall* y *Pst*I. El producto de la ligación de 3 vías fue denominado pUC19dSS-*crt*-CaTER-*hbd*-*thlA* o pUC19dss::Operon1.

Se obtuvo mayor actividad butiril-CoA deshidrogenasa de pTrc99a-EgTER(opt) que de construcciones de CaTER, por lo que se construyó un operón derivado de pTrc99a-EgTER(opt). Se separó el gen CaTER de pUC19dss::Operon1 digiriendo con *Bam*HI/*Sall* y purificando en gel el fragmento de vector de 5327 bp. El vector fue tratado con Klenow y fue vuelto a ligar, creándose pUC19dss::Operon 1 ΔCaTER. El fragmento de *crt*-*hbd*-*thlA* (C-H-T) de 2934 bp fue luego aislado como un fragmento *Eco*RI/*Pst*I de pUC19dss::Operon 1 ΔCaTER. El fragmento de C-H-T fue tratado con Klenow para hacer romos los extremos. Se digirió el vector pTrc99a-EgTER(opt) con *Sall* y se trataron los extremos con Klenow. El vector de extremos romos y el fragmento de C-H-T de extremos romos fueron ligados para crear pTrc99a-E-C-H-T. Se llevaron a cabo reacciones PCR de colonias con los cebadores N62SeqF4 y N5SeqF4 (ID. SEC. números 116 y 84, respectivamente) para confirmar la orientación del inserto.

Construcción de los plásmidos pBHR T7-ald y pBHR-Ptrc-ald(opt) que comprenden genes que codifican butiraldehído deshidrogenasa [*ald* y *ald*(opt)]. El operón PT7-ald fue subclonado de pDEST14-ald (Ejemplo 6) en el plásmido pBHR1 de amplia variedad de huéspedes (MoBitec, Goettingen, Alemania) para crear pBHR1 PT7-ald. El plásmido pBHR1 es compatible con plásmidos pUC19 o pBR322, por lo que se puede utilizar pBHR1 PT7-ald en combinación con derivados de pUC19 o pBR322 que portan el operón de la ruta superior para la producción de 1-butanol en *E. coli*. El plásmido pDEST14-ald fue digerido con *Bgl*II y fue tratado con el fragmento Klenow de DNA polimerasa para crear extremos romos. Luego se digirió el plásmido con *Eco*RI y se purificó en gel el fragmento de PT7-ald de 2245 bp. Se digirió el plásmido pBHR1 con *Scal* y *Eco*RI y se purificó en gel el fragmento de 4883 bp. El fragmento de PT7-ald fue ligado con el vector pBHR1, creándose pBHR T7-ald. La multiplicación de los transformantes mediante PCR de colonias con los cebadores T-ald(*Bam*HI) y B-ald(EgTER) (ID. SEC. números 85 y 86, respectivamente) confirmó el esperado producto de PCR de 1,4 kb. El mapeo de restricción de los clones pBHR T7-ald con *Eco*RI y *Drd*I confirmó los esperados fragmentos de 4757 y 2405 bp.

Para los ensayos de actividad butiraldehído deshidrogenasa, se transformaron células BL21Star™ (DE3) (Invitrogen) con el plásmido pBHR T7-ald y se indujo la expresión a partir del promotor de T7 mediante la adición de L-arabinosa, como se describió en el Ejemplo 1. Se determinó la actividad aldehído deshidrogenasa acilante controlando la formación de NADH, según se mide por el aumento de la absorbancia a 340 nm, como se describió en el Ejemplo 6.

Una secuencia de DNA alternativa para el gen *ald* de *Clostridium beijerinckii* ATCC 35702 fue sintetizada (optimizando para utilización de codones en *E. coli* y *Bacillus subtilis*) y clonada en pUC57 por GenScript Corporation (Piscataway, New Jersey, EE.UU.), creándose el plásmido pUC57-ald(opt). Se digirió pUC57-ald(opt) con *Sac*I y *Sall* para liberar un fragmento de 1498 bp que comprendía el gen optimizado en cuanto a codones, *ald*(opt), y un RBS ya para *E. coli*. La secuencia del fragmento de 1498 bp se proporciona como ID. SEC. n° 78.

Se digirió pTrc99a con *Sac*I y *Sall* obteniéndose un fragmento de vector de 4153 bp, que fue ligado con el fragmento de *ald*(opt) de 1498 bp para crear pTrc-ald(opt). La expresión del gen sintético, *ald*(opt), está bajo el control del promotor Ptrc inducible por IPTG.

El operón Ptrc-ald(opt) fue subclonado en el plásmido pBHR1 (MoBitec) de amplia variedad de huéspedes con objeto de que fuera compatible con el plásmido de la ruta superior anteriormente descrito. El fragmento de Ptrc-ald(opt) fue multiplicado por PCR a partir de pTrc99a::ald(opt) con T-Ptrc(*Bsp*EI) y B-ald(opt)(*Scal*) (ID. SEC. números 87 y 88, respectivamente) que llevaban incorporados sitios de restricción *Bsp*EI y *Scal* dentro de los correspondientes cebadores. El producto de PCR fue digerido con *Bsp*EI y *Scal*. Se digirió el plásmido pBHR1 con *Scal* y *Bsp*EI y se purificó en gel el fragmento de 4883 bp. El fragmento de Ptrc-ald(opt) fue ligado con el vector pBHR1, creándose pBHR-PcatPtrc-ald(opt). El mapeo de restricción de los clones pBHR-PcatPtrc-ald(opt) con *Scal* y *Bsp*EI confirmó los esperados fragmentos de 4883 y 1704 bp. Para separar la región del promotor cat portado por

el plásmido (Pcat), se digirió el plásmido pBHR-PcatPtrc-ald(opt) con BspEI y AatII y se purificó en gel el fragmento de 6172 bp. Se mezclaron T-BspEIAatII y B-BspEIAatII (ID. SEC. números 89 y 90, respectivamente) en una disolución que contenía NaCl 50 mM, Tris 10 mM-HCl y MgCl₂ 10 mM (pH de 7,9) hasta una concentración final de 100 µM y se hibridaron mediante una incubación a 75 °C durante 5 minutos y un lento enfriamiento hasta la temperatura ambiental. Los oligonucleótidos hibridados fueron ligados con el fragmento de 6172 bp, creándose pBHR-Ptrc-ald(opt).

Construcción de cepas de *E. coli* que expresan butanol deshidrogenasa (yqhD). *E. coli* contiene un gen nativo (yqhD) que fue identificado como una 1,3-propanodiol deshidrogenasa (Patente de EE.UU. nº 6.514.733). El gen yqhD tiene una identidad del 40% con el gen adhB de *Clostridium*, una probable butanol deshidrogenasa dependiente de NADH. El gen yqhD fue puesto bajo la expresión constitutiva de una variante del promotor 1.6GI de glucosa isomerasa (ID. SEC. nº 91) en la cepa MG1655 1.6yqhD::Cm de *E. coli* (Documento WO 2004/033646) usando la tecnología λ Red [Datsenko y Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 6640 (2000)]. Similarmente, el promotor nativo fue sustituido por el promotor 1.5GI (Documento WO 2003/089621) (ID. SEC. nº 92), creándose la cepa MG1655 1.5GI-yqhD::Cm, reemplazándose de este modo el promotor 1.6GI de MG1655 1.6yqhD::Cm por el promotor 1.5GI.

Se preparó un lisado de P1 a partir de MG1655 1.5GI-yqhD::Cm y se trasladó el casete a las cepas de expresión MG1655 (DE3), preparada a partir de la cepa MG1655 de *E. coli* y un kit de lisogenización lambda DE3 (Invitrogen), y BL21 (DE3) (Invitrogen), creándose MG1655 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm y BL21 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm, respectivamente.

Demostración de la producción de 1-butanol a partir de *E. coli* recombinante. Se transformó la cepa MG1655 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm de *E. coli* con los plásmidos pTrc99a-E-C-H-T y pBHR T7-ald para producir la cepa MG1655 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald. Se cultivaron inicialmente dos productos de aislamiento independientes en medio LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de carbenicilina. Se inocularon las células a matraces para sacudimiento (volumen total de aproximadamente 175 ml) que contenían 15, 50 y 150 ml de medio TM3a/glucosa (con antibióticos apropiados) para que representaran unas condiciones de alto, medio y bajo nivel de oxígeno, respectivamente. El medio TM3a/glucosa contenía (por litro): 10 g de glucosa, 13,6 g de KH₂PO₄, 2,0 g de monohidrato de ácido cítrico, 3,0 g de (NH₄)₂SO₄, 2,0 g de MgSO₄·7H₂O, 0,2 g de CaCl₂·2H₂O, 0,33 g de citrato férrico amónico, 1,0 mg de tiamina-HCl, 0,50 g de extracto de levadura y 10 ml de una disolución de oligoelementos, con el pH ajustado a 6,8 con NH₄OH. La disolución de oligoelementos contenía: ácido cítrico·H₂O (4,0 g/l), MnSO₄·H₂O (3,0 g/l), NaCl (1,0 g/l), FeSO₄·7H₂O (0,10 g/l), CoCl₂·6H₂O (0,10 g/l), ZnSO₄·7H₂O (0,10 g/l), CuSO₄·5H₂O (0,010 g/l), H₃BO₃ (0,010 g/l) y Na₂MoO₄·2H₂O (0,010 g/l). Los matraces recibieron el inóculo a una DO₆₀₀ de partida ≤ 0,01 unidades y fueron incubados a 34 °C con sacudimiento a 300 rpm. Los matraces que contenían 15 y 50 ml de medio fueron tapados con tapas ventiladas; los matraces que contenían 150 ml fueron tapados con tapas no ventiladas para minimizar el intercambio de aire. Se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,04 mM; la DO₆₀₀ de los matraces en el momento de la adición era ≥ 0,4 unidades.

Aproximadamente 15 horas después de la inducción, se analizó una parte alícuota del caldo en cuanto al contenido de 1-butanol mediante HPLC (columna Shodex Sugar SH1011) con detección por índice de refracción (RI) y mediante GC [columna Varian CP-WAX 58 (FFAP) CB, 25 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,2 µm de espesor de película] con detección por ionización por llama (FID), como se describe en la sección Métodos Generales. En la Tabla 6 se exponen los resultados de las determinaciones de 1-butanol.

Tabla 6

| Producción de 1-butanol por la cepa MG1655 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald de <i>E. coli</i> | | | |
|---|-------------------------|---------------|----------------------|
| Cepa | Nivel de O ₂ | 1-butanol, mM | Rendimiento molar, % |
| MG1655 a | alto | 0,11 | 0,2 |
| MG1655 b | alto | 0,12 | 0,2 |
| MG1655 a | medio | 0,13 | 0,3 |
| MG1655 b | medio | 0,13 | 0,2 |
| MG1655 a | bajo | 0,15 | 0,4 |
| MG1655 b | bajo | 0,18 | 0,5 |
| – Los valores se determinaron mediante un análisis por HPLC. – Los sufijos "a" y "b" de la cepa indican productos de aislamiento independientes. | | | |

Se examinaron los dos productos de aislamiento independientes de MG1655 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald en cuanto a la producción de 1-butanol de un modo idéntico salvo por que el medio contenía 5 g/l de extracto de levadura. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

| Producción de 1-butanol por la cepa MG1655 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald de <i>E. coli</i> | | | |
|--|-------------------------|---------------|----------------------|
| Cepa | Nivel de O ₂ | 1-butanol, mM | Rendimiento molar, % |
| MG1655 a | alto | – | – |
| MG1655 b | alto | – | – |
| MG1655 a | medio | 0,08 | 0,1 |
| MG1655 b | medio | 0,06 | 0,1 |
| MG1655 a | bajo | 0,14 | 0,3 |
| MG1655 b | bajo | 0,14 | 0,3 |
| – Se determinaron valores cuantitativos mediante un análisis por HPLC. – "–" = no detectado. – Los sufijos "a" y "b" de la cepa indican productos de aislamiento independientes. | | | |

- 5 Se transformó la cepa BL21 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm de *E. coli* con los plásmidos pTrc99a-E-C-H-T y pBHR T7-ald para producir la cepa BL21 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald. Se examinaron dos productos de aislamiento independientes en cuanto a la producción de 1-butanol de un modo exactamente igual al anteriormente descrito. Los resultados se presentan en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8

| Producción de 1-butanol por la cepa BL21 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald de <i>E. coli</i> | | | |
|--|-------------------------|---------------|----------------------|
| Cepa | Nivel de O ₂ | 1-butanol, mM | Rendimiento molar, % |
| DE a | alto | + | + |
| DE b | alto | – | – |
| DE a | medio | 0,80 | 1,4 |
| DE b | medio | 0,77 | 1,4 |
| DE a | bajo | 0,06 | 0,2 |
| DE b | bajo | 0,07 | 0,2 |
| – Se determinaron valores cuantitativos mediante un análisis por HPLC. – "–" indica no detectado. – "+" indica identificación cualitativa positiva por GC, con un menor límite de detección que por HPLC. – Los sufijos "a" y "b" de la cepa indican productos de aislamiento independientes. | | | |

Tabla 9

| Producción de 1-butanol por la cepa BL21 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald de <i>E. coli</i> | | | |
|--|-------------------------|---------------|----------------------|
| Cepa | Nivel de O ₂ | 1-butanol, mM | Rendimiento molar, % |
| DE a | alto | + | + |
| DE b | alto | + | + |
| DE a | medio | 0,92 | 1,7 |
| DE b | medio | 1,03 | 1,9 |
| DE a | bajo | + | + |
| DE b | bajo | + | + |
| – Se determinaron valores cuantitativos mediante un análisis por HPLC. – "-" indica no detectado. – "+" indica identificación cualitativa positiva por GC, con un menor límite de detección que por HPLC. – Los sufijos "a" y "b" de la cepa indican productos de aislamiento independientes. | | | |

Se transformó la cepa MG1655 1.5GI-yqhD::Cm de *E. coli* con los plásmidos pTrc99a-E-C-H-T y pBHR-Ptrc-ald(opt) para producir la cepa MG1655 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald(opt). Se cultivaron inicialmente dos productos de aislamiento en medio LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de carbenicilina. Se inocularon las células a matraces para sacudimiento (volumen total de aproximadamente 175 ml) que contenían 50 y 150 ml de medio TM3a/glucosa (con antibióticos apropiados). Los matraces recibieron el inóculo a una DO₅₅₀ de partida ≤ 0,04 unidades y fueron incubados del modo anteriormente descrito, con y sin inducción. Se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,4 mM; la DO₅₅₀ de los matraces en el momento de la adición estaba entre 0,6 y 1,2 unidades. En este caso, no fue necesaria inducción para la expresión de genes de la ruta del 1-butanol debido a la pérdida de actividad de los promotores inducibles por IPTG y a la naturaleza constitutiva del promotor 1.5GI; sin embargo, la inducción proporcionó un intervalo de expresión más amplio.

Aproximadamente 15 horas después de la inducción, se analizó una parte alícuota del caldo en cuanto al contenido de 1-butanol mediante GC con detección por ionización por llama, como se describió anteriormente. Los resultados se presentan en la Tabla 10. En cuanto a las cepas de *E. coli* recombinantes, se produjo 1-butanol en todos los casos; en experimentos independientes, se mostró que cepas de *E. coli* de tipo silvestre no producen 1-butanol detectable (datos no mostrados).

Tabla 10

| Producción de 1-butanol por la cepa MG1655 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald(opt) de <i>E. coli</i> | | | |
|--|-------------------------|---------------|--------------------|
| Cepa | Nivel de O ₂ | 1-butanol, mM | Inducción por IPTG |
| MG1655 a | medio | 0,14 | no |
| MG1655 b | medio | 0,14 | no |
| MG1655 a | medio | 0,03 | sí |
| MG1655 b | medio | 0,07 | sí |
| MG1655 a | bajo | 0,04 | no |

| Producción de 1-butanol por la cepa MG1655 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald(opt) de <i>E. coli</i> | | | |
|--|-------------------------|---------------|--------------------|
| Cepa | Nivel de O ₂ | 1-butanol, mM | Inducción por IPTG |
| MG1655 b | bajo | 0,04 | no |
| | | | |
| MG1655 a | bajo | 0,02 | sí |
| MG1655 b | bajo | 0,03 | sí |
| – Los sufijos "a" y "b" de la cepa indican productos de aislamiento independientes. | | | |

Ejemplo 14

Producción de 1-butanol a partir de glucosa usando *B. subtilis* recombinante

En este Ejemplo se describe la producción de 1-butanol en *Bacillus subtilis*. Los seis genes de la ruta 1-biosintética, que codifican seis actividades enzimáticas, fueron divididos en dos operones para expresión. Los tres primeros genes de la ruta (*thl*, *hbd* y *crt*) se integraron en el cromosoma de *Bacillus subtilis* BE1010 [Payne y Jackson, J. Bacteriol. 173: 2278-2282 (1991)]. Los tres últimos genes (*EgTER*, *ald* y *bdhB*) fueron clonados en un plásmido de expresión y usados para transformar la cepa de *Bacillus* que porta los genes de 1-butanol integrados.

A menos que se indique otra cosa en el texto, a los cebadores de clonación descritos en este Ejemplo se hace referencia por sus números de ID. SEC. en la Tabla 4, y a los cebadores de secuenciación y de exploración por PCR se hace referencia por sus números de ID. SEC. en la Tabla 5.

Plásmido de integración. El plásmido pFP988 es un vector de integración de *Bacillus* que contiene un replicón de pBR322 de *E. coli*, un marcador del antibiótico ampicilina para selección en *E. coli* y dos secciones de homología con respecto al gen *sacB* del cromosoma de *Bacillus* que dirige la integración del vector y la secuencia intermedia por recombinación homóloga. Entre las regiones de homología de *SacB* están el promotor Pamy y una secuencia señal que pueden dirigir la síntesis y la secreción de un gen clonado, una etiqueta de His, y eritromicina como un marcador seleccionable para *Bacillus*. El promotor Pamy y la secuencia señal son de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*. La región promotora también contiene la secuencia lacO para regulación de la expresión por una proteína represora de *lacI*. La secuencia de pFP988 (6509 bp) se proporciona como ID. SEC. nº 79.

Puesto que los genes de la ruta del 1-butanol se iban a expresar en el citoplasma, se suprimió la secuencia señal de amilasa. Se multiplicó el plásmido pFP988 con los cebadores Pamy/lacO F y Pamy/lacO R, creándose un producto de 317 bp (0,3 kbp) que contenía el promotor Pamy/lacO. El extremo 5' del cebador Pamy/lacO F llevaba incorporado un sitio de restricción BsrGI seguido de un sitio EcoRI. El extremo 5' del cebador Pamy/lacO R llevaba incorporado un sitio de restricción BsrGI seguido de un sitio de restricción PmeI. El producto de PCR fue TOPO-clonado en pCR4Blunt-TOPO, creándose pCR4Blunt-TOPO-Pamy/lacO. Se preparó DNA plasmídico a partir de cultivos nocturnos y se sometió a secuenciación con los cebadores M13 Directo y M13 Inverso (ID. SEC. nº 45 e ID. SEC. nº 46, respectivamente) para asegurar que no se había introducido mutación alguna en el promotor. Se digirió un clon de pCR4Blunt-TOPO-Pamy/lacO con BsrGI y se purificó en gel el fragmento de 0,3 kbp. Se digirió el vector pFP988 con BsrGI, lo que dio lugar a la supresión de 11 bp de la región 5' de homología de *sacB* y la separación del promotor Pamy/lacO y la secuencia señal y la etiqueta de His. El vector digerido con BsrGI, de 6 kbp, fue purificado en gel y fue ligado con el inserto de Pamy/lacO BsrGI. Los plásmidos resultantes fueron explorados con los cebadores Pamy SeqF2 y Pamy SeqR para determinar la orientación del promotor. El clon correcto tenía restablecido el promotor Pamy/lacO en su orientación original y fue denominado pFP988Dss.

Se construyó el casete con los genes *thl-crt* por ajuste mediante extensión por solapamiento (SOE; del inglés, *splicing by overlap extension*). Se multiplicaron los genes usando pUC19dss::Operon1 como molde. Los cebadores de *thl* fueron Top TF y Bot TR, produciéndose la multiplicación de un producto de 0,9 kbp. Los cebadores de *crt* fueron Top CF y Bot CR, produciéndose la multiplicación de un producto de 1,3 kbp. Se juntaron los dos genes mediante SOE con multiplicación por PCR usando los cebadores Top TF y Bot CR, generándose un producto de 2,1 kbp que fue TOPO-clonado en pCR4Blunt-TOPO, creándose pCR4Blunt-TOPO-T-C. Se sometieron los clones a secuenciación para confirmar la secuencia. Se digirió el plásmido pCR4Blunt-TOPO-T-C con BstEII y PmeI, liberándose un fragmento de 2,1 kbp que fue purificado en gel. El inserto fue tratado con polimerasa Klenow para despuntar el sitio BstEII. Se digirió el vector pFP988Dss con PmeI y se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternera (New England BioLabs) para evitar la autoligación. Se ligaron el fragmento de *thl-crt* de 2,1 kbp y el vector pFP988Dss digerido, y con ellos se transformaron células de *E. coli* Top10. Se exploraron los transformantes mediante multiplicación por PCR con Pamy SeqF2 y N7SeqR2 para un producto de 0,7 kbp; el producto correcto fue denominado pFP988Dss-T-C.

La construcción del casete *thl-crt* creó sitios únicos Sall y SspI entre los dos genes. Para añadir el gen *hbd* al casete,

el gen *hbd* fue subclonado de pCR4Blunt-TOPO-*hbd* como un fragmento Sall/SpeI de 0,9 kbp. Se digirió el vector pFP988Dss-T-C con Sall y SpeI y se purificó en gel el fragmento de vector de 8 kbp. Se ligaron el vector y el inserto de *hbd* y se utilizaron para transformar células de *E. coli* Top10. Se exploraron los transformantes mediante multiplicación por PCR con los cebadores Pamy SeqF y N3SeqF3 para un fragmento de 3,0 kbp. El plásmido resultante fue denominado pFP988Dss-T-H-C.

El promotor Pamy fue posteriormente sustituido por el promotor Pspac del plásmido pMUTIN4 [Vagner et al., Microbiol. 144: 3097-3104 (1998)]. El promotor Pspac fue multiplicado de pMUTIN4 con los cebadores Spac F y Spac R como un producto de 0,4 kbp y fue TOPO-clonado en pCR4Blunt-TOPO. Los transformantes fueron explorados en cuanto a la presencia de un inserto de 0,5 kbp mediante multiplicación por PCR con los cebadores M13 Directo y M13 Inverso. Los clones positivos fueron sometidos a secuenciación con los mismos cebadores. Se digirió el plásmido pCR4Blunt-TOPO-Pspac con SmaI y XhoI y se purificó en gel el fragmento de 0,3 kbp. Se digirió el vector pFP988Dss-T-H-C con SmaI y XhoI y se aisló el vector de 9 kbp mediante purificación en gel. Se ligaron el vector y el inserto de Pspac digeridos y se utilizaron para transformar células de *E. coli* Top10. Los transformantes fueron explorados mediante multiplicación por PCR con los cebadores SpacF Seq y N7SeqR2. Los clones positivos proporcionaron un producto de 0,7 kbp. Se preparó DNA plasmídico a partir de los clones positivos y se exploró adicionalmente mediante multiplicación por PCR con los cebadores SpacF Seq y N3SeqF2. Los clones positivos proporcionaron un producto de PCR de 3 kbp y fueron denominados pFP988DssPspac-T-H-C.

Integración en *B. subtilis* BE1010 para formar *B. subtilis* Δ sacB::T-H-C::erm #28 que comprende genes *thl*, *hbd* y *crt* exógenos. Se prepararon células competentes de *B. subtilis* BE1010 del modo descrito por Doyle et al., J. Bacteriol. 144: 957-966 (1980). Se recolectaron células competentes mediante centrifugación y se resuspendieron los sedimentos celulares de centrifugación en un pequeño volumen del sobrenadante celular. A 1 volumen de células competentes se añadieron 2 volúmenes de medio SPII-EGTA ["Methods for General and Molecular Bacteriology", redactado por P. Gerhardt, American Society for Microbiology, Washington, DC, EE.UU. (1994)]. Se distribuyeron partes alícuotas de 0,3 ml de células en tubos de ensayo y se añadió el plásmido pFP988DssPspac-T-H-C a los tubos. Se incubaron las células durante 30 minutos a 37 °C con sacudimiento, después de lo cual se añadieron 0,1 ml de extracto de levadura al 10% a cada tubo y se incubaron adicionalmente las células durante 60 minutos. Se sembraron los transformantes para selección en placas de LB-eritromicina usando el método de doble capa de agar ("Methods for General and Molecular Bacteriology", *supra*). Los transformantes fueron inicialmente explorados mediante multiplicación por PCR con los cebadores Pamy SeqF y N5SeqF3. Los clones positivos que multiplicaron el esperado producto de PCR de 2 kbp fueron adicionalmente explorados mediante multiplicación por PCR. Si la inserción del casete en el cromosoma se hubiera producido por medio de un proceso de doble entrecruzamiento, el conjunto de cebadores sacB Up y N7SeqR2 y el conjunto de cebadores sacB Dn y N4SeqR3 multiplicarían entonces unos productos de 1,7 kbp y 2,7 kbp, respectivamente. Se identificó un clon positivo, y fue denominado *B. subtilis* Δ sacB::T-H-C::erm #28.

Expresión plasmídica de los genes *EgTER*, *ald* y *bdhB*. Los tres genes restantes del 1-butanol se expresaron a partir del plásmido pHT01 (MoBitec). El plásmido pHT01 es un vector lanzadera de *Bacillus-E. coli* que se replica a través de un mecanismo theta. Las proteínas clonadas se expresan a partir del promotor GroEL fusionado con una secuencia *lacO*. Cadena abajo de la secuencia *lacO* está el eficaz RBS del gen *gsiB* seguido de un MCS. Se multiplicó el gen *ald* mediante PCR con los cebadores AF BamHI y AR Aat2 usando pUC19dHS-*ald*-*bdhB* (descrito en el Ejemplo 9) como molde, creándose un producto de 1,4 kbp. El producto fue TOPO-clonado en pCR4-TOPO y fue utilizado para transformar células de *E. coli* Top10. Se exploraron los transformantes con los cebadores M13 Directo y M13 Inverso. Los clones positivos multiplicaron un producto de 1,6 kbp. Se sometieron los clones a secuenciación con los cebadores M13 Directo y M13 Inverso, N31SeqF2, N31SeqF3, N32SeqR2, N32SeqR3 y N32SeqR4. El plásmido fue denominado pCR4TOPO-B/A-*ald*.

Se digirieron tanto el vector pHT01 como el plásmido pCR4TOPO-B/A-*ald* con BamHI y AatII. Se ligaron conjuntamente el fragmento de vector de 7,9 kbp y el fragmento de *ald* de 1,4 kbp para crear pHT01-*ald*. Se transformaron células de *E. coli* Top10 con el producto de ligación y se exploraron los transformantes en cuanto a un producto de 1,3 kbp mediante multiplicación por PCR con los cebadores N31SeqF1 y HT R.

Para añadir los dos últimos pasos de la ruta al vector pHT01, se diseñaron dos esquemas de clonación. Para ambos esquemas, se multiplicaron conjuntamente *EgTER* y *bdhB* mediante SOE. Posteriormente, el fragmento de *EgTER*-*bdhB* fue clonado en pHT01-*ald* creándose pHT01-*ald*-EB o fue clonado en pCR4-TOPO-B/A-*ald* creándose pCR4-TOPO-*ald*-EB. El fragmento de *ald*-*Egter*-*bdhB* del vector TOPO fue luego clonado en pHT01, creándose pHT01-AEB.

Se multiplicó un fragmento de *EgTER*-*bdhB* por PCR usando los cebadores Directo 1 (E) e Inverso 2 (B), usando el DNA molde proporcionado como ID. SEC. nº 208. El producto de PCR de 2,5 kbp resultante fue TOPO-clonado en pCR4Blunt-TOPO, creándose pCR4Blunt-TOPO-E-B. Se transformaron células de *E. coli* TOP10 con el producto de reacción TOPO. Se exploraron las colonias con los cebadores M13 Directo y M13 Inverso mediante multiplicación por PCR. Los clones positivos generaron un producto de 2,6 kbp. Los clones de pCR4Blunt-TOPO-E-B fueron sometidos a secuenciación con los cebadores M13 Directo e Inverso, N62SeqF2, N62SeqF3, N62SeqF4, N63SeqR1, N63SeqR2, N63SeqR3, N11SeqF1 y N11SeqF2, N12SeqR1 y N12SeqR2.

Se digirió el plásmido pCR4Blunt-TOPO-E-B con HpaI y AatII para liberar un fragmento de 2,4 kbp. El fragmento de E-B fue tratado con polimerasa Klenow para despuntar el extremo y fue luego purificado en gel. Se digirió el plásmido pHT01-ald con AatII y se trató con polimerasa Klenow para despuntar los extremos. El vector fue luego tratado con fosfatasa alcalina intestinal de ternera y fue purificado en gel. Se ligó el fragmento de E-B con el vector pHT01-ald linealizado y se utilizó el producto de ligación para transformar células de *E. coli* Top10, realizándose la selección en placas LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina. Los transformantes fueron explorados mediante multiplicación por PCR con los cebadores N3SeqF1 y N63SeqR1 para obtener un producto de 2,4 kbp. Se transformaron células JM103, una cepa *recA*⁺ de *E. coli*, con el plásmido resultante, pHT01-ald-EB. Los plásmidos preparados a partir de cepas *recA*⁺ forman más multímeros que las cepas *recA*⁻. El *Bacillus subtilis* se transforma más eficazmente con multímeros plasmídicos que con monómeros ("Methods for General and Molecular Bacteriology", *supra*). Se preparó DNA plasmídico a partir de JM103 y se transformó con él *B. subtilis* Δ*sacB*::T-H-C::erm #28 competente, formándose la cepa *B. subtilis* Δ*sacB*::T-H-C::erm #28/pHT01-ald-EB. Se prepararon células competentes y se transformaron del modo previamente descrito. Se seleccionaron transformantes en placas LB que contenían 5 µg/ml de cloranfenicol y se exploraron en cuanto a un producto de 1,3 kbp mediante PCR de colonias con los cebadores N31 SeqF1 y N63SeqR4.

En la estrategia de clonación alterna, se digirió pCR4Blunt-TOPO-E-B con HpaI y AatII, liberándose un fragmento de 2,4 kbp que fue purificado en gel. Se digirió el plásmido pCR4-TOPO-B/A-ald con HpaI y AatII y se purificó en gel el fragmento de vector de 5,4 kbp. Se ligó el fragmento de vector de pCR4-TOPO-B/A-ald con el fragmento HpaI-AatII de E-B, creándose pCR4-TOPO-ald-EB. Se transformaron células de *E. coli* TOP10 con el producto de ligación y se exploraron los transformantes resultantes en cuanto a un producto de 2,1 kbp mediante multiplicación por PCR con los cebadores N11 SeqF2 y N63SeqR4. Se digirió el plásmido pCR4-TOPO-ald-EB con BamHI y AatII y SphI. La digestión con BamHI/AatII liberó un fragmento de ald-EB de 3,9 kbp que fue purificado en gel. La finalidad de la digestión con SphI fue cortar el vector restante en fragmentos más pequeños para que no comigrara con el inserto de ald-EB en el gel. Se digirió el vector pHT01 con BamHI y AatII y se purificó en gel el fragmento de vector de 7,9 kbp. Se ligaron los fragmentos de vector y de inserto de ald-EB para formar el plásmido pHT01-AEB, y se transformaron con éste células de *E. coli* Top10. Se exploraron las colonias en cuanto a un producto de 1,5 kbp mediante multiplicación por PCR con los cebadores N62SeqF4 y HT R. Se preparó un plásmido y se transformaron con él células JM103. Se preparó DNA plasmídico a partir de JM103 y se transformó con él *B. subtilis* Δ*sacB*::T-H-C::erm #28 competente, formándose la cepa *B. subtilis* Δ*sacB*::T-H-C::erm #23/pHT01-AEB. Se prepararon células BE1010 competentes y se transformaron del modo previamente descrito. Se exploraron transformantes de *Bacillus* en cuanto a un producto de 1,3 kbp mediante multiplicación por PCR con los cebadores N31 SeqF1 y N63SeqR4.

Demostración de la producción de 1-butanol a partir de *B. subtilis* recombinante

Se inocularon tres productos de aislamiento independientes de cada cepa de *B. subtilis* Δ*sacB*::T-H-C::erm #28/pHT01-ald-EB y *B. subtilis* Δ*sacB*::T-H-C::erm #28/pHT01-AEB a matraces para sacudimiento (volumen total de aproximadamente 175 ml) que contenían 15 ml de medio. Como testigo negativo también se incluyó una cepa de *B. subtilis* BE1010 que carecía de la ruta exógena de seis genes del 1-butanol. El medio contenía (por litro): 10 ml de (NH₄)₂SO₄ 1 M; 5 ml de tampón de fosfato potásico 1M, pH de 7,0; 100 ml de tampón de MOPS/KOH 1 M, pH de 7,0; 20 ml de la sal potásica del ácido L-glutámico 1 M; 10 g de glucosa; 10 ml de cada una de unas disoluciones de 5 g/l de L-metionina, L-triptófano y L-lisina; 0,1 g de cada uno de extracto de levadura y ácidos Casamino; 20 ml de una mezcla de metales; y antibióticos apropiados (5 mg de cloranfenicol y eritromicina para las cepas recombinantes). La mezcla de metales contenía: MgCl₂ 200 mM, CaCl₂ 70 mM, MnCl₂ 5 mM, FeCl₃ 0,1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, hidrócloruro de tiamina 0,2 mM, CuSO₄ 172 µM, CoCl₂ 253 µM y Na₂MoO₄ 242 µM. Los matraces recibieron el inóculo a una DO₆₀₀ de partida ≤ 0,1 unidades, fueron sellados con tapas no ventiladas y fueron incubados a 37 °C con sacudimiento a aproximadamente 200 rpm.

Aproximadamente 24 horas después de la inoculación, se analizó una parte alícuota del caldo en cuanto al contenido de 1-butanol mediante HPLC (columna Shodex Sugar SH1011) con detección por índice de refracción (RI) y mediante GC [columna Varian CP-WAX 58 (FFAP) CB, 0,25 mm x 0,2 µm x 25 m] con detección por ionización por llama (FID), como se describe en la sección Métodos Generales. En la Tabla 11 se exponen los resultados de las determinaciones de 1-butanol.

Tabla 11

| Producción de 1-butanol por las cepas <i>B. subtilis</i> Δ <i>sacB</i> ::T-H-C::erm y <i>B. subtilis</i> Δ <i>sacB</i> ::T-H-C::erm #28/pHT01-AEB | | |
|---|--------------------------------------|----------------|
| Cepa | 1-butanol, área del pico por HPLC-RI | 1-butanol, mM* |
| BE1010 testigo | no detectado | no detectado |
| | | |

| Producción de 1-butanol por las cepas <i>B. subtilis</i> Δ sacB::T-H-C::erm y <i>B. subtilis</i> Δ sacB::T-H-C::erm #28/pHT01-AEB | | |
|---|--------------------------------------|----------------|
| Cepa | 1-butanol, área del pico por HPLC-RI | 1-butanol, mM* |
| pHT01-ald-EB a | 4629 | 0,19 |
| pHT01-ald-EB b | 3969 | no determinado |
| pHT01-ald-EB c | 4306 | no determinado |
| | | |
| pHT01-AEB a | 4926 | 0,16 |
| pHT01-AEB b | 3984 | no determinado |
| pHT01-AEB c | 3970 | no determinado |
| * Concentración determinada por GC. | | |
| – Los sufijos "a", "b" y "c" de la cepa indican productos de aislamiento independientes. | | |

Ejemplo 15

Producción de 1-butanol a partir de glucosa o sacarosa por *E. coli* recombinante

Para dotar a *E. coli* MG1655 con la capacidad para utilizar sacarosa como fuente de carbono y energía para la producción de 1-butanol, un grupo génico para utilización de sacarosa (*cscBKA*) del plásmido pScr1 (descrito más adelante) fue subclonado en pBHR-Ptrc-ald(opt) (descrito en el Ejemplo 13) en este organismo. Los genes para utilización de sacarosa (*cscA*, *cscK* y *cscB*) codifican una sacarosa hidrolasa (CscA), proporcionada como ID. SEC. nº 157, una D-fructocinasa (CscK), proporcionada como ID. SEC. nº 158, y una sacarosa permeasa (CscB), proporcionada como ID. SEC. nº 159. Para permitir la expresión constitutiva de los tres genes a partir de su promotor natural, el gen represor específico de sacarosa, *cscR*, que regula el grupo génico, no está presente en la construcción.

Clonación y expresión del grupo génico *cscBKA* para utilización de sacarosa, en el plásmido pBHR-Ptrc-ald(opt). El grupo génico *cscBKA* para utilización de sacarosa, proporcionado como ID. SEC. nº 156, fue aislado de DNA genómico de una cepa de *E. coli* que utiliza sacarosa, derivada de la cepa ATCC 13281 de *E. coli*. Se digirió el DNA genómico hasta compleción con BamHI y EcoRI. Los fragmentos que tenían un tamaño medio de aproximadamente 4 kbp fueron aislados de un gel de agarosa y fueron ligados con el plásmido pLitmus28 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, EE.UU.), que fue luego digerido con BamHI y EcoRI. Se transformaron células ultracompetentes de *E. coli* Top10F' (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) con el DNA resultante. Los transformantes fueron sembrados en placas de agar MacConkey que contenían sacarosa al 1% y 100 µg/ml de ampicilina y fueron explorados en cuanto a colonias moradas. Se aisló DNA plasmídico de los transformantes morados y se secuenció usando los cebadores M13 Directo (ID. SEC. nº 45), M13 Inverso (ID. SEC. nº 46), scr1 (ID. SEC. nº 160), scr2 (ID. SEC. nº 161), scr3 (ID. SEC. nº 162) y scr4 (ID. SEC. nº 163). El plásmido que contenía los genes *cscB*, *cscK* y *cscA* (*cscBKA*) fue denominado pScr1.

Se digirió el plásmido pScr1 con XhoI y se trató con el fragmento Klenow de DNA polimerasa para despuntar los extremos. Luego se digirió el plásmido con AgeI y se purificó en gel el fragmento de 4179 bp del grupo génico *cscBKA*. El plásmido pBHR-Ptrc-ald(opt) fue preparado del modo descrito en el Ejemplo 13 y fue digerido con AgeI y NaeI. El fragmento resultante de 6003 bp de pBHR-Ptrc-ald(opt) fue purificado en gel. Se ligó el fragmento de *cscBKA* con el plásmido pBHR-Ptrc-ald(opt), obteniéndose pBHR-Ptrc-ald(opt)-*cscAKB*. Se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* NovaXG (Novagen, Madison, Wisconsin, EE.UU.) con el plásmido pBHR-Ptrc-ald(opt)-*cscAKB* y se confirmó la utilización de sacarosa sembrando los transformantes en placas de agar MacConkey que contenían sacarosa al 2% y 25 µg/ml de kanamicina. En la construcción pBHR-Ptrc-ald(opt)-*cscAKB*, los genes para utilización de sacarosa estaban clonados cadena abajo de Ptrc-ald(opt) como un fragmento separado en el orden *cscA*, *cscK* y *cscB*.

Alternativamente, los genes para utilización de sacarosa fueron clonados en dirección opuesta en pBHR-Ptrc-ald(opt). Se digirió el plásmido pBHR-Ptrc-ald(opt) con Scal y AgeI y se purificó en gel el fragmento de 5971 bp de pBHR-Ptrc-ald(opt). Se ligó el fragmento de 4179 bp de *cscBKA*, preparado del modo anteriormente descrito, con el fragmento de pBHR-Ptrc-ald(opt), obteniéndose pBHR-Ptrc-ald(opt)-*cscBKA*. Se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* NovaXG (Novagen, Madison, Wisconsin, EE.UU.) con el plásmido pBHR-Ptrc-ald(opt)-*cscBKA* y se confirmó la utilización de sacarosa sembrando los transformantes en placas de agar MacConkey que contenían sacarosa al 2% y 25 µg/ml de kanamicina. En la construcción pBHR-Ptrc-ald(opt)-*cscBKA*, los genes para utilización de sacarosa estaban clonados como un fragmento separado cadena abajo de Ptrc-ald(opt), en el orden *cscB*, *cscK* y *cscA*.

5 Demostración de la producción de 1-butanol a partir de glucosa o sacarosa usando *E. coli* recombinante. Se transformó la cepa MG1655 1.5GI-yqhD::Cm de *E. coli* (descrita en el Ejemplo 13) con los plásmidos pTrc99a-E-C-H-T (preparado del modo descrito en el Ejemplo 13) y pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscAKB o pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscBKA para producir dos cepas, MG1655 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscAKB #9 y MG1655 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscBKA #1. Se prepararon cultivos de arranque de las dos cepas cultivando las células en medio LB que contenía 25 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de carbenicilina. Luego se utilizaron estas células para la inoculación a matraces para sacudimiento (volumen total de aproximadamente 175 ml) que contenían 50, 70 y 150 ml de medio TM3a/glucosa (con antibióticos apropiados) para que representaran unas condiciones de alto, medio y bajo nivel de oxígeno, respectivamente, como se describió en el Ejemplo 13.

10 Como un testigo negativo se utilizó una tercera cepa, *E. coli* MG1655/pScr1, cultivada en medio TM3a/glucosa que contenía 100 µg/ml de carbenicilina. Para cada una de las cepas, se preparó un conjunto idéntico de matraces con medio TM3a/sacarosa (con antibióticos apropiados). El medio TM3a/sacarosa es idéntico al medio TM3a/glucosa salvo por que la sacarosa (10 g/l) sustituye a la glucosa. Los matraces recibieron el inóculo a una DO₅₅₀ de partida ≤ 0,03 unidades y fueron incubados del modo descrito en el Ejemplo 13. Con la excepción de los matraces del testigo negativo, se añadió IPTG a los matraces (concentración final de 0,04 mM) cuando los cultivos alcanzaron una DO₅₅₀ de entre 0,2 y 1,8 unidades. Las células se recolectaron cuando la DO₅₅₀ de los cultivos aumentó en un factor de al menos 3.

20 Aproximadamente 24 horas después de la inoculación, se analizó una parte alícuota del caldo en cuanto al contenido de 1-butanol mediante HPLC (columna Shodex Sugar SH1011) con detección por índice de refracción (RI) y mediante GC (columna HP-INNOWax, 30 m x 0,53 mm de diámetro interno, 1 µm de espesor de película) con detección por ionización por llama (FID), como se describe en la sección Métodos Generales.

25 En la Tabla 12 y la Tabla 13, respectivamente, se proporcionan las concentraciones de 1-butanol en los cultivos después del crecimiento en los medios que contenían glucosa y sacarosa. Ambas cepas de *E. coli* recombinantes que contenían la ruta biosintética del 1-butanol produjeron 1-butanol a partir de glucosa y sacarosa bajo todas las condiciones de oxígeno, mientras que la cepa testigo negativo no produjo 1-butanol detectable.

Tabla 12

| Producción de 1-butanol a partir de glucosa por las cepas de <i>E. coli</i> recombinantes MG1655 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscAKB #9 y MG1655 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscBKA #1 | | | |
|---|-------------------------|---------------|----------------------|
| Cepa | Nivel de O ₂ | 1-butanol, mM | Rendimiento molar, % |
| cscBKA #1 | alto | 0,01 | 0,03 |
| cscBKA #1 | medio | 0,20 | 0,43 |
| cscBKA #1 | bajo | 0,07 | 0,21 |
| cscAKB #9 | alto | 0,01 | 0,02 |
| cscAKB #9 | medio | 0,17 | 0,35 |
| cscAKB #9 | bajo | 0,04 | 0,12 |
| pScr1 | alto | no detectado | no detectado |
| pScr1 | medio | no detectado | no detectado |
| pScr1 | bajo | no detectado | no detectado |

Tabla 13

| Producción de 1-butanol a partir de sacarosa por cepas de <i>E. coli</i> recombinantes | | | |
|--|-------------------------|---------------|----------------------|
| Cepa | Nivel de O ₂ | 1-butanol, mM | Rendimiento molar, % |
| cscBKA #1 | alto | 0,02 | 0,10 |
| cscBKA #1 | medio | 0,02 | 0,11 |
| cscBKA #1 | bajo | 0,01 | 0,09 |
| cscAKB #9 | alto | 0,03 | 0,11 |
| cscAKB #9 | medio | 0,03 | 0,15 |
| cscAKB #9 | bajo | 0,02 | 0,10 |
| pScr1 | alto | no detectado | no detectado |
| pScr1 | medio | no detectado | no detectado |
| pScr1 | bajo | no detectado | no detectado |

Ejemplo 16

Producción de 1-butanol a partir de sacarosa usando *B. subtilis* recombinante

En este ejemplo se describe la producción de 1-butanol a partir de sacarosa usando *Bacillus subtilis* recombinante. Se examinaron dos productos de aislamiento independientes de la cepa Δ sacB::T-H-C::erm #28/pHT01-ald-EB de *B. subtilis* (Ejemplo 14) en cuanto a la producción de 1-butanol, esencialmente del modo descrito en el Ejemplo 14. Se inocularon las cepas a matraces para sacudimiento (volumen total de aproximadamente 175 ml) que contenían 20 ml o 100 ml de medio para simular unas condiciones de alto y bajo nivel de oxígeno, respectivamente. El medio A era exactamente como el descrito en el Ejemplo 14 salvo por que la glucosa estaba sustituida por 5 g/l de sacarosa. El medio B era idéntico al medio TM3a/glucosa descrito en el Ejemplo 13 salvo por que la glucosa estaba sustituida por 10 g/l de sacarosa y el medio estaba complementado con (por litro) 10 ml de una disolución de 5 g/l de cada uno de L-metionina, L-triptófano y L-lisina. Los matraces recibieron el inóculo a una DO₅₅₀ de partida $\leq 0,1$ unidades, y fueron tapados con tapas ventiladas e incubados a 34 °C con sacudimiento a 300 rpm.

Aproximadamente 24 horas después de la inoculación, se analizó una parte alícuota del caldo en cuanto al contenido de 1-butanol mediante GC (columna HP-INNOWax, 30 m x 0,53 mm de diámetro interno, 1,0 μ m de espesor de película) con detección por FID, como se describe en la sección Métodos Generales. En la Tabla 14 se proporcionan los resultados de las determinaciones de 1-butanol. La cepa de *Bacillus* recombinante que contenía la ruta biosintética del 1-butanol produjo niveles detectables de 1-butanol bajo condiciones de alto y bajo nivel de oxígeno en ambos medios.

Tabla 14

| Producción de 1-butanol a partir de sacarosa por la cepa Δ sacB::T-H-C::erm #28/pHT01-ald-EB de <i>B. subtilis</i> | | | |
|---|-------|-------------------------|---------------------------|
| Cepa | Medio | Nivel de O ₂ | 1-BuOH, mM ^{1,2} |
| Ninguna | A | no aplicable | no detectado |
| pHT01-ald-EB a | A | alto | + |

| Producción de 1-butanol a partir de sacarosa por la cepa Δ sacB::T-H-C::erm #28/pHT01-ald-EB de <i>B. subtilis</i> | | | |
|--|-------|-------------------------|---------------------------|
| Cepa | Medio | Nivel de O ₂ | 1-BuOH, mM ^{1,2} |
| pHT01-ald-EB b | A | alto | + |
| | | | |
| pHT01-ald-EB a | A | bajo | 0,01 |
| pHT01-ald-EB b | A | bajo | 0,01 |
| | | | |
| Ninguna | B | no aplicable | no detectado |
| | | | |
| pHT01-ald-EB a | B | alto | + |
| pHT01-ald-EB b | B | alto | + |
| | | | |
| pHT01-ald-EB a | B | bajo | 0,04 |
| pHT01-ald-EB b | B | bajo | 0,03 |
| ¹ Concentración determinada por GC. ² "+" indica presencia cualitativa de 1-butanol. Los sufijos "a" y "b" de la cepa indican productos de aislamiento independientes. | | | |

Ejemplo 17

Producción de 1-butanol a partir de glucosa y sacarosa usando *Saccharomyces cerevisiae*

En este ejemplo se describe la producción de 1-butanol en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. De los seis genes que codifican enzimas que catalizan los pasos de la ruta biosintética del 1-butanol, cinco fueron clonados en tres plásmidos compatibles de 2 micrómetros (2 μ m) de levadura y hechos expresar conjuntamente en *Saccharomyces cerevisiae*. La "ruta superior" se define como los tres primeros pasos enzimáticos, catalizados por la acetil-CoA acetiltransferasa (*thlA*, tiolasa), la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (*hbd*) y la crotonasa (*crt*). La ruta inferior se define como los pasos enzimáticos cuarto (butil-CoA deshidrogenasa, *ter*) y quinto (butilaldehído deshidrogenasa, *ald*) de la ruta. El último paso enzimático de la ruta del 1-butanol es catalizado por la alcohol deshidrogenasa, que puede ser codificada por genes de levadura endógenos, tales como, por ejemplo, *adh1* y *adh11*.

La expresión de genes en levadura requiere típicamente un promotor, seguido por el gen de interés, y un terminador de la transcripción. Se utilizaron diversos promotores constitutivos de levadura en la construcción de casetes de expresión para genes que codifican la ruta biosintética del 1-butanol, incluyendo los promotores FBA, GPD y GPM. También se utilizaron algunos promotores inducibles, por ejemplo, GAL1, GAL10 y CUP1, en la construcción de plásmidos intermedios pero no en la cepa de demostración final. Se utilizaron diversos terminadores de la transcripción, incluyendo FBAt, GPDt, GPMt, ERG10t y GAL1t. Los genes que codifican la ruta biosintética del 1-butanol fueron primero subclonados en un plásmido de levadura flanqueado por un promotor y un terminador, lo que produjo casetes de expresión para cada gen. Los casetes de expresión fueron opcionalmente combinados en un único vector mediante clonación con reparación de huecos, como se describe más adelante. Por ejemplo, los tres casetes génicos que codifican la ruta superior fueron subclonados en un plásmido de 2 μ m de levadura. Cada uno de los genes *ter* y *ald* se expresó individualmente en los plásmidos de 2 μ m. La transformación conjunta de los tres plásmidos en una sola cepa de levadura dio lugar a una ruta biosintética funcional del 1-butanol. Alternativamente, varios fragmentos de DNA que codificaban promotores, genes y terminadores fueron directamente combinados en un único vector mediante clonación con reparación de huecos.

Métodos para construir plásmidos y cepas en levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En *Methods in Enzymology*, Volumen 194, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology* (Parte A, 2004, redactado por Christine Guthrie y Gerald R. Fink, Elsevier Academic Press, San Diego, California, EE.UU.), se describen protocolos básicos sobre la biología molecular de levaduras, incluyendo la transformación, el crecimiento celular, la expresión génica, la recombinación con reparación de huecos, etc.

Los plásmidos empleados en este Ejemplo fueron los vectores lanzadera pRS423, pRS424, pRS425 y pRS426 de *E.*

coli- *S. cerevisiae* (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU.), que contienen un origen de replicación de *E. coli* (por ejemplo, pMB1), un origen de replicación de 2 µm de levadura, y un marcador para selección nutricional. Los marcadores de selección para estos cuatro vectores son His3 (vector pRS423), Trp1 (vector pRS424), Leu2 (vector pRS425) y Ura3 (vector pRS426). Estos vectores permiten la propagación de cepas tanto en cepas de *E. coli* como de levadura. Como huéspedes para clonación y expresión de genes, se utilizaron una cepa haploide de levadura, BY4741 (MATa *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0* *ura3Δ0*) (Research Genetics, Huntsville, Alabama, EE.UU.; también disponible de ATCC 201388), y una cepa diploide, BY4743 (MATa/alpha *his3Δ1/his3Δ1* *leu2Δ0/leu2Δ0*, *lys2Δ0/LYS2* *MET15/met15Δ0* *ura3Δ0/ura3Δ0*) (Research Genetics, Huntsville, Alabama, EE.UU.; también disponible de ATCC 201390). La construcción de vectores de expresión para genes que codifican enzimas de la ruta biosintética del 1-butanol se llevó a cabo mediante técnicas de clonación molecular estándares en *E. coli* o mediante el método de recombinación con reparación de huecos en levadura.

La estrategia de clonación con reparación de huecos se aprovecha de la muy eficaz recombinación homóloga en levadura. Típicamente, se digiere un DNA vector de levadura (por ejemplo, en su sitio de clonación múltiple) para crear un "hueco" en su secuencia. Se genera un número de DNAs insertados de interés que contienen una secuencia ≥ 21 bp tanto en el extremo 5' como en el 3' que solapan secuencialmente entre sí y con los extremos 5' y 3' del DNA vector. Por ejemplo, para construir un vector de expresión de levadura para el "Gen X", se seleccionan un promotor de levadura y un terminador de levadura para el casete de expresión. El promotor y el terminador son multiplicados a partir del DNA genómico de levadura, y el Gen X o bien es multiplicado por PCR a partir de su organismo fuente o bien es obtenido de un vector de clonación que comprende la secuencia del Gen X. Hay al menos una secuencia de solapamiento de 21 bp entre el extremo 5' del vector linealizado y la secuencia de promotor, entre el promotor y el Gen X, entre el Gen X y la secuencia de terminador, y entre el terminador y el extremo 3' del vector linealizado. El vector "con huecos" y los DNAs insertados son luego empleados para transformar conjuntamente una cepa de levadura y son sembrados en el medio selectivo mínimo SD, y se seleccionan colonias para el desarrollo de cultivos y minipreparaciones para DNAs plasmídicos. La presencia de combinaciones correctas de insertos puede ser confirmada mediante mapeo por PCR. El DNA plasmídico aislado de levadura (normalmente en una concentración baja) puede ser luego empleado para transformar una cepa de *E. coli*, por ejemplo, *TOP10*, lo que va seguido de minipreparaciones y mapeo de restricción para verificar adicionalmente la construcción plasmídica. Finalmente, se puede verificar la construcción mediante el análisis de su secuencia. Los transformantes de levadura de plásmidos positivos son cultivados en medio SD para llevar a cabo ensayos enzimáticos para caracterizar las actividades de las enzimas expresadas por los genes de interés.

Se desarrollaron cultivos de levadura en medio complejo YPD o medio selectivo mínimo sintético que contenía glucosa (medio SD) y las mezclas de compuestos apropiadas que permiten la complementación de los marcadores para selección nutricional en los plásmidos (Methods in Enzymology, Volumen 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, 2004, Parte A, páginas 13-15). El componente de azúcar del medio selectivo SD era glucosa al 2%. Para la producción de 1-butanol, también se desarrollaron cultivos de levadura en medio selectivo mínimo sintético con sacarosa al 2% (medio SS).

Para el análisis de la actividad enzimática, se sembró en forma de rayas una sola colonia de cada cepa en una placa fresca que contenía medio selectivo mínimo SD y se incubó a 30 °C durante 2 días. Las células de esta placa fueron utilizadas para inocular a 20 ml de medio selectivo SD en un matraz para sacudimiento de 125 ml de capacidad y fueron cultivadas durante la noche a 30 °C, con sacudimiento a 250 rpm. Se midió la densidad óptica (DO₆₀₀) del cultivo nocturno, y el cultivo fue diluido hasta una DO₆₀₀ = 0,1 en 250 ml del mismo medio en un matraz para sacudimiento de 1,0 l de capacidad y fue desarrollado a 30 °C con sacudimiento a 250 rpm hasta una DO₆₀₀ de entre 0,8 y 1,0. Las células fueron luego recolectadas por centrifugación a 2000 x g durante 10 minutos y fueron resuspendidas en 20 ml de tampón de Tris 50 mM-HCl, pH de 8,5. Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo del modo anteriormente descrito.

Construcción del plásmido NY102 para la coexpresión de *thlA* y *hbd*. Se construyó un número de vectores de expresión duales para la coexpresión de los genes *thlA* y *hbd*. El gen ERG10 de *Saccharomyces cerevisiae* es un ortólogo funcional del gen *thlA*. Inicialmente, se construyó un vector dual de ERG10 y *hbd* usando el promotor dual divergente GAL1-GAL10 de levadura, el terminador GAL1 (GAL1t) y el terminador ERG10 (ERG10t). El fragmento de DNA de gen ERG10-ERG10t fue multiplicado por PCR a partir de DNA genómico de la cepa BY4743 de *Saccharomyces cerevisiae* usando los cebadores OT731 (ID. SEC. n° 164) y OT732 (ID. SEC. n° 165). El promotor divergente GAL1-GAL10 de levadura fue también multiplicado por PCR a partir de DNA genómico de BY4743 usando los cebadores OT733 (ID. SEC. n° 166) y OT734 (ID. SEC. n° 167). El gen *hbd* fue multiplicado a partir del plásmido pTrc99a-E-C-H-T de *E. coli* (descrito en el Ejemplo 13) usando los cebadores OT735 (ID. SEC. n° 168) y OT736 (ID. SEC. n° 169) para PCR. Se multiplicó GAL1t a partir de DNA genómico de BY4743 usando los cebadores OT737 (ID. SEC. n° 170) y OT738 (ID. SEC. n° 171). De este modo se obtuvieron cuatro fragmentos de PCR, *erg10*-ERG10t, promotores GAL1-GAL10, *hbd* y GAL1t, con secuencias de solapamiento de aproximadamente 25 bp entre cada fragmento de PCR adyacente. Cada uno de los fragmentos GAL1t y ERG10-ERG10t contiene secuencias de solapamiento de aproximadamente 25 bp con el vector pRS425 de levadura. Para ensamblar estas secuencias mediante recombinación con reparación de huecos, se transformó la cepa BY4741 de levadura con los fragmentos de DNA junto con el vector pRS425 que había sido digerido con las enzimas BamHI e HindIII. Se seleccionaron colonias de placas mínimas SD-Leu y se identificaron los clones con insertos mediante multiplicación por PCR. El nuevo plásmido fue denominado pNY6 (pRS425.ERG10t-*erg10*-GAL10-GAL1-*hbd*-GAL1t). Se llevó a

cabo una confirmación adicional mediante mapeo de restricción.

La cepa *BY4741* (pNY6) de levadura, preparada al transformar *S. cerevisiae* BY4741 con el plásmido PNY6, mostró buena actividad Hbd pero no actividad tiolasa. Debido a la falta de actividad tiolasa, se substituyó el gen *ERG10* por el gen *thIA* mediante recombinación con reparación de huecos. Se multiplicó el gen *thIA* a partir del vector pTrc99a-E-C-H-T de *E. coli* por PCR usando los cebadores OT797 (ID. SEC. nº 172), que añade un sitio de restricción SphI, y OT798 (ID. SEC. nº 173), que añade un sitio de restricción Ascl. El plásmido PNY6 fue digerido con las enzimas de restricción SphI y PstI, purificado en gel, y usado para transformar BY4741 de levadura junto con el producto de PCR de *thIA*. Debido a las secuencias de solapamiento de 30 bp entre el producto de PCR de *thIA* y el plásmido pNY6 digerido, el gen *thIA* se recombinó en PNY6 entre el promotor GAL10 y el terminador *ERG10t*. Esto produjo el plásmido PNY7 (pRS425.ERG10t-*thIA*-GAL10-GAL1-hbd-GAL1t), que fue verificado mediante PCR y mapeo de restricción.

En una subsiguiente etapa de clonación basada en recombinación con reparación de huecos, se substituyó el promotor GAL10 de pNY7 por el promotor CUP1 y se substituyó el promotor GAL1 por el potente promotor GPD. Este plásmido, pNY10 (pRS425.ERG10t-*thIA*-CUP1-GPD-hbd-GAL1t), permite la expresión del gen *thIA* bajo CUP1, un promotor inducible por cobre, y la expresión del gen *hbd* bajo el promotor GPD. La secuencia del promotor CUP1 fue multiplicada por PCR a partir de DNA genómico de levadura BY4743 usando los cebadores OT806 (ID. SEC. nº 174) y OT807 (ID. SEC. nº 175). El promotor GPD fue multiplicado a partir de DNA genómico de BY4743 usando los cebadores OT808 (ID. SEC. nº 176) y OT809 (ID. SEC. nº 177). Los productos de PCR de los promotores CUP1 y GPD fueron combinados con el plásmido pNY7 que había sido digerido con las enzimas de restricción NcoI y SphI. A partir de esta etapa de clonación con reparación de huecos, se construyó el plásmido pNY10, que fue verificado mediante PCR y mapeo de restricción. La cepa *BY4741* de levadura que contenía pNY10 mostró actividad Hbd pero no actividad ThIA. La actividad Hbd bajo el promotor GPD resultó significativamente mejorada en comparación con la actividad Hbd controlada por el promotor GAL1 (1,8 U/mg frente a 0,40 U/mg). Un análisis por secuenciación reveló que el gen *thIA* de PNY10 tenía una supresión de una base cerca del extremo 3', lo que daba lugar a una proteína truncada. Esto explica la falta de actividad tiolasa en la cepa.

Se construyó el plásmido pNY12 con la correcta secuencia del gen *thIA*. El gen *thIA* fue cortado del vector pTrc99a-E-C-H-T mediante digestión con SphI y Ascl. El promotor FBA1 fue multiplicado por PCR a partir de DNA genómico de BY4743 usando los cebadores OT799 (ID. SEC. nº 178) y OT761 (ID. SEC. nº 179) y fue digerido con las enzimas de restricción Sall y SphI. El fragmento del gen *thIA* y el fragmento del promotor FBA1 fueron ligados en sitios Ascl y Sall del plásmido pNY10, generándose el plásmido pNY12 (pRS425.ERG10t-*thIA*-FBA1), lo que fue confirmado por mapeo de restricción. Se transformó la cepa *BY4741* de levadura con PNY12, y el transformante resultante mostró una actividad ThIA de 1,66 U/mg.

El fragmento de promotor FBA1-gen *thIA* de pNY12 fue vuelto a subclonar en pNY10. El vector pNY10 fue cortado con la enzima de restricción Ascl y fue ligado con el fragmento de promotor FBA1-gen *thIA* digerido con Ascl, aislado del plásmido pNY12. Esto creó un nuevo plásmido con dos posibles orientaciones de inserto. Se escogieron los clones con promotores FBA1 y GPD situados adyacentemente entre sí en orientación opuesta, y este plásmido fue denominado pNY102. Se verificó el plásmido pNY102 (pRS425.ERG10t-*thIA*-FBA1-GPD-hbd-GAL1t) mediante mapeo de restricción. Se preparó la cepa *DPD5206* al transformar la cepa *BY4741* de levadura con pNY102. La actividad ThIA de *DPD5206* era 1,24 U/mg y la actividad Hbd era 0,76 U/mg.

Construcción de plásmidos pNY11 para la expresión de crt. Se construyó el casete de expresión del gen *crt* combinando el promotor GPM1, el gen *crt* y el terminador GPM1t en el vector pRS426 usando recombinación con reparación de huecos en levadura. El promotor GPM1 fue multiplicado por PCR a partir de DNA genómico de la levadura BY4743 usando los cebadores OT803 (ID. SEC. nº 180) y OT804 (ID. SEC. nº 181). El gen *crt* fue multiplicado usando los cebadores de PCR OT785 (ID. SEC. nº 182) y OT786 (ID. SEC. nº 183) a partir del plásmido pTrc99a-E-C-H-T de *E. coli*. El terminador GPM1t fue multiplicado por PCR a partir de DNA genómico de la levadura BY4743 usando OT787 (ID. SEC. nº 184) y OT805 (ID. SEC. nº 185). El vector pRS426 de levadura fue digerido con BamHI e HindIII y fue purificado en gel. Este DNA fue utilizado junto con los productos de PCR del promotor GPM1, el gen *crt* y el terminador GPM1t para transformar células competentes de levadura *BY4741*. Los clones con los insertos correctos fueron verificados por PCR y mapeo de restricción, y la resultante cepa *BY4741* (pNY11: pRS426-GPM1-crt-GPM1t) de levadura tenía una actividad Crt de 85 U/mg.

Construcción del plásmido pNY103 para la coexpresión de *thIA*, *hbd* y *crt*. Para la coexpresión de las enzimas de la ruta superior del 1-butanol, el casete del gen *crt* de pNY11 fue subclonado en el plásmido pNY102 para crear un vector de expresión de *hbd*, *thIA* y *crt*. Un fragmento de DNA de 2347 bp que contenía el promotor GPM1, el gen *crt* y el terminador GPM1 fue cortado del plásmido pNY11 con las enzimas de restricción SacI y NotI y fue clonado en el vector pNY102, que había sido digerido con NotI y parcialmente digerido con SacI, produciéndose el vector de expresión pNY103 (pRS425.ERG10t-*thIA*-FBA1-GPD-hbd-GAL1t-GPM1t-crt-GPM1t). Después de la confirmación de la presencia de los tres casetes en pNY103 mediante digestión con HindIII, se transformaron células de levadura *BY4743* con el plásmido, y la cepa de levadura transformada fue denominada *DPD5200*. Cuando se cultivó bajo condiciones estándares, *DPD5200* mostró actividades enzimáticas ThIA, Hbd y Crt de 0,49 U/mg, 0,21 U/mg y 23,0 U/mg, respectivamente.

Construcción del plásmido pNY8 para la expresión de *ald*. Se sintetizaron un gen optimizado en cuanto a codones denominado *ter* (ID. SEC. nº 186), que codifica la proteína Ter (ID. SEC. nº 187), y un gen optimizado en cuanto a codones denominado *aldy* (ID. SEC. nº 188), que codifica la proteína Ald (ID. SEC. nº 189), usando codones preferidos de *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante DNA2.0 (Palo Alto, California, EE.UU.) se prepararon el plásmido pTery, que contiene el gen *ter* optimizado en cuanto a codones, y pALDy, que contiene el gen *ald* optimizado en cuanto a codones.

Para ensamblar pNY8 (pRS426.GPD-ald-GPDt), tres fragmentos de inserto que incluían un producto de PCR del promotor GPD [sintetizado a partir de los cebadores OT800 (ID. SEC. nº 190) y OT758 (ID. SEC. nº 191) y DNA genómico de BY4743], un fragmento del gen *aldy* escindido de pALDy mediante digestión con NcoI y SfiI (ID. SEC. nº 188, y un producto de PCR del terminador GPD [sintetizado a partir de los cebadores OT754 (ID. SEC. nº 192) y OT755 (ID. SEC. nº 193) y DNA genómico de BY4743] fueron recombinados con el vector pRS426 que había sido digerido con BamHI e HindIII, por medio de clonación por recombinación con reparación de huecos. Los clones de transformación de la levadura *BY4741* fueron analizados mediante mapeo por PCR. El nuevo plásmido así construido, pNY8, fue adicionalmente confirmado mediante mapeo de restricción. Los transformantes de la levadura *BY4741* que contenían pNY8 fueron analizados en cuanto a actividad Ald, y la actividad específica hacia butiril-CoA fue aproximadamente 0,07 U/mg.

Construcción de los plásmidos pNY9 y pNY13 para la expresión de *ter*. El gen *ter* optimizado en cuanto a codones fue clonado en el vector pRS426 bajo el control del promotor FBA1 mediante clonación con reparación de huecos. El promotor FBA1 fue multiplicado por PCR a partir de DNA genómico de la levadura BY4743 usando los cebadores OT760 (ID. SEC. nº 194) y OT792 (ID. SEC. nº 195). El gen *ter* se obtuvo por digestión del plásmido pTery mediante las enzimas de restricción SphI y NotI, lo que dio lugar al fragmento proporcionado como ID. SEC. nº 186. Se generó el fragmento de PCR del terminador FBA1 mediante una PCR a partir de DNA genómico de la levadura BY4743 usando los cebadores OT791 (ID. SEC. nº 196) y OT765 (ID. SEC. nº 197). Se combinaron tres fragmentos de DNA, el promotor FBA1, el gen *ter* y el terminador FBA1, con el vector pRS426 que había sido digerido con BamHI e HindIII, y se utilizaron para transformar la levadura BY4741 mediante recombinación con reparación de huecos. El plásmido resultante, pNY9 (pRS426-FBA1-*ter*-FBA1t), fue confirmado mediante mapeo por PCR así como mediante digestión de restricción. La levadura *BY4741* transformada con pNY9 produjo una actividad Ter de 0,26 U/mg.

Para preparar la cepa final de la ruta biosintética del 1-butanol fue necesario construir una cepa de expresión de levadura que contuviera diversos plásmidos, cada uno con un marcador para selección nutricional único. Puesto que el vector parental pRS426 contenía un marcador Ura para selección, el casete de expresión de *ter* fue subclonado en el vector pRS423, que contenía un marcador His3. Un fragmento de 3,2 kb que contenía el casete FBA1-*ter*-FBA1t fue aislado del plásmido pNY9 por digestión con las enzimas de restricción SacI y XhoI y fue ligado en el vector pRS423 que había sido cortado con estas dos mismas enzimas. El nuevo plásmido, pNY13 (pRS423-FBA1-*ter*-FBA1t), fue mapeado mediante digestión de restricción. Se transformó la cepa *BY4741* con pNY13 y se cultivó el transformante en medio SD-His, obteniéndose una cepa con una actividad Ter de 0,19 U/mg.

Construcción de una cepa de levadura que contiene genes de la ruta biosintética del 1-butanol para la demostración de la producción de 1-butanol. Como se describió anteriormente, se construyó la cepa *DPD5200* de levadura mediante la transformación de la cepa *BY4743* de *S. cerevisiae* con el plásmido pNY103, lo que permite la coexpresión de los genes *thlA*, *hbd* y *crt*. Se prepararon células competentes de levadura *DPD5200* del modo anteriormente descrito y se transformaron con los plásmidos pNY8 y pNY13, generándose la cepa *DPD5213*. *DPD5213* permite la expresión constitutiva simultánea de cinco genes de la ruta biosintética del 1-butanol, *thlA*, *hbd*, *crt*, *ter* y *ald*. Como un testigo negativo se utilizó la cepa *DPD5212* (cepa *BY4743* de *S. cerevisiae* transformada con plásmidos vacíos, pRS425 y pRS426). Se cultivaron cuatro productos de aislamiento independientes de la cepa *DPD5213* en medio mínimo selectivo SD-Ura, -Leu, -His en presencia de glucosa al 2% o sacarosa al 2% para permitir la complementación de crecimiento de los tres plásmidos. Se cultivó similarmente un único producto de aislamiento de *DPD5212* en el medio apropiado.

Para demostrar la producción de 1-butanol mediante cultivos aeróbicos, se sembró en forma de rayas una sola colonia de cada cepa en una placa de agar fresco que contenía medio de crecimiento selectivo mínimo SD (que contenía glucosa al 2%) o medio de crecimiento selectivo mínimo SS (que contenía sacarosa al 2%) y se incubó a 30 °C durante 2 días. Las células de estas placas fueron utilizadas para inocular a 20 ml del medio selectivo mínimo (SD o SS) en matraces de plástico para sacudimiento de 125 ml de capacidad y fueron cultivadas durante la noche a 30 °C con sacudimiento a 250 rpm. Se midió la densidad óptica (DO₆₀₀) del cultivo nocturno, y el cultivo fue diluido hasta una DO₆₀₀ de 0,1 en 25 ml del mismo medio en un matraz para sacudimiento de 125 ml de capacidad y fue desarrollado a 30 °C con sacudimiento a 250 rpm.

Se tomaron partes alícuotas del cultivo a las 24 horas y las 48 horas para el análisis de la producción de 1-butanol mediante GC (columna HP-INNOWax, 30 m x 0,53 mm de diámetro interno, 1 µm de espesor de película) con detección por FID, como se describe en la sección Métodos Generales. Los resultados del análisis por GC se presentan en la Tabla 15.

| Producción de 1-butanol a partir de glucosa y sacarosa por la cepa <i>DPD5213</i> de <i>S. cerevisiae</i> | | | |
|---|----------|---|---|
| Cepa ¹ | Azúcar | 1-butanol a las 24 h, mg/l ² | 1-butanol a las 48 h, mg/l ² |
| | | | |
| DPD5212 | Glucosa | No detectado | No detectado |
| | | | |
| DPD5213 a | Glucosa | 0,4 | 0,5 |
| Dud5213 b | Glucosa | 0,9 | 0,2 |
| DPD5213 c | Glucosa | 1,0 | 0,6 |
| DPD5213 d | Glucosa | 0,8 | 0,3 |
| | | | |
| DPD5212 | Sacarosa | No detectado | No detectado |
| | | | |
| DPD5213 a | Sacarosa | No detectado | 1,7 |
| DPD5213 b | Sacarosa | No detectado | 1,3 |
| DPD5213 c | Sacarosa | 0,2 | 1,5 |
| DPD5213 d | Sacarosa | 0,6 | 0,9 |
| ¹ Mediante a-d se indican productos de aislamiento independientes. | | | |
| ² Concentración determinada por GC. | | | |

Ejemplo 18 (profético)

Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Lactobacillus plantarum*

La finalidad de este Ejemplo profético es describir cómo hacer que se exprese la ruta biosintética del 1-butanol en *Lactobacillus plantarum*. Los seis genes de la ruta del 1-butanol, que codifican seis actividades enzimáticas, son divididos en dos operones para expresión. Los tres primeros genes de la ruta (*thl*, *hbd* y *crt*, que codifican las enzimas acetil-CoA acetiltransferasa, 3-hidroxi-butil-CoA deshidrogenasa y crotonasa, respectivamente) se integran en el cromosoma de *Lactobacillus plantarum* mediante recombinación homóloga usando el método descrito por Hols et al. [Appl. Environ. Microbiol. 60: 1401-1413 (1994)]. Los tres últimos genes (*EgTER*, *ald* y *bdhB*, que codifican las enzimas butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa y butanol deshidrogenasa, respectivamente) se clonan en un plásmido de expresión y se usan para transformar la cepa de *Lactobacillus* que porta los genes integrados de la ruta superior del 1-butanol. Se cultiva el lactobacilo en medio MRS (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.) a 37 °C. Se aísla DNA cromosómico de *Lactobacillus plantarum* del modo descrito por Moreira et al. (BMC Microbiol. 5: 15 (2005)).

Integración. El casete *thl-hbd-crt* bajo el control del promotor sintético P11 [Rud et al., Microbiology 152: 1011-1019 (2006)] se integra en el cromosoma de *Lactobacillus plantarum* ATCC BAA-793 (NCIMB 8826), en el locus *ldhL1*, mediante recombinación homóloga. Para construir el vector de direccionamiento para integración de *ldhL*, un fragmento de DNA de *Lactobacillus plantarum* (Genbank NC_004567) con homología con respecto a *ldhL*, es multiplicado por PCR con los cebadores LDH EcoRV F (ID. SEC. nº 198) y LDH AatII R (ID. SEC. nº 199). El fragmento de PCR de 1986 bp es clonado en pCR4Blunt-TOPO y es secuenciado. El clon pCR4Blunt-TOPO-*ldhL1* es digerido con EcoRV y AatII, liberándose un fragmento de *ldhL1* de 1982 bp que es purificado en gel. El vector de integración pFP988, descrito en el Ejemplo 14, es digerido con HindIII y es tratado con DNA polimerasa Klenow para despuntar los extremos. Luego se digiere con AatII el plásmido linealizado y se purifica en gel el fragmento de vector de 2931 bp. El fragmento EcoRV/AatII de *ldhL1* es ligado con el fragmento de vector pFP988 y utilizado para transformar células de *E. coli* Top10. Los transformantes son seleccionados en placas de agar LB que contienen ampicilina (100 µg/ml) y son explorados mediante PCR de colonias para confirmar la construcción de pFP988-*ldhL*.

Para añadir un marcador seleccionable al DNA de integración, se multiplica por PCR el gen *Cm* con su promotor a partir de pC194 (Genbank NC_002013) con los cebadores *Cm* F (ID. SEC. nº 200) y *Cm* R (ID. SEC. nº 201), multiplicándose un producto de PCR de 836 bp. El amplicón es clonado en pCR4Blunt-TOPO y usado para

transformar células de *E. coli* TOP10, creándose pCR4Blunt-TOPO-Cm. Después de una secuenciación para confirmar que no se han introducido errores mediante la PCR, el casete Cm es digerido de pCR4Blunt-TOPO-Cm como un fragmento MluI/SwaI de 828 bp y es purificado en gel. El vector de integración pFP988-IdhL que contiene homología con IdhL es digerido con MluI y SwaI, y el fragmento de vector de 4740 bp es purificado en gel. El fragmento del casete Cm es ligado con el vector pFP988-IdhL, creándose pFP988-DldhL::Cm.

Finalmente, el casete *thl-hbd-crt* de pFP988Dss-T-H-C, descrito en el Ejemplo 14, es modificado para sustituir el promotor de amilasa por el promotor sintético P11. A continuación, se traslada el operón completo a pFP988-DldhL::Cm. Se construye el promotor P11 mediante hibridación de oligonucleótidos por extremos complementarios con los cebadores P11 F (ID. SEC. nº 202) y P11 R (ID. SEC. nº 203). El oligonucleótido hibridado es purificado en un gel ULTRA al 6% para PAGE (Embi Tec, San Diego, California, EE.UU.). El plásmido pFP988Dss-T-H-C es digerido con XhoI y SmaI, y el fragmento de vector de 9 kbp es purificado en gel. El fragmento de P11 aislado es ligado con el plásmido pFP988Dss-T-H-C digerido para crear pFP988-P11-T-H-C. El plásmido pFP988-P11-T-H-C es digerido con XhoI y BamHI, y el fragmento de P11-T-H-C de 3034 bp es purificado en gel. Se digiere pFP988-DldhL::Cm con XhoI y BamHI y se aísla el fragmento de vector de 5558 bp. Se liga el operón de la ruta superior con el vector de integración para crear pFP988-DldhL-P11-THC::Cm.

Integración de pFP988-DldhL-P11-THC::Cm en *L. plantarum* BAA-793 para formar *L. plantarum* ΔldhL1::T-H-C::Cm que comprende genes *thl*, *hbd* y *crt* exógenos. Se preparan células electrocompetentes de *L. plantarum* de la forma descrita por T. W. Aukrust et al. (en "Electroporation Protocols for Microorganisms", redactado por J. A. Nickoloff; Methods in Molecular Biology, volumen 47, Humana Press, Inc., Totowa, New Jersey, EE.UU., 1995, páginas 201-208). Después de la electroporación, las células son desarrolladas en medio MRSSM (medio MRS complementado con sacarosa 0,5 M y MgCl₂ 0,1 M) de la forma descrita por Aukrust et al., *supra*, durante 2 horas a 37 °C sin sacudimiento. Las células sometidas a electroporación son sembradas para selección en placas MRS que contienen cloranfenicol (10 µg/ml) y son incubadas a 37 °C. Los transformantes son inicialmente explorados mediante multiplicación por PCR de colonias para confirmar la integración, y los clones positivos iniciales son luego explorados más rigurosamente mediante multiplicación por PCR con una batería de cebadores.

Expresión plasmídica de los genes EgTER, *ald* y *bdhB*. Los tres genes restantes del 1-butanol se expresan a partir del plásmido pTRKH3 [D. J. O'Sullivan y T. R. Klaenhammer, Gene 137: 227-231 (1993)] bajo el control del promotor IdhL de *L. plantarum* [Ferain et al., J. Bacteriol. 176: 596-601 (1994)]. El promotor IdhL es multiplicado por PCR a partir del genoma de *L. plantarum* ATCC BAA-793 con los cebadores PldhL F (ID. SEC. nº 204) y PldhL R (ID. SEC. nº 205). El producto de PCR de 369 bp es clonado en pCR4Blunt-TOPO y es secuenciado. El plásmido resultante, pCR4Blunt-TOPO-PldhL, es digerido con SacI y BamHI, liberándose el fragmento de pldhL de 359 bp.

Se digiere pHT01-ald-EB, descrito en el Ejemplo 14, con SacI y BamHI y se recupera el fragmento de vector de 10.503 bp mediante purificación en gel. Se ligan el fragmento de PldhL y el vector para crear pHT01-PldhL-ald-EB.

Para subclonar el casete de promotor IdhL-ald-EgTER-bdh, se digiere pHT01-PldhL-ald-EB con MluI y se tratan los extremos con DNA polimerasa Klenow. Se digiere con Sall el vector linealizado y se purifica en gel el fragmento de 4270 bp que contiene el fragmento PldhL-AEB. El plásmido pTRKH3 es digerido con Sall y EcoRV, y el fragmento de vector purificado en gel es ligado con el fragmento PldhL-AEB. Se transforman células de *E. coli* Top 10 con la mezcla de ligación y se siembran los transformantes en placas de medio BHI [Infusión de Cerebro y Corazón (Brain Heart Infusion en inglés); Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.] que contiene eritromicina (150 mg/l). Los transformantes son explorados por PCR para confirmar la construcción de pTRKH3-ald-E-B. Se transforma *L. plantarum* ΔldhL1::T-H-C::Cm con el plásmido de expresión pTRKH3-ald-E-B por electroporación de la manera anteriormente descrita.

Se inocula *L. plantarum* ΔldhL1::T-H-C::Cm que contiene pTRKH3-ald-E-B a un matraz para sacudimiento de 250 ml de capacidad que contiene 50 ml de medio MRS más eritromicina (10 µg/ml) y se cultiva a 37 °C durante un periodo de 18 a 24 horas sin sacudimiento. Después del periodo de 18 a 24 horas, se detecta 1-butanol mediante análisis por HPLC o GC, como se describe en la sección Métodos Generales.

Ejemplo 19 (profético)

Expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en *Enterococcus faecalis*

La finalidad de este Ejemplo profético es describir cómo hacer que se exprese la ruta biosintética del 1-butanol en *Enterococcus faecalis*. La secuencia genómica completa de la cepa V583 de *Enterococcus faecalis*, que se usa como cepa huésped para la expresión de la ruta biosintética del 1-butanol en este Ejemplo, ha sido publicada [Paulsen et al., Science 299: 2071-2074 (2003)]. Se utiliza el plásmido pTRKH3 [D. J. O'Sullivan y T. R. Klaenhammer, Gene 137: 227-231 (1993)], un vector lanzadera de *E. coli*/bacterias Gram positivas, para la expresión de los seis genes (*thlA*, *hbd*, *crt*, *EgTER*, *ald*, *bdhB*) de la ruta del 1-butanol en un operón. pTRKH3 contiene un origen de replicación del plásmido p15A de *E. coli* y el replicón pAMβ¹, y dos marcadores de resistencia a antibióticos para selección, resistencia a tetraciclina y resistencia a eritromicina. La resistencia a tetraciclina sólo se expresa en *E. coli*, y la resistencia a eritromicina se expresa tanto en *E. coli* como en bacterias Gram positivas. Los derivados del plásmido pAMβ1 se pueden replicar en *E. faecalis* [Poyart et al., FEMS Microbiol. Lett. 156: 193-

198 (1997)]. Se utiliza el promotor inducible *nisA* (*PnisA*), que ha sido empleado para un control eficaz de la expresión génica por nisina en una diversidad de bacterias Gram positivas, incluyendo *Enterococcus faecalis* [Eichenbaum et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 2763-2769 (1998)], para controlar la expresión de los seis genes deseados que codifican las enzimas de la ruta biosintética del 1-butanol.

5 El fragmento de DNA lineal (215 bp) que contiene el promotor *nisA* [Chandrapati et al., Mol. Microbiol. 46 (2): 467-477 (2002)] es multiplicado por PCR a partir de DNA genómico de *Lactococcus lactis* con los cebadores F-*PnisA*(EcoRV) (ID. SEC. nº 206) y R-*PnisA*(PmeI BamHI) (ID. SEC. nº 207). Se digiere el fragmento de PCR de 215 bp con EcoRV y BamHI y se purifica en gel el fragmento de *PnisA* resultante. Se digiere el plásmido pTRKH3 con EcoRV y BamHI y se purifica en gel el fragmento de vector. Se liga el plásmido pTRKH3 linealizado con el fragmento de *PnisA*. Se transforman células de *E. coli* TOP10 con la mezcla de ligación mediante electroporación y se seleccionan transformantes después de un cultivo nocturno a 37 °C en placas de agar LB que contienen eritromicina (25 µg/ml). Los transformantes son luego explorados mediante PCR de colonias con los cebadores F-*PnisA*(EcoRV) y R-*PnisA*(BamHI) para confirmar el clon correcto de pTRKH3-*PnisA*.

15 Se digiere el plásmido pTRKH3-*PnisA* con PmeI y BamHI y se purifica en gel el vector. Se construye el plásmido pHT01-*ald-EgTER-bdhB* de la manera descrita en el Ejemplo 14 y se digiere con SmaI y BamHI, y se purifica en gel el fragmento de *ald-EgTER-bdhB* de 2973 bp. Se liga el fragmento de *ald-EgTER-bdhB* de 2973 bp al vector pTRKH3-*PnisA*, en los sitios PmeI y BamHI. Se transforman células de *E. coli* TOP10 con la mezcla de ligación mediante electroporación y se seleccionan transformantes después de una incubación a 37 °C durante la noche en placas de agar LB que contienen eritromicina (25 µg/ml). Los transformantes son luego explorados mediante PCR de colonias con el cebador directo N27F1 de *ald* (ID. SEC. nº 31) y el cebador inverso N65 de *bdhB* (ID. SEC. nº 44). El plásmido resultante es denominado pTRKH3-*PnisA-ald-EgTER-bdhB* (= pTRKH3-A-E-B).

25 Se purifica el plásmido pTRKH3-A-E-B a partir del transformante y se utiliza para la clonación adicional de los genes restantes (*thlA*, *hbd*, *crt*) en el sitio BamHI situado cadena abajo del gen *bdhB*. Se digiere el plásmido pTRKH3-A-E-B con BamHI y se trata con el fragmento Klenow de DNA polimerasa para despuntar los extremos. Se construye el plásmido pFP988Dss-*thlA-hbd-crt* (= pFP988Dss-T-H-C) de la manera descrita en el Ejemplo 14 y se digiere con SmaI y BamHI. El fragmento de *thlA-hbd-crt* resultante de 2973 bp es tratado con el fragmento Klenow de DNA polimerasa para despuntar los extremos y es purificado en gel. El fragmento de *thlA-hbd-crt* de 2973 bp es ligado con el plásmido pTRKH3-A-E-B linealizado. Se transforman células de *E. coli* TOP10 con la mezcla de ligación mediante electroporación y se seleccionan transformantes después de un cultivo nocturno a 37 °C en placas de agar LB que contienen eritromicina (25 µg/ml). Los transformantes son luego explorados mediante PCR de colonias con el cebador directo N7 de *thlA* (ID. SEC. nº 21) y el cebador inverso N4 de *crt* (ID. SEC. nº 18). El plásmido resultante es denominado pTRKH3-*PnisA-ald-EgTER-bdhB-thlA-hbd-crt* (= pTRKH3-A-E-B-T-H-C). Se prepara el plásmido pTRKH3-A-E-B-T-H-C a partir de los transformantes de *E. coli* y se utiliza para transformar células electrocompetentes de *E. faecalis* V583 por electroporación usando métodos conocidos en la técnica (T. W. Aukrust et al. en "Electroporation Protocols for Microorganisms", redactado por J. A. Nickoloff; Methods in Molecular Biology, volumen 47, Humana Press, Inc., Totowa, New Jersey, EE.UU., 1995, páginas 217-226), lo que da lugar a *E. faecalis* V583/pTRKH3-A-E-B-T-H-C.

40 Se transforma *E. Faecalis* V583/pTRKH3-A-E-B-T-H-C, mediante electroporación, con el segundo plásmido que contiene *nisR*, *nisK* y genes reguladores de *nisA*, el gen *add9* de resistencia a espectinomicina, y el origen de replicación de pSH71. El plásmido que contiene el origen de replicación de pSH71 es compatible con derivados de pAMβ1 en *E. faecalis* (Eichenbaum et al., *supra*). Se seleccionan transformantes doblemente resistentes a fármacos en placas de agar LB que contienen eritromicina (25 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml).

45 La cepa resultante V583B de *E. faecalis* que porta dos plásmidos, es decir, un plásmido de expresión (pTRKH3-A-E-B-T-H-C) y un plásmido regulador (pSH71-*nisRK*), se inocula a un matraz para sacudimiento de 250 ml de capacidad que contiene 50 ml de caldo Todd-Hewitt complementado con extracto de levadura (0,2%) [Fischetti et al., J. Exp. Med. 161: 1384-1401 (1985)], nisina (20 µg/ml) (Eichenbaum et al., *supra*), eritromicina (25 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml). Se incuba el matraz sin sacudimiento a 37 °C durante un periodo de 18 a 24 horas, después del cual se mide la producción de 1-butanol mediante análisis por HPLC o GC, como se describe en la sección Métodos Generales.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> E.I. du Pont de Nemours and Co.

<120> Producción de alcoholes de cuatro carbonos por fermentación

<130> CL3241 PCT

5 <160> 208

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1179

<212> DNA

10 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 1

```

atgaaagaag ttgtaatagc tagtgcagta agaacagcga ttggatctta tggaaagtct 60
cttaaggatg taccagcagt agatttagga gctacagcta taaaggaagc agttaaaaaa 120
gcaggaataa aaccagagga tgtaaatgaa gtcatttttag gaaatgttct tcaagcaggt 180
ttaggacaga atccagcaag acaggcatct tttaaagcag gattaccagt tgaaattcca 240
gctatgacta ttaataaggt ttgtggttca ggacttagaa cagttagctt agcagcacia 300
attataaaag caggagatgc tgacgtaata atagcagggtg gtatggaaaa tatgtctaga 360
gctccttact tagcgaataa cgctagatgg ggatatagaa tgggaaacgc taaatttgtt 420
gatgaaatga tcaactgacgg attgtgggat gcatttaatg attaccacat ggggaataaca 480
gcagaaaaca tagctgagag atggaacatt tcaagagaag aacaagatga gtttgctctt 540
gcatcacaaa aaaaagctga agaagctata aaatcaggtc aatttaaaga tgaaatagtt 600
cctgtagtaa ttaaaggcag aaaggagaa actgtagttg atacagatga gcaccctaga 660
tttgatcaa ctatagaagg acttgcaaaa ttaaacctg cttcaaaaa agatggaaca 720
gttacagctg gtaatgcac aggattaaat gactgtgcag cagtacttgt aatcatgagt 780
gcagaaaaag ctaaagagct tggagtaaaa ccacttgcta agatagtttc ttatggttca 840
gcaggagttg acccagcaat aatgggatat ggaccttct atgcaacaaa agcagctatt 900
gaaaaagcag gttggacagt tgatgaatta gatttaatag aatcaaatga agcttttgca 960
gctcaaagtt tagcagtagc aaaagattta aaatttgata tgaataaagt aaatgtaaat 1020
ggaggagcta ttgcccttg tcatccaatt ggagcatcag gtgcaagaat actcgttact 1080
cttgtagacg caatgcaaaa aagagatgca aaaaaggct tagcaacttt atgtataggt 1140
ggcggacaag gaacagcaat attgctagaa aagtgcctag 1179

```

<210> 2

<211> 392

15 <212> PRT

<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 2

Met Lys Glu Val Val Ile Ala Ser Ala Val Arg Thr Ala Ile Gly Ser
1 5 10 15

Tyr Gly Lys Ser Leu Lys Asp Val Pro Ala Val Asp Leu Gly Ala Thr
20 25 30

Ala Ile Lys Glu Ala Val Lys Lys Ala Gly Ile Lys Pro Glu Asp Val
35 40 45

Asn Glu Val Ile Leu Gly Asn Val Leu Gln Ala Gly Leu Gly Gln Asn
50 55 60

Pro Ala Arg Gln Ala Ser Phe Lys Ala Gly Leu Pro Val Glu Ile Pro
65 70 75 80

Ala Met Thr Ile Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Arg Thr Val Ser
85 90 95

Leu Ala Ala Gln Ile Ile Lys Ala Gly Asp Ala Asp Val Ile Ile Ala
100 105 110

Gly Gly Met Glu Asn Met Ser Arg Ala Pro Tyr Leu Ala Asn Asn Ala
115 120 125

Arg Trp Gly Tyr Arg Met Gly Asn Ala Lys Phe Val Asp Glu Met Ile
130 135 140

Thr Asp Gly Leu Trp Asp Ala Phe Asn Asp Tyr His Met Gly Ile Thr
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ile Val Ser Tyr Gly Ser Ala Gly Val Asp Pro Ala Ile Met
 275 280 285
 Gly Tyr Gly Pro Phe Tyr Ala Thr Lys Ala Ala Ile Glu Lys Ala Gly
 290 295 300
 Trp Thr Val Asp Glu Leu Asp Leu Ile Glu Ser Asn Glu Ala Phe Ala
 305 310 315 320
 Ala Gln Ser Leu Ala Val Ala Lys Asp Leu Lys Phe Asp Met Asn Lys
 325 330 335
 Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Leu Gly His Pro Ile Gly Ala
 340 345 350
 Ser Gly Ala Arg Ile Leu Val Thr Leu Val His Ala Met Gln Lys Arg
 355 360 365
 Asp Ala Lys Lys Gly Leu Ala Thr Leu Cys Ile Gly Gly Gly Gln Gly
 370 375 380
 Thr Ala Ile Leu Leu Glu Lys Cys
 385 390

<210> 3
 <211> 1179
 <212> DNA
 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 3

| | |
|--|-----|
| atgagagatg tagtaatagt aagtgcgtgta agaactgcaa taggagcata tggaaaaaca | 60 |
| ttaaaggatg tacctgcaac agagtttagga gctatagtaa taaaggaagc tgtaagaaga | 120 |
| gctaataata atccaaatga gattaatgaa gttatttttg gaaatgtact tcaagctgga | 180 |
| ttaggccaaa acccagcaag acaagcagca gtaaaagcag gattaccttt agaaacacct | 240 |
| gcgtttacaa tcaataaggt ttgtggttca ggtttaagat ctataagttt agcagctcaa | 300 |
| attataaaag ctggagatgc tgataccatt gtagtaggtg gtatggaaaa tatgtctaga | 360 |
| tcaccatatt tgattaacaa tcagagatgg ggtcaaagaa tgggagatag tgaattagtt | 420 |
| gatgaaatga taaaggatgg tttgtgggat gcatttaatg gatatcatat gggagtaact | 480 |
| gcagaaaata ttgcagaaca atggaatata acaagagaag agcaaatga attttcactt | 540 |
| atgtcacaac aaaaagctga aaaagccatt aaaaatggag aatttaagga tgaaatagtt | 600 |
| cctgtattaa taaagactaa aaaaggtgaa atagtctttg atcaaatga atttcctaga | 660 |
| ttcggaaca ctattgaagc attaagaaaa cttaaaccta ttttcaagga aaatgggtact | 720 |
| gttacagcag gtaatgcac cggattaaat gatggagctg cagcactagt aataatgagc | 780 |
| gctgataaag ctaacgctct cggaataaaa ccacttgcta agattacttc ttacggatca | 840 |

tatggggtag atccatcaat aatgggatat ggagcttttt atgcaactaa agctgcctta 900
gataaaatta atttaaaacc tgaagactta gatttaattg aagctaacga ggcataatgct 960
tctcaaagta tagcagtaac tagagattta aatttagata tgagtaaagt taatgttaat 1020
gggtggagcta tagcacttgg acatccaata ggtgcatctg gtgcacgtat tttagtaaca 1080
ttactatacg ctatgcaaaa aagagattca aaaaaaggctc ttgctactct atgtattggt 1140
ggaggtcagg gaacagctct cgtagttgaa agagactaa 1179

<210> 4

<211> 392

<212> PRT

5 <213> clostridium acetobutylicum

<400> 4

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

Gly Glu Phe Lys Asp Glu Ile Val Pro Val Leu Ile Lys Thr Lys Lys
 195 200 205
 Gly Glu Ile Val Phe Asp Gln Asp Glu Phe Pro Arg Phe Gly Asn Thr
 210 215 220
 Ile Glu Ala Leu Arg Lys Leu Lys Pro Ile Phe Lys Glu Asn Gly Thr
 225 230 235 240
 Val Thr Ala Gly Asn Ala Ser Gly Leu Asn Asp Gly Ala Ala Ala Leu
 245 250 255
 Val Ile Met Ser Ala Asp Lys Ala Asn Ala Leu Gly Ile Lys Pro Leu
 260 265 270
 Ala Lys Ile Thr Ser Tyr Gly Ser Tyr Gly Val Asp Pro Ser Ile Met
 275 280 285
 Gly Tyr Gly Ala Phe Tyr Ala Thr Lys Ala Ala Leu Asp Lys Ile Asn
 290 295 300
 Leu Lys Pro Glu Asp Leu Asp Leu Ile Glu Ala Asn Glu Ala Tyr Ala
 305 310 315 320
 Ser Gln Ser Ile Ala Val Thr Arg Asp Leu Asn Leu Asp Met Ser Lys
 325 330 335
 Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Leu Gly His Pro Ile Gly Ala
 340 345 350
 Ser Gly Ala Arg Ile Leu Val Thr Leu Leu Tyr Ala Met Gln Lys Arg
 355 360 365
 Asp Ser Lys Lys Gly Leu Ala Thr Leu Cys Ile Gly Gly Gly Gln Gly
 370 375 380
 Thr Ala Leu Val Val Glu Arg Asp
 385 390

<210> 5

<211> 849

<212> DNA

5 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 5

| | |
|---|-----|
| atgaaaaagg tatgtgttat aggtgcaggt actatgggtt caggaattgc tcaggcattt | 60 |
| gcagctaaag gatttgaagt agtattaaga gatattaaag atgaatttgt tgatagagga | 120 |
| ttagatttta tcaataaaaa tctttctaaa ttagttaaaa aaggaaagat agaagaagct | 180 |
| actaaagttg aaatcttaac tagaatttcc ggaacagttg accttaatat ggcagctgat | 240 |

tgcgatttag ttatagaagc agctgttgaa agaattggata ttaaaaagca gatttttgc 300
 gacttagaca atatattgcaa gccagaaaca attcttgcac caaatacatc atcactttca 360
 ataacagaag tggcatcagc aactaaaaga cctgataagg ttataggtat gcatttcttt 420
 aatccagctc ctgttatgaa gcttgttagag gtaataagag gaatagctac atcacaagaa 480
 acttttgcag cagttaaaga gacatctata gcaataggaa aagatcctgt agaagtagca 540
 gaagcaccag gatttgttgt aaatagaata ttaataccaa tgattaatga agcagttggt 600
 atattagcag aaggaatagc ttcagtagaa gacatagata aagctatgaa acttggagct 660
 aatcacccaa tgggaccatt agaattaggt gattttatag gtcttgatat atgtcttgct 720
 ataattgatg ttttatactc agaaactgga gattctaagt atagaccaca tacattactt 780
 aagaagtatg taagagcagg atggcttgga agaaaatcag gaaaagggtt ctacgattat 840
 tcaaaataa 849

<210> 6

<211> 282

<212> PRT

5 <213> clostridium acetobutylicum

<400> 6

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

145 150 155 160

Thr Phe Asp Ala Val Lys Glu Thr Ser Ile Ala Ile Gly Lys Asp Pro
 165 170 175

Val Glu Val Ala Glu Ala Pro Gly Phe Val Val Asn Arg Ile Leu Ile
 180 185 190

Pro Met Ile Asn Glu Ala Val Gly Ile Leu Ala Glu Gly Ile Ala Ser
 195 200 205

Val Glu Asp Ile Asp Lys Ala Met Lys Leu Gly Ala Asn His Pro Met
 210 215 220

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

Ile Met Asp Val Leu Tyr Ser Glu Thr Gly Asp Ser Lys Tyr Arg Pro
 245 250 255

His Thr Leu Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Gly Trp Leu Gly Arg Lys
 260 265 270

Ser Gly Lys Gly Phe Tyr Asp Tyr Ser Lys
 275 280

<210> 7
<211> 786
<212> DNA
5 <213> clostridium acetobutylicum

<400> 7

| | |
|---|-----|
| atggaactaa acaatgtcat ccttgaaaag gaaggtaaag ttgctgtagt taccattaac | 60 |
| agacctaaag cattaatgac gttaaatagt gatacactaa aagaaatgga ttatgttata | 120 |
| gggtgaaattg aaaatgatag cgaagtactt gcagtaattt taactggagc aggagaaaaa | 180 |
| tcattttagtag caggagcaga tatttctgag atgaaggaaa tgaataccat tgaaggtaga | 240 |
| aaattcggga tacttggaata taaagtgttt agaagattag aacttcttga aaagcctgta | 300 |
| atagcagctg ttaattggttt tgcttttagga ggcggatgag aaatagctat gtcttgtgat | 360 |
| ataagaatag cttcaagcaa cgcaagattt ggtcaaccag aagtaggtct cggaataaca | 420 |
| cctggttttg gtggtacaca aagactttca agattagttg gaatgggcat ggcaaagcag | 480 |
| cttatattta ctgcacaaaa tataaaggca gatgaagcat taagaatcgg acttgtaaat | 540 |
| aaggtagtag aacctagtga attaatgaat acagcaaaaag aaattgcaaa caaaattgtg | 600 |
| agcaatgctc cagtagctgt taagttaagc aaacaggcta ttaatagagg aatgcagtgt | 660 |
| gatattgata ctgcttttagc atttgaatca gaagcatttg gagaatgctt ttcaacagag | 720 |
| gatcaaaagg atgcaatgac agctttcata gagaaaagaa aaattgaagg cttcaaaaat | 780 |
| agatag | 786 |

<210> 8
10 <211> 261
<212> PRT
<213> clostridium acetobutylicum
<400> 8

Met Glu Leu Asn Asn Val Ile Leu Glu Lys Glu Gly Lys Val Ala Val
1 5 10 15
Val Thr Ile Asn Arg Pro Lys Ala Leu Asn Ala Leu Asn Ser Asp Thr
20 25 30
Leu Lys Glu Met Asp Tyr Val Ile Gly Glu Ile Glu Asn Asp Ser Glu
35 40 45
Val Leu Ala Val Ile Leu Thr Gly Ala Gly Glu Lys Ser Phe Val Ala
50 55 60
Gly Ala Asp Ile Ser Glu Met Lys Glu Met Asn Thr Ile Glu Gly Arg
65 70 75 80
Lys Phe Gly Ile Leu Gly Asn Lys Val Phe Arg Arg Leu Glu Leu Leu
85 90 95
Glu Lys Pro Val Ile Ala Ala Val Asn Gly Phe Ala Leu Gly Gly Gly
100 105 110
Cys Glu Ile Ala Met Ser Cys Asp Ile Arg Ile Ala Ser Ser Asn Ala
115 120 125
Arg Phe Gly Gln Pro Glu Val Gly Leu Gly Ile Thr Pro Gly Phe Gly
130 135 140
Gly Thr Gln Arg Leu Ser Arg Leu Val Gly Met Gly Met Ala Lys Gln
145 150 155 160
Leu Ile Phe Thr Ala Gln Asn Ile Lys Ala Asp Glu Ala Leu Arg Ile
165 170 175
Gly Leu Val Asn Lys Val Val Glu Pro Ser Glu Leu Met Asn Thr Ala
180 185 190
Lys Glu Ile Ala Asn Lys Ile Val Ser Asn Ala Pro Val Ala Val Lys
195 200 205
Leu Ser Lys Gln Ala Ile Asn Arg Gly Met Gln Cys Asp Ile Asp Thr
210 215 220
Ala Leu Ala Phe Glu Ser Glu Ala Phe Gly Glu Cys Phe Ser Thr Glu
225 230 235 240
Asp Gln Lys Asp Ala Met Thr Ala Phe Ile Glu Lys Arg Lys Ile Glu
245 250 255
Gly Phe Lys Asn Arg
260

<210> 9
<211> 1197
5 <212> DNA
<213> clostridium acetobutylicum
<400> 9

ES 2 446 520 T3

```

atgatagtaa aagcaaagtt tgtaaaagga tttatcagag atgtacatcc ttatggttgc 60
agaaggggaag tactaaatca aatagattat tgtaagaagg ctattggggt taggggacca 120
aagaagggtt taattgttgg agcctcatct gggtttggtc ttgctactag aatttcagtt 180
gcatttggag gtccagaagc tcacacaatt ggagtatcct atgaaacagg agctacagat 240
agaagaatag gaacagcggg atggtataat aacatatttt ttaaagaatt tgctaaaaaa 300
aaaggattag ttgcaaaaaa cttcattgag gatgcctttt ctaatgaaac caaagataaa 360
gttattaagt atataaagga tgaatttggg aaaatagatt tatttgttta tagtttagct 420
gcgcttagga gaaaggacta taaaactgga aatgtttata cttcaagaat aaaaacaatt 480
ttaggagatt ttgagggacc gactattgat gttgaaagag acgagattac tttaaaaaag 540
gttagtagtg ctagcatiga agaaattgaa gaaactagaa aggtaatggg tggagaggat 600
tggcaagagt ggtgtgaaga gctgctttat gaagattgtt tttcggataa agcaactacc 660
atagcatact cgtatatagg atccccaaga acctacaaga tatatagaga aggtactata 720
ggaatagcta aaaaggatct tgaagataag gctaagctta taaatgaaaa acttaacaga 780
gttatagggt gtagagcctt tgtgtctgtg aataaagcat tagttacaaa agcaagtgc 840
tatattccaa cttttcctct ttatgcagct attttatata aggtcatgaa agaaaaaat 900
attcatgaaa attgtattat gcaaattgag agaattgttt ctgaaaaaat atattcaa 960
gaaaaaatac aatttgatga caagggaaga ttaaggatgg acgatttaga gcttagaaaa 1020
gacgttcaag acgaagtga tagaatatgg agtaatatta ctcctgaaaa ttttaaggaa 1080
ttatctgatt ataagggata caaaaaagaa ttcatgaact taaacggttt tgatctagat 1140
ggggttgatt atagtaaaga cctggatata gaattattaa gaaaattaga accttaa 1197

```

<210> 10

<211> 398

<212> PRT

5 <213> clostridium acetobutylicum

<400> 10

Met Ile Val Lys Ala Lys Phe Val Lys Gly Phe Ile Arg Asp Val His
1 5 10 15

Pro Tyr Gly Cys Arg Arg Glu Val Leu Asn Gln Ile Asp Tyr Cys Lys.
20 25 30

Lys Ala Ile Gly Phe Arg Gly Pro Lys Lys Val Leu Ile Val Gly Ala
35 40 45

Ser Ser Gly Phe Gly Leu Ala Thr Arg Ile Ser Val Ala Phe Gly Gly
50 55 60

Pro Glu Ala His Thr Ile Gly Val Ser Tyr Glu Thr Gly Ala Thr Asp
65 70 75 80

Arg Arg Ile Gly Thr Ala Gly Trp Tyr Asn Asn Ile Phe Phe Lys Glu
85 90 95

Phe Ala Lys Lys Lys Gly Leu Val Ala Lys Asn Phe Ile Glu Asp Ala
100 105 110

Phe Ser Asn Glu Thr Lys Asp Lys Val Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Glu
115 120 125

Phe Gly Lys Ile Asp Leu Phe Val Tyr Ser Leu Ala Ala Pro Arg Arg
130 135 140

Lys Asp Tyr Lys Thr Gly Asn Val Tyr Thr Ser Arg Ile Lys Thr Ile
145 150 155 160

Leu Gly Asp Phe Glu Gly Pro Thr Ile Asp Val Glu Arg Asp Glu Ile
165 170 175

Thr Leu Lys Lys Val Ser Ser Ala Ser Ile Glu Glu Ile Glu Glu Thr
180 185 190

Arg Lys Val Met Gly Gly Glu Asp Trp Gln Glu Trp Cys Glu Glu Leu
195 200 205

Leu Tyr Glu Asp Cys Phe Ser Asp Lys Ala Thr Thr Ile Ala Tyr Ser
210 215 220

Tyr Ile Gly Ser Pro Arg Thr Tyr Lys Ile Tyr Arg Glu Gly Thr Ile
225 230 235 240

Gly Ile Ala Lys Lys Asp Leu Glu Asp Lys Ala Lys Leu Ile Asn Glu
245 250 255

Lys Leu Asn Arg Val Ile Gly Gly Arg Ala Phe Val Ser Val Asn Lys
260 265 270

Ala Leu Val Thr Lys Ala Ser Ala Tyr Ile Pro Thr Phe Pro Leu Tyr

275 280 285

Ala Ala Ile Leu Tyr Lys Val Met Lys Glu Lys Asn Ile His Glu Asn
290 295 300

Cys Ile Met Gln Ile Glu Arg Met Phe Ser Glu Lys Ile Tyr Ser Asn
305 310 315 320

Glu Lys Ile Gln Phe Asp Asp Lys Gly Arg Leu Arg Met Asp Asp Leu
325 330 335

Glu Leu Arg Lys Asp Val Gln Asp Glu Val Asp Arg Ile Trp Ser Asn
340 345 350

Ile Thr Pro Glu Asn Phe Lys Glu Leu Ser Asp Tyr Lys Gly Tyr Lys
355 360 365

Lys Glu Phe Met Asn Leu Asn Gly Phe Asp Leu Asp Gly Val Asp Tyr
370 375 380

Ser Lys Asp Leu Asp Ile Glu Leu Leu Arg Lys Leu Glu Pro
385 390 395

<210> 11
<211> 1407
<212> DNA
<213> Clostridium beijerinckii

<400> 11

atgaataaag acacactaat acctacaact aaagatttaa aagtaaaaac aaatggtgaa 60

aacattaatt taaagaacta caaggataat tcttcatggt tcggagtatt cgaaaatggt 120

gaaaatgcta taagcagcgc tgtacacgca caaaagatat tatcccttca ttatacaaaa 180

gagcaaagag aaaaaatcat aactgagata agaaaggccg cattacaaaa taaagaggtc 240

ttggctacaa tgattctaga agaaacacat atgggaagat atgaggataa aatattaaaa 300

catgaattgg tagctaaata tactcctggt acagaagatt taactactac tgcttgggtca 360

ggtgataatg gtcttacagt tgtagaaatg tctccatatg gtgttatagg tgcaataact 420

ccttctacga atccaactga aactgtaata tgtaatagca taggcatgat agctgctgga 480

aatgctgtag tatttaacgg acacccatgc gctaaaaaat gtgttgccctt tgctgttgaa 540

atgataaata aggcaattat ttcattgtggc ggtcctgaaa atctagtaac aactataaaa 600

aatccaacta tggagtctct agatgcaatt attaagcatc cttcaataaa acttctttgc 660

ggaactgggg gtccaggaat ggtaaaaacc ctcttaaatt ctggttaagaa agctataggt 720

gctggtgctg gaaatccacc agttattgta gatgatactg ctgatataga aaaggctggt 780

aggagcatca ttgaaggctg ttcttttgat aataatttac cttgtattgc agaaaaagaa 840

gtatttggtt ttgagaatgt tgcagatgat ttaatatcta acatgctaaa aaataatgct 900

gtaattataa atgaagatca agtatcaaaa ttaatagatt tagtattaca aaaaaataat 960
gaaactcaag aatactttat aaacaaaaaa tgggtaggaa aagatgcaaa attattctta 1020
gatgaaatag atgttgagtc tccttcaa atgttaaagca taatctgcga agtaaatgca 1080
aatcatccat ttgttatgac agaactcatg atgccaatat tgccaattgt aagagttaaa 1140
gatatagatg aagctattaa atatgcaaag atagcagaac aaaatagaaa acatagtgcc 1200
tatatttatt ctaaaaatat agacaaccta aatagatttg aaagagaaat agatactact 1260
atTTTTgtaa agaatgctaa atcttttgct ggtgttggtt atgaagcaga aggatttaca 1320
actttcacta ttgctggatc tactggtgag ggaataacct ctgcaaggaa ttttacaaga 1380
caaagaagat gtgtacttgc cggctaa 1407

<210> 12

<211> 468

<212> PRT

5 <213> clostridium beijerinckii

<400> 12

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

Thr Asn Gly Glu Asn Ile Asn Leu Lys Asn Tyr Lys Asp Asn Ser Ser
20 25 30

Cys Phe Gly Val Phe Glu Asn Val Glu Asn Ala Ile Ser Ser Ala Val
35 40 45

His Ala Gln Lys Ile Leu Ser Leu His Tyr Thr Lys Glu Gln Arg Glu
50 55 60

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

Leu Ala Thr Met Ile Leu Glu Glu Thr His Met Gly Arg Tyr Glu Asp
85 90 95

Lys Ile Leu Lys His Glu Leu Val Ala Lys Tyr Thr Pro Gly Thr Glu
100 105 110

Asp Leu Thr Thr Thr Ala Trp Ser Gly Asp Asn Gly Leu Thr Val Val
115 120 125

Glu Met Ser Pro Tyr Gly Val Ile Gly Ala Ile Thr Pro Ser Thr Asn
130 135 140

Pro Thr Glu Thr Val Ile Cys Asn Ser Ile Gly Met Ile Ala Ala Gly
145 150 155 160

Asn Ala Val Val Phe Asn Gly His Pro Cys Ala Lys Lys Cys Val Ala

165 170 175

Phe Ala Val Glu Met Ile Asn Lys Ala Ile Ile Ser Cys Gly Gly Pro
180 185 190

Glu Asn Leu Val Thr Thr Ile Lys Asn Pro Thr Met Glu Ser Leu Asp
195 200 205

Ala Ile Ile Lys His Pro Ser Ile Lys Leu Leu Cys Gly Thr Gly Gly
210 215 220

Pro Gly Met Val Lys Thr Leu Leu Asn Ser Gly Lys Lys Ala Ile Gly
225 230 235 240

Ala Gly Ala Gly Asn Pro Pro Val Ile Val Asp Asp Thr Ala Asp Ile
245 250 255

Glu Lys Ala Gly Arg Ser Ile Ile Glu Gly Cys Ser Phe Asp Asn Asn
260 265 270

Leu Pro Cys Ile Ala Glu Lys Glu Val Phe Val Phe Glu Asn Val Ala
275 280 285

Asp Asp Leu Ile Ser Asn Met Leu Lys Asn Asn Ala Val Ile Ile Asn
290 295 300

Glu Asp Gln Val Ser Lys Leu Ile Asp Leu Val Leu Gln Lys Asn Asn
305 310 315 320

Glu Thr Gln Glu Tyr Phe Ile Asn Lys Lys Trp Val Gly Lys Asp Ala
325 330 335

Lys Leu Phe Leu Asp Glu Ile Asp Val Glu Ser Pro Ser Asn Val Lys
340 345 350

Cys Ile Ile Cys Glu Val Asn Ala Asn His Pro Phe Val Met Thr Glu
355 360 365

Leu Met Met Pro Ile Leu Pro Ile Val Arg Val Lys Asp Ile Asp Glu
370 375 380

Ala Ile Lys Tyr Ala Lys Ile Ala Glu Gln Asn Arg Lys His Ser Ala
385 390 395 400

Tyr Ile Tyr Ser Lys Asn Ile Asp Asn Leu Asn Arg Phe Glu Arg Glu
405 410 415

Ile Asp Thr Thr Ile Phe Val Lys Asn Ala Lys Ser Phe Ala Gly Val
420 425 430

Gly Tyr Glu Ala Glu Gly Phe Thr Thr Phe Thr Ile Ala Gly Ser Thr
435 440 445

Gly Glu Gly Ile Thr Ser Ala Arg Asn Phe Thr Arg Gln Arg Arg Cys
450 455 460

Val Leu Ala Gly
465

<210> 13
<211> 1215

<212> DNA

<213> clostridium acetobutylicum

<400> 13

```

atggttgatt tcgaatattc aataccaact agaatttttt tcggtaaaga taagataaat    60
gtacttgga gagagcttaa aaaatatggt tctaaagtgc ttatagttta tggaggagga    120
agtataaaga gaaatggaat atatgataaa gctgtaagta tacttgaaaa aaacagtatt    180
aaattttatg aacttgcaagg agtagagcca aatccaagag taactacagt tgaaaaagga    240
gttaaaatat gtagagaaaa tggagttgaa gtagtactag ctataggtgg aggaagtgc    300
atagattgag caaagggtat agcagcagca tgtgaatatg atggaaatcc atgggatatt    360
gtgttagatg gctcaaaaat aaaaagggtg cttcctatag ctagtatatt aaccattgct    420
gcaacaggat cagaaatgga tacgtgggca gtaataaata atatggatac aaacgaaaaa    480
ctaattgcgg cacatccaga tatggctcct aagttttcta tattagatcc aacgtatacg    540
tataccgtac ctaccaatca aacagcagca ggaacagctg atattatgag tcatatattt    600
gaggtgtatt ttagtaatac aaaaacagca tatttgcagg atagaatggc agaagcgta    660
ttaagaactt gtattaaata tggaggaata gctcttgaga agccggatga ttatgaggca    720
agagccaatc taatgtgggc ttcaagtctt gcgataaatg gacttttaac atatggtaaa    780
gacactaatt ggagtgtaca cttaatggaa catgaattaa gtgcttatta cgacataaca    840
cacggcgtag ggcttgcaat tttaacacct aattggatgg agtatatttt aaataatgat    900
acagtgtaca agtttgttga atatggtgta aatgtttggg gaatagacaa agaaaaaat    960
cactatgaca tagcacatca agcaatacaa aaaacaagag attactttgt aaatgtacta   1020
ggtttaccat ctagactgag agatgttgga attgaagaag aaaaattgga cataatggca   1080
aaggaatcag taaagcttac aggaggaacc ataggaaacc taagaccagt aaacgcctcc   1140
gaagtcctac aaatattcaa aaaatctgtg taaaacgcct ccgaagtcct acaaatattc   1200
aaaaaatctg tgtaa .                                     1215

```

5

<210> 14

<211> 390

<212> PRT

<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 14

ES 2 446 520 T3

Met Val Asp Phe Glu Tyr Ser Ile Pro Thr Arg Ile Phe Phe Gly Lys
 1 5 10 15
 Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Arg Glu Leu Lys Lys Tyr Gly Ser Lys
 20 25 30
 Val Leu Ile Val Tyr Gly Gly Gly Ser Ile Lys Arg Asn Gly Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Lys Ala Val Ser Ile Leu Glu Lys Asn Ser Ile Lys Phe Tyr Glu
 50 55 60
 Leu Ala Gly Val Glu Pro Asn Pro Arg Val Thr Thr Val Glu Lys Gly
 65 70 75 80
 Val Lys Ile Cys Arg Glu Asn Gly Val Glu Val Val Leu Ala Ile Gly
 85 90 95
 Gly Gly Ser Ala Ile Asp Cys Ala Lys Val Ile Ala Ala Ala Cys Glu
 100 105 110
 Tyr Asp Gly Asn Pro Trp Asp Ile Val Leu Asp Gly Ser Lys Ile Lys
 115 120 125
 Arg Val Leu Pro Ile Ala Ser Ile Leu Thr Ile Ala Ala Thr Gly Ser
 130 135 140
 Glu Met Asp Thr Trp Ala Val Ile Asn Asn Met Asp Thr Asn Glu Lys
 145 150 155 160
 Leu Ile Ala Ala His Pro Asp Met Ala Pro Lys Phe Ser Ile Leu Asp
 165 170 175
 Pro Thr Tyr Thr Tyr Thr Val Pro Thr Asn Gln Thr Ala Ala Gly Thr
 180 185 190
 Ala Asp Ile Met Ser His Ile Phe Glu Val Tyr Phe Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Thr Ala Tyr Leu Gln Asp Arg Met Ala Glu Ala Leu Leu Arg Thr Cys
 210 215 220
 Ile Lys Tyr Gly Gly Ile Ala Leu Glu Lys Pro Asp Asp Tyr Glu Ala
 225 230 235 240
 Arg Ala Asn Leu Met Trp Ala Ser Ser Leu Ala Ile Asn Gly Leu Leu
 245 250 255
 Thr Tyr Gly Lys Asp Thr Asn Trp Ser Val His Leu Met Glu His Glu
 260 265 270

Leu Ser Ala Tyr Tyr Asp Ile Thr His Gly Val Gly Leu Ala Ile Leu
 275 280 285
 Thr Pro Asn Trp Met Glu Tyr Ile Leu Asn Asn Asp Thr Val Tyr Lys
 290 295 300
 Phe Val Glu Tyr Gly Val Asn Val Trp Gly Ile Asp Lys Glu Lys Asn
 305 310 315 320
 His Tyr Asp Ile Ala His Gln Ala Ile Gln Lys Thr Arg Asp Tyr Phe
 325 330 335
 Val Asn Val Leu Gly Leu Pro Ser Arg Leu Arg Asp Val Gly Ile Glu
 340 345 350
 Glu Glu Lys Leu Asp Ile Met Ala Lys Glu Ser Val Lys Leu Thr Gly
 355 360 365
 Gly Thr Ile Gly Asn Leu Arg Pro Val Asn Ala Ser Glu Val Leu Gln
 370 375 380
 Ile Phe Lys Lys Ser Val
 385 390

<210> 15
 <211> 1170
 <212> DNA
 <213> clostridium acetobutylicum

<400> 15

atgctaagtt ttgattattc aataccaact aaagtttttt ttggaaaagg aaaaatagac 60
 gtaattggag aagaaattaa gaaatatggc tcaagagtgc ttatagttta tggcggagga 120
 agtataaaaa ggaacggtat atatgataga gcaacagcta tattaanaaga aaacaatata 180
 gctttctatg aactttcagg agtagagcca aatccttaga taacaacagt aaaaaaaggc 240
 atagaaatat gtagagaaaa taatgtggat ttagtattag caataggggg aggaagtga 300
 atagactgtt ctaaggtaat tgcagctgga gtttattatg atggcgatac atgggacatg 360
 gttaaagatc catctaaaat aactaaagtt cttccaattg caagtatact tactctttca 420
 gcaacagggt ctgaaatgga tcaaattgca gtaatttcaa atatggagac taatgaaaag 480
 cttggagtag gacatgatga tatgagacct aaattttcag tgtagatcc tacatatact 540
 ttacagtac ctaaaaatca aacagcagcg ggaacagctg acattatgag tcacaccttt 600
 gaatcttact ttagtggtgt tgaagggtgt tatgtgcagg acggtatagc agaagcaatc 660
 ttaagaacat gtataaagta tggaaaaata gcaatggaga agactgatga ttacgaggct 720
 agagctaatt tgatgtgggc ttcaagttta gctataaatg gtctattatc acttggttaag 780
 gatagaaaat ggagttgtca tcctatggaa cacgagttaa gtgcatatta tgatataaca 840

catgggtgtag gacttgcaat tttaacacct aattggatgg aatatattct aaatgacgat 900
acacttcata aatttgtttc ttatggaata aatgtttggg gaatagacaa gaacaaagat 960
aactatgaaa tagcacgaga ggctattaaa aatacgagag aatactttaa ttcattgggt 1020
attccttcaa agcttagaga agttggaata ggaaaagata aactagaact aatggcaaag 1080
caagctgtta gaaattctgg aggaacaata ggaagtttaa gaccaataaa tgcagaggat 1140
gttcttgaga tatttaaaaa atcttattaa 1170

<210> 16
<211> 389
<212> PRT
5 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 16

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

Ala Asp Ile Met Ser His Thr Phe Glu Ser Tyr Phe Ser Gly Val Glu
195 200 205
Gly Ala Tyr Val Gln Asp Gly Ile Ala Glu Ala Ile Leu Arg Thr Cys
210 215 220
Ile Lys Tyr Gly Lys Ile Ala Met Glu Lys Thr Asp Asp Tyr Glu Ala
225 230 235 240
Arg Ala Asn Leu Met Trp Ala Ser Ser Leu Ala Ile Asn Gly Leu Leu
245 250 255
Ser Leu Gly Lys Asp Arg Lys Trp Ser Cys His Pro Met Glu His Glu
260 265 270
Leu Ser Ala Tyr Tyr Asp Ile Thr His Gly Val Gly Leu Ala Ile Leu
275 280 285
Thr Pro Asn Trp Met Glu Tyr Ile Leu Asn Asp Asp Thr Leu His Lys
290 295 300
Phe Val Ser Tyr Gly Ile Asn Val Trp Gly Ile Asp Lys Asn Lys Asp
305 310 315 320
Asn Tyr Glu Ile Ala Arg Glu Ala Ile Lys Asn Thr Arg Glu Tyr Phe
325 330 335
Asn Ser Leu Gly Ile Pro Ser Lys Leu Arg Glu Val Gly Ile Gly Lys
340 345 350
Asp Lys Leu Glu Leu Met Ala Lys Gln Ala Val Arg Asn Ser Gly Gly
355 360 365
Thr Ile Gly Ser Leu Arg Pro Ile Asn Ala Glu Asp Val Leu Glu Ile
370 375 380
Phe Lys Lys Ser Tyr
385

<210> 17
<211> 29
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 17
caccatggaa ctaaacaatg tcaccttg 29

10 <210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Cebador

<400> 18
cctcctatct attttgaag ccttc 25

<210> 19

| | | | |
|----|----------------------------------|----|--|
| | <211> 28 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| | <220> | | |
| 5 | <223> Cebador | | |
| | <400> 19 | | |
| | caccatgaaa aaggtatgtg ttataggt | 28 | |
| | <210> 20 | | |
| | <211> 23 | | |
| 10 | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| | <220> | | |
| | <223> Cebador | | |
| | <400> 20 | | |
| 15 | catttgataa tggggattct tgt | 23 | |
| | <210> 21 | | |
| | <211> 30 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| 20 | <220> | | |
| | <223> Cebador | | |
| | <400> 21 | | |
| | caccatgaaa gaagttgtaa tagctagtgc | 30 | |
| | <210> 22 | | |
| 25 | <211> 26 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| | <220> | | |
| | <223> Cebador | | |
| 30 | <400> 22 | | |
| | ctagcacttt tctagcaata ttgctg | 26 | |
| | <210> 23 | | |
| | <211> 29 | | |
| | <212> DNA | | |
| 35 | <213> Secuencia artificial | | |
| | <220> | | |
| | <223> Cebador | | |
| | <400> 23 | | |
| | caccatgcta agttttgatt attcaatac | 29 | |
| 40 | <210> 24 | | |
| | <211> 25 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| | <220> | | |
| 45 | <223> Cebador | | |
| | <400> 24 | | |
| | ttaataagat ttttaaata tctca | 25 | |
| | <210> 25 | | |
| | <211> 30 | | |
| 50 | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | |

| | | | |
|----|-------|------------------------------------|----|
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 25 | |
| | | caccatgggt gatttcgaat attcaatacc | 30 |
| 5 | <210> | 26 | |
| | <211> | 25 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia Artificial | |
| | <220> | | |
| 10 | <223> | Cebador | |
| | <400> | 26 | |
| | | ttacacagat ttttgaata ttgt | 25 |
| | <210> | 27 | |
| | <211> | 32 | |
| 15 | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia Artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 27 | |
| 20 | | caccatgaga gatgtagtaa tagtaagtc tg | 32 |
| | <210> | 28 | |
| | <211> | 24 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia Artificial | |
| 25 | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 28 | |
| | | ccgcaattgt atccatattg aacc | 24 |
| | <210> | 29 | |
| 30 | <211> | 26 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| 35 | <400> | 29 | |
| | | caccatgata gtaaaagcaa agtttg | 26 |
| | <210> | 30 | |
| | <211> | 27 | |
| | <212> | DNA | |
| 40 | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 30 | |
| | | gcttaaagct taaaaccgct tctggcg | 27 |
| 45 | <210> | 31 | |
| | <211> | 27 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 50 | <223> | Cebador | |

| | | |
|----|---|----|
| | <400> 31 caccatgaat aaagacacac taatacc | 27 |
| 5 | <210> 32 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador | |
| 10 | <400> 32 gccagaccat cttgaaaat gcgc | 24 |
| | <210> 33 <211> 35 <212> DNA <213> Secuencia artificial | |
| 15 | <220> <223> Cebador | |
| | <400> 33 catgcatgca aaggaggta gtagaatgaa agaag | 35 |
| 20 | <210> 34 <211> 38 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador | |
| 25 | <400> 34 gtcctgcagg gcgcgcccaa tactttctag cacttttc | 38 |
| | <210> 35 <211> 39 <212> DNA <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> <223> Cebador | |
| | <400> 35 catgtcgaca aaggagggtct gtttaatgaa aaaggatatg | 39 |
| 35 | <210> 36 <211> 28 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador | |
| 40 | <400> 36 gtcgcgatgcc ttgtaaactt attttgaa | 28 |
| 45 | <210> 37 <211> 44 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador | |
| 50 | <400> 37 catagatctg gatccaaagg aggggtgagga aatgatagta aaag | 44 |

| | | | |
|----|-------|---|----|
| | <210> | 38 | |
| | <211> | 30 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| 5 | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 38 | |
| | | catgtcgacg tgcagccttt ttaaggttct | 30 |
| 10 | <210> | 39 | |
| | <211> | 38 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| 15 | <400> | 39 | |
| | | catgaattca cgcgtaaagg aggtattagt catggaac | 38 |
| | <210> | 40 | |
| | <211> | 30 | |
| | <212> | DNA | |
| 20 | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 40 | |
| | | gtcggatccc ttacctccta tctatttttg | 30 |
| 25 | <210> | 41 | |
| | <211> | 42 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 30 | <223> | Cebador | |
| | <400> | 41 | |
| | | catgcccgagg ggtcaccaaa ggaggaatag ttcatgaata aa | 42 |
| | <210> | 42 | |
| | <211> | 32 | |
| 35 | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 42 | |
| 40 | | catggttaac aagaagttag cggcaagta ca | 32 |
| | <210> | 43 | |
| | <211> | 41 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 43 | |
| | | catggttaac aaaggagggg ttaaaatggt tgatttcgaa t | 41 |
| | <210> | 44 | |
| 50 | <211> | 37 | |
| | <212> | DNA | |

| | | |
|----|--|----|
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador | |
| | <400> 44 | |
| 5 | catggcatgc gtttaacgt aggttacac agatttt | 37 |
| | <210> 45 | |
| | <211> 17 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> | |
| | <223> Cebador | |
| | <400> 45 | |
| | gtaaaacgac ggccagt | 17 |
| | <210> 46 | |
| 15 | <211> 16 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador | |
| 20 | <400> 46 | |
| | aacagctatg accatg | 16 |
| | <210> 47 | |
| | <211> 22 | |
| | <212> DNA | |
| 25 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador | |
| | <400> 47 | |
| | gcaggagatg ctgacgtaat aa | 22 |
| 30 | <210> 48 | |
| | <211> 24 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 35 | <223> Cebador | |
| | <400> 48 | |
| | ccaacctgct tttcaatag ctgc | 24 |
| | <210> 49 | |
| | <211> 21 | |
| 40 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador | |
| | <400> 49 | |
| 45 | cagagatggg gtcaaagaat g | 21 |
| | <210> 50 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 50 | <220> | |

| | | |
|----|---|----|
| | <223> Cebador | |
| | <400> 50 gtggttttat tccgagagcg | 20 |
| 5 | <210> 51 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Cebador | |
| 10 | <400> 51 ggtctatact tagaatctcc | 20 |
| | <210> 52 <211> 24 <212> DNA | |
| 15 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Cebador | |
| | <400> 52 cggaacagtt gaccttaata tggc | 24 |
| 20 | <210> 53 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Cebador | |
| 25 | <400> 53 gcctcatctg ggttggctct tg | 22 |
| | <210> 54 <211> 28 <212> DNA | |
| 30 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Cebador | |
| 35 | <400> 54 cgcttaggag aaaggactat aaaactgg | 28 |
| | <210> 55 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial | |
| 40 | <220> <223> Cebador | |
| | <400> 55 cagagttata ggtgtagag cc | 22 |
| 45 | <210> 56 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Cebador | |
| 50 | <400> 56 | |

| | | |
|----|-----------------------------|----|
| | ccatcccgcgt gttcctattc ttct | 24 |
| | <210> 57 | |
| | <211> 22 | |
| | <212> DNA | |
| 5 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador | |
| | <400> 57 | |
| | ccaatcctct ccacccatta cc | 22 |
| 10 | <210> 58 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> Cebador | |
| | <400> 58 | |
| | cgtccatcct taatcttccc | 20 |
| | <210> 59 | |
| | <211> 23 | |
| 20 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador | |
| | <400> 59 | |
| 25 | ccaactatgg aatccctaga tgc | 23 |
| | <210> 60 | |
| | <211> 22 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> | |
| | <223> Cebador | |
| | <400> 60 | |
| | gcatagtctg cgaagtaa gc | 22 |
| | <210> 61 | |
| 35 | <211> 24 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador | |
| 40 | <400> 61 | |
| | ggatctactg gtgaaggcat aacc | 24 |
| | <210> 62 | |
| | <211> 23 | |
| | <212> DNA | |
| 45 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador | |
| | <400> 62 | |
| | ggcatcatga gttctgtcat gac | 23 |
| 50 | <210> 63 | |

| | | | |
|----|-----------------------------|----|--|
| | <211> 25 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| | <220> | | |
| 5 | <223> Cebador | | |
| | <400> 63 | | |
| | gccttcaatg atactcttac cagcc | 25 | |
| | <210> 64 | | |
| | <211> 22 | | |
| 10 | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| | <220> | | |
| | <223> Cebador | | |
| | <400> 64 | | |
| 15 | gcattccag cagctatcat gc | 22 | |
| | <210> 65 | | |
| | <211> 22 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| 20 | <220> | | |
| | <223> Cebador | | |
| | <400> 65 | | |
| | ccttcccata tgtgtttctt cc | 22 | |
| | <210> 66 | | |
| | <211> 22 | | |
| 25 | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| | <220> | | |
| | <223> Cebador | | |
| | <400> 66 | | |
| 30 | gttgaagtag tactagctat ag | 22 | |
| | <210> 67 | | |
| | <211> 22 | | |
| | <212> DNA | | |
| 35 | <213> Secuencia artificial | | |
| | <220> | | |
| | <223> Cebador | | |
| | <400> 67 | | |
| | gacataaac acggcgtagg gc | 22 | |
| 40 | <210> 68 | | |
| | <211> 22 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| | <220> | | |
| 45 | <223> Cebador | | |
| | <400> 68 | | |
| | taagtgata ctccaattag tg | 22 | |
| | <210> 69 | | |
| | <211> 24 | | |
| 50 | <212> DNA | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |

| | | | |
|----|-------|---|----|
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 69 | |
| | | gccatctaac acaatatccc atgg | 24 |
| 5 | <210> | 70 | |
| | <211> | 24 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 10 | <223> | Cebador | |
| | <400> | 70 | |
| | | gcgatacatg ggacatggtt aaag | 24 |
| | <210> | 71 | |
| | <211> | 22 | |
| 15 | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 71 | |
| 20 | | tgcaactaac tcgtgtcca ta | 22 |
| | <210> | 72 | |
| | <211> | 21 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| 25 | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 72 | |
| | | gtagccggc aagtacacat c | 21 |
| | <210> | 73 | |
| 30 | <211> | 21 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| 35 | <400> | 73 | |
| | | actttcttc gcctgttca c | 21 |
| | <210> | 74 | |
| | <211> | 47 | |
| | <212> | DNA | |
| 40 | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador | |
| | <400> | 74 | |
| | | catgaagctt ggcgcgccgg gacgcgtttt tgaaaataat gaaaact | 47 |
| 45 | <210> | 75 | |
| | <211> | 79 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 50 | <223> | Cebador | |

<400> 75

catgaagctt gtttaaactc ggtgaccttg aaaataatga aaacttatat tgttttgaaa 60
ataatgaaaa ctttatattg 79

<210> 76

<211> 1197

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen CAC0462 optimizado en cuanto a codones de Clostridium acetobutylicum,

<400> 76

atgattgtga aagcaaaatt cgtgaaagga ttcattcgcg atgtgcaccc ttatgggtgc 60
cgccgtgaag ttctgaatca gatcgactac tgcaaaaaag ccattggctt tcgcggccca 120
aagaaagtgc tgatcggttg tgcttcctct ggcttcggtc tggtacccg cttttccgtg 180
gcgttcggtg gcccagaagc ccacactatc ggcgtcagct atgaaaccgg tgcgaccgat 240
cgccgtattg gcacagcagg gtggtataac aatattttct ttaaagaatt tgccaaaaag 300
aaaggcctgg tggcaaaaaa ctttatcgaa gacgccttct cgaacgaaac caaggacaaa 360
gtcatcaaat atattaaaga cgaatttggc aaaatcgatc tgttcgttta ctgctggca 420
gcaccgcgtc gtaaggatta taagactggg aacgtttata cctcacgtat taaaacgatc 480
ctgggtgatt ttgaagggcc gactatcgat gtggaacgtg atgaaattac actgaaaaag 540
gtctcatctg cgtcaatcga agagattgaa gaaaccgta aggtgatggg cggcgaagat 600
tggcaagagt ggtgtgaaga actgctgtac gaagattggt tcagtataa agccaccacc 660
atgccttatt cctatatcgg ttctcctcgc acctacaaa tctaccgca aggcactatc 720
ggcattgcga aaaaggatct ggaagataag gcaaaactga tcaacgagaa gctgaatcgc 780
gtcattggcg ggcgcgcatt cgtagcgtg aataaagccc tggttactaa ggcgagcgca 840
tatattccga ctttcctct gtacgccgca attctgtata aagttatgaa agaaaagaat 900
attcacgaaa actgcattat gcaaattgaa cgcatgtttt ccgagaaaat ttattcaaat 960
gaaaagattc aatttgatga taaaggctgt ctgctatgg atgacctgga gctgcgtaag 1020
gatgttcagg atgaagtaga ccgtatttgg agcaatatta caccggagaa ttttaaggaa 1080
ctgagcgact ataaaggcta caaaaaagaa tttatgaacc tgaatggatt tgatctggac 1140
ggcgtggatt attcaaagga tctggacatt gaactgctgc gcaaaactgga accataa 1197

<210> 77

<211> 1224

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> EgTER optimizado en cuanto a codones

<400> 77

```

atggcgatgt ttacgaccac cgcaaaagtt attcagccga aaattcgtgg ttttatttgc      60
accaccaccc acccgattgg ttgcgaaaaa cgtgttcagg aagaaatcgc atacgcacgc      120
gcgacccgcg cgaccagccc ggggtccgaaa cgtgtgctgg ttattggctg cagtacgggc      180
tatggcctga gcacccgtat caccgcggcc tttggttatc aggccgcaac cctgggcgtg      240
tttctggcag gcccgccgac caaaggccgt ccggccgagg cgggttggtg taatacggtt      300
gcgttcgaaa aagccgccct ggaagcaggc ctgtatgcac gttctctgaa tggatgatgc      360
ttcgattcta ccacgaaagc ccgcaccgtg gaagcaatta aacgtgatct gggatccgtt      420
gatctgggtg tgtatagcat tgcagcgccg aaacgtaccg atccggccac cggcgtgctg      480
cataaagcgt gcctgaaacc gattggtgca acctacacca atcgtacggg gaacaccgat      540
aaagcagaag ttaccgatgt gagtattgaa ccggccagtc cggaagaaat cgcagatacc      600
gtgaaagtta tgggtggcga agattgggaa ctgtggattc aggcactgag cgaagccggc      660
gtgctggccg aaggcgcaaa aaccgttgcg tattcttata ttggcccgga aatgacgtgg      720
ccggtgtatt ggagtggcac cattggcgaa gccaaaaaag atgttgaaaa agcggcgaaa      780
cgcatcaccg agcagtacgg ctgtccggcg tatccggttg ttgccaagc gctggtgacc      840
caggccagta gcgccattcc ggtggtgccc ctgtatatc gcctgctgta tcgtgttatg      900
aaagaaaaag gcacccatga aggctgcatt gaacagatgg tgcgtctgct gacgacgaaa      960
ctgtatccgg aaaatggtgc gccgatcgtg gatgaagcgg gccgtgtgcg tgttgatgat     1020
tgggaaatgg cagaagatgt tcagcaggca gttaaagatc tgtggagcca ggtgagtacg     1080
gccaatctga aagatattag cgattttgca ggttatcaga ccgaatttct gcgtctgttt     1140
ggcttttggt ttgatgggtg ggattacgat cagccgggtg atgttgaagc ggatctgccg     1200
agcgccgccc agcagtaagt cgac                                     1224

```

<210> 78

<211> 1498

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen *ald* optimizado en cuanto a codones

<400> 78

cgggtacctcg cgaatgcatc tagatccaat catgcccggg ggtcaccaaa ggaggaatag 60
 ttcataaata aagatacgtt gattccgacc acgaaagatc tgaaagtga aaccaacggt 120
 gaaaatatca acctgaaaaa ttataaagat aatagcagct gcttcggcgt gtttgaaaaat 180
 gttgaaaacg ccattttctt tgccgttcac gcacagaaaa tctgtgtctt gcactatacc 240
 aaagaacagc gcgaaaaaat cattaccgaa attcgcaaag cggccctgca gaataaagaa 300
 gttctggcga ccatgatcct ggaagaaacc catatgggtc gttacgaaga taaaatcctg 360
 aaacatgaac tgggtggcga atacacgccg ggtacggaag atctgaccac gaccgcatgg 420
 agcgggtgata acggtctgac cgtggtggaa atgtctccgt atggcggtat tggcgcaatt 480
 acgccgagca cgaatccgac cgaaacggtt atttgtaaca gtattggcat gattgcagcc 540
 ggtaatgcag tggttttcaa tgggtcatccg tgcgccaaaa aatgtgtggc gtttgccggt 600
 gaaatgatta acaaagcgat tattagctgc ggtggcccgg aaaatctggt gacgacgatt 660
 aaaaacccga ccatggaaag tctggatgag attattaaac atccgtctat taaactgctg 720
 tgtggtaccg gcggtccggg tatggtgaaa accctgtga attctggcaa aaaagcaatt 780
 ggcgcgggtg cgggtaatcc gccggttatc gttgatgata ccgcggatat tgaaaaagca 840
 ggccgcagta ttattgaagg ttgtagcttt gataataacc tgccgtgcat tgccgaaaaa 900
 gaagtgtttg ttttcgaaaa tgtggcggat gatctgatca gcaacatgct gaaaaataac 960
 gccgtgatta ttaacgaaga tcaggtgtct aaactgattg atctggttct gcagaaaaac 1020
 aacgaaacgc aggaatattt cattaataaa aatggggtt gtaaagatgc gaaactgttc 1080
 ctggatgaaa tcgatgtgga aagtcagagc aacgtgaaat gtatcatctg cgaagtgaat 1140
 gcccaaccatc cgtttgttat gacggaactg atgatgccga ttctgccgat tgttcgtgtt 1200
 aaagatattg atgaagccat caaatatgag aaaattgcgg aacagaaccg caaacacagc 1260
 gcatatattt acagtaaaaa catcgataac ctgaaccgtt tcgaacgtga aattgatacc 1320
 accatctttg tgaaaaatgc caaaagtatt gcgggtgttg gctatgaagc cgaaggcttt 1380
 accacgttca ccattgcagg ttctaccggc gaaggattta ccagcgcgcg taattttacc 1440
 cgccagcgcc gctgtgtgct ggcggttaaa gttaacccaa tatcggtacc cgggcccg 1498

<210> 79
 <211> 6509
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Plásmido pFP988

<400> 79

tcgaggcccc gcacatacga aaagactggc tgaaaacatt gagcctttga tgactgatga 60
 tttggctgaa gaagtggatc gattgtttga gaaaagaaga agaccataaa aataccttgt 120

| | |
|--|------|
| ctgtcatcag acaggggtatt ttttatgctg tccagactgt ccgctgtgta aaaaatagga | 180 |
| ataaaggggg gttgttatta ttttactgat atgtaaaata taatttgtat aaggaattgt | 240 |
| gagcggataa caattcctac gaaaaatgaga gggagaggaa acatgattca aaaacgaaag | 300 |
| cggacagttt cgttcagact tgtgcttatg tgcacgctgt tatttgtcag tttgccgatt | 360 |
| acaaaaacat cagccggatc ccaccatcac catcaccatt aagaattcct agaaactcca | 420 |
| agctatcttt aaaaaatcta gtaaatgcac gagcaacatc ttttgttgct cagtgcattt | 480 |
| tttattttgt acactagata tttcttctcc gcttaaatca tcaaagaaat ctttatcact | 540 |
| tgttaaccagt ccgtccacat gtcgaattgc atctgaccga attttacgtt tccctgaata | 600 |
| attctcatca atcgtttcat caattttatc tttatacttt atattttgtg cgtaatacaa | 660 |
| atcataattt ttatatgttt cctcatgatt tatgtcttta ttattatagt ttttattctc | 720 |
| tctttgatta tgtctttgta tcccgtttgt attacttgat cctttaactc tggcaaccct | 780 |
| caaaattgaa tgagacatgc tacacctccg gataataaat atatataaac gtatatagat | 840 |
| ttcataaagt ctaacacact agacttattt acttcgtaat taagtcgtta aaccgtgtgc | 900 |
| tctacgacca aaactataaa acctttaaga actttctttt tttacaagaa aaaagaaatt | 960 |
| agataaatct ctcatatctt ttattcaata atcgcacccg attgcagtat aaatttaacg | 1020 |
| atcactcatc atgttcatat ttatcagagc tcgtgctata attatactaa ttttataagg | 1080 |
| aggaaaaaat atgggcattt ttagtatttt tgtaatcagc acagttcatt atcaaccaa | 1140 |
| caaaaaataa gtgggtataa tgaatcgta ataagcaaaa ttcatataac caaattaaag | 1200 |
| aggggtataa tgaacgagaa aaatataaaa cacagtcaaa actttattac ttcaaacat | 1260 |
| aatatagata aaataatgac aaatataaga ttaaatgaac atgataatat ctttgaaatc | 1320 |
| ggctcaggaa aaggccattt tacccttgaa ttagtaaaga ggtgtaattt cgtaactgcc | 1380 |
| attgaaatag accataaatt atgcaaaact acagaaaata aacttgttga tcacgataat | 1440 |
| ttccaagttt taaacaagga tatattgcag tttaaatttc ctaaaaacca atcctataaa | 1500 |
| atatatggta atatacctta taacataagt acggatataa tacgcaaaat tgtttttgat | 1560 |
| agtatagcta atgagattta tttaatcgtg gaatacgggt ttgctaaaag attattaaat | 1620 |
| acaaaacgct cattggcatt acttttaatg gcagaagttg atatttctat attaagtatg | 1680 |
| gttccaagag aatattttca tcctaaacct aaagtgaata gctcacttat cagattaagt | 1740 |
| agaaaaaat caagaatatc acacaaagat aaacaaaagt ataattattt cgttatgaaa | 1800 |
| tgggttaaca aagaatacaa gaaaatattt acaaaaaatc aatttaacaa ttccttaaaa | 1860 |
| catgcaggaa ttgacgattt aaacaatatt agctttgaac aattcttatc tcttttcaat | 1920 |
| agctataaat tatttaataa gtaagttaag ggatgcagtt catcgatgaa ggcaactaca | 1980 |
| gctcaggcga caaccatacg ctgagagatc ctactacgt agaagataaa ggccacaaat | 2040 |
| acttagtatt tgaagcaaac actggaactg aagatggcta ccaaggcgaa gaatctttat | 2100 |

| | |
|--|------|
| ttaacaaagc atactatggc aaaagcacat cattcttccg tcaagaaagt caaaaacttc | 2160 |
| tgcaaagcga taaaaaacgc acggctgagt tagcaaacgg cgctctcggg atgattgagc | 2220 |
| taaacgatga ttacacactg aaaaaagtga tgaaacgcgt gattgcatct aacacagtaa | 2280 |
| cagatgaaat tgaacgcgcg aacgtcttta aaatgaacgg caaatggtac ctgttcaactg | 2340 |
| actcccgcgg atcaaaaatg acgattgacg gcattacgtc taacgatatt tacatgcttg | 2400 |
| gttatgtttc taattcttta actggcccat acaagccgct gaacaaaact ggccttgtgt | 2460 |
| taaaaatgga tcttgatcct aacgatgtaa cctttactta ctacacactc gctgtacctc | 2520 |
| aagcgaaagg aaacaatgtc gtgattacaa gctatatgac aaacagagga ttctacgcag | 2580 |
| acaaacaatc aacgtttgcg ccaagcttgc atgcgagagt aggggaactgc caggcatcaa | 2640 |
| ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcggt ttatctgttg ttgtcgggtg | 2700 |
| aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccg ggagcggatt tgaacgttgc gaagcaacgg | 2760 |
| cccggagggt ggcgggcagg acgcccacca taaactgccg ggcacaaat taagcagaag | 2820 |
| gccatcctga cggatggcct ttttgcggtt ctacaaactc tttttgttta tttttctaaa | 2880 |
| tacattcaaa tatgtatccg ctcatgctcc ggatctgcat cgcaggatgc tgctggctac | 2940 |
| cctgtggaac acctacatct gtattaacga agcgttgga ttgacctga gtgatttttc | 3000 |
| tctggctccg ccgcatccat accgccagtt gtttaccctc acaacgttcc agtaaccggg | 3060 |
| catgttcac atcagtaacc cgtatcgtga gcatcctctc tcgtttcatc ggtatcatta | 3120 |
| cccccatgaa cagaaattcc cccttacacg gaggcatcaa gtgaccaaac aggaaaaaac | 3180 |
| cgcccttaac atggcccgtt ttatcagaag ccagacatta acgcttctgg agaaactcaa | 3240 |
| cgagctggac gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg cttcacgacc acgctgatga | 3300 |
| gctttaccgc agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggg gaaaacctct gacacatgca | 3360 |
| gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgta | 3420 |
| gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggcgcagcc atgaccaggt cacgtagcga | 3480 |
| tagcggagtg tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac | 3540 |
| catatgcggg gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct | 3600 |
| tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcggtc ggctgcggcg agcggtatca | 3660 |
| gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac | 3720 |
| atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcggtt | 3780 |
| ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg | 3840 |
| cgaaccgga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc | 3900 |
| tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc | 3960 |
| gtggcgcttt ctcaatgtc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgtcc | 4020 |
| aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagcc gctgcgcctt atccggtaac | 4080 |
| tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt | 4140 |

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| aacaggatta | gcagagcgag | gtatgtaggc | ggtgctacag | agttcttgaa | gtggtggcct | 4200 |
| aactacggct | acactagaag | gacagtat | ggtatctgcg | ctctgctgaa | gccagttacc | 4260 |
| ttcggaaaaa | gagttggtag | ctcttgatcc | ggcaaacaaa | ccaccgctgg | tagcgggtgt | 4320 |
| ttttttgttt | gcaagcagca | gattacgcgc | agaaaaaaag | gatctcaaga | agatcctttg | 4380 |
| atcttttcta | cggggtctga | cgctcagtgg | aacgaaaact | cacgttaagg | gattttggtc | 4440 |
| atgagattat | caaaaaggat | cttcacctag | atccttttaa | attaaaaatg | aagttttaaa | 4500 |
| tcaatctaaa | gtatatatga | gtaaacttgg | tctgacagtt | accaatgctt | aatcagtga | 4560 |
| gcacctatct | cagcgatctg | tctatttcgt | tcatccatag | ttgcctgact | ccccgtcgtg | 4620 |
| tagataacta | cgatacggga | gggcttacca | tctggcccca | gtgctgcaat | gataccgcga | 4680 |
| gaccacgct | caccggctcc | agatttatca | gcaataaacc | agccagccgg | aagggccgag | 4740 |
| cgcagaagtg | gtcctgcaac | tttatccgcc | tccatccagt | ctattaattg | ttgccgggaa | 4800 |
| gctagagtaa | gtagttcgcc | agttaatagt | ttgcgcaacg | ttgttgccat | tgctgcaggc | 4860 |
| atcgtgggtg | cacgctcgtc | gtttggtag | gcttcattca | gctccggttc | ccaacgatca | 4920 |
| aggcgagtta | catgatcccc | catgttggtc | aaaaaagcgg | ttagctcctt | cggctcctccg | 4980 |
| atcgttgcta | gaagtaagtt | ggccgcagtg | ttatcactca | tggttatggc | agcactgcat | 5040 |
| aattctctta | ctgtcatgcc | atccgtaaga | tgcttttctg | tgactggtag | gtactcaacc | 5100 |
| aagtcatctt | gagaatagtg | tatgcggcga | ccgagttgct | cttgcccggc | gtcaatacgg | 5160 |
| gataataacc | cgccacatag | cagaacttta | aaagtgtctc | tcattggaaa | acgttcttcg | 5220 |
| gggcgaaaac | tctcaaggat | cttaccgctg | ttgagatcca | gttcgatgta | accactcgt | 5280 |
| gcaccaact | gatcttcagc | atcttttact | ttcaccagcg | tttctgggtg | agcaaaaaca | 5340 |
| ggaaggcaaa | atgccgcaaa | aaaggggaata | agggcgacac | ggaaatgttg | aatactcata | 5400 |
| ctcttccttt | ttcaatatta | ttgaagcatt | tatcaggggt | attgtctcat | gagcggatac | 5460 |
| atatttgaat | gtatttagaa | aaataaacia | ataggggttc | cgcgacatt | tccccgaaaa | 5520 |
| gtgccacctg | acgtctaaga | aaccattatt | atcatgacat | taacctataa | aaataggcgt | 5580 |
| atcacgaggc | cctttcgtct | cgcgctttc | ggtgatgacg | gtgaaaacct | ctgacacatg | 5640 |
| cagctcccgg | agacggtcac | agcttgctg | taagcggatg | ccgggagcag | acaagcccgt | 5700 |
| cagggcgctg | cagcgggtgt | tcatgtgcgt | aactaacttg | ccatcttcaa | acaggagggc | 5760 |
| tggaagaagc | agaccgctaa | cacagtacat | aaaaaaggag | acatgaacga | tgaacatcaa | 5820 |
| aaagtttgca | aaacaagcaa | cagtattaac | ctttactacc | gcactgctgg | caggaggcgc | 5880 |
| aactcaagcg | tttgcgaaag | aaacgaacca | aaagccatat | aaggaaacat | acggcatttc | 5940 |
| ccatattaca | cgccatgata | tgctgcaa | ccctgaacag | caaaaaaatg | aaaaatatca | 6000 |
| agttcttgaa | ttcgattcgt | ccacaattaa | aaatatctct | tctgcaaaag | gcctggacgt | 6060 |
| ttgggacagc | tgccattac | aaaacgctga | cggcactgtc | gcaaaactatc | acggctacca | 6120 |

ES 2 446 520 T3

| | | |
|----|---|------|
| | catcgtcttt gcattagccg gagatcctaa aaatgcggat gacaatcga ttacatggt | 6180 |
| | ctatcaaaaa gtcggcgaaa cttctattga cagctggaaa aacgctggcc gcgtctttaa | 6240 |
| | agacagcgac aaattcgatg caaatgattc tatcctaaaa gaccaaacac aagaatggtc | 6300 |
| | aggttcagcc acatttacat ctgacggaaa aatccgttta ttctacactg atttctccgg | 6360 |
| | taaacattac ggcaaacaaa cactgacaac tgcacaagtt aacgtatcag catcagacag | 6420 |
| | ctctttgaac atcaacggtg tagaggatta taaatcaatc ttgacggtg acggaaaaac | 6480 |
| | gtatcaaaat gtacagcatg ccacgcgtc | 6509 |
| | <210> 80 | |
| | <211> 46 | |
| | <212> DNA | |
| 5 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador N85 | |
| | <400> 80 | |
| | catagatctg gatccaaagg agggtagga aatggcgatg ttacg | 46 |
| 10 | <210> 81 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> Cebador N86 | |
| | <400> 81 | |
| | gtcgacttac tgctggcg | 20 |
| | <210> 82 | |
| | <211> 20 | |
| 20 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador T7Primer | |
| | <400> 82 | |
| 25 | taatacgact cactatagg | 20 |
| | <210> 83 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> | |
| | <223> Cebador Trc99af | |
| | <400> 83 | |
| | ttgacaatta atcatccggc | 20 |
| | <210> 84 | |
| 35 | <211> 21 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador N5SeqF4 | |
| 40 | <400> 84 | |
| | ggtcaactgt tccggaaatt c | 21 |
| | <210> 85 | |

| | | | |
|----|-------|--|----|
| | <211> | 46 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 5 | <223> | Cebador T-ald(BamHI) | |
| | <400> | 85 | |
| | | tgatctggat ccaagaagga gcccttcacc atgaataaag acacac | 46 |
| | <210> | 86 | |
| | <211> | 54 | |
| 10 | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador B-ald(ETGER) | |
| | <400> | 86 | |
| 15 | | catcgccatt tcctcacct ccttttagc cggaagtac acatcttctt tgtc | 54 |
| | <210> | 87 | |
| | <211> | 42 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| 20 | <220> | | |
| | <223> | Cebador T-Ptrc(BspEI) | |
| | <400> | 87 | |
| | | ttcgtactt ccggacgact gcacggtgca ccaatgcttc tg | 42 |
| | <210> | 88 | |
| 25 | <211> | 43 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador B-aldopt(BspEI) | |
| | <400> | 88 | |
| 30 | | ccgatcttaa gtactttaac ccgccagcac acagcggcgc tgg | 43 |
| | <210> | 89 | |
| | <211> | 32 | |
| | <212> | DNA | |
| 35 | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador T-BspEIAatII | |
| | <400> | 89 | |
| | | ccggatcatg ataataatgg ttcttagac gt | 32 |
| 40 | <210> | 90 | |
| | <211> | 24 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 45 | <223> | Cebador B-BspEIAatII | |
| | <400> | 90 | |
| | | ctaagaaacc attattatca tgat | 24 |
| | <210> | 91 | |
| | <211> | 42 | |
| 50 | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |

| | | | |
|----|-------|--|----|
| | <220> | | |
| | <223> | Promotor 1.6Gl | |
| | <400> | 91 | |
| | | gcccttgaca atgccacatc ctgagcaa attaacca ct | 42 |
| 5 | <210> | 92 | |
| | <211> | 42 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 10 | <223> | Promotor 1.5Gl | |
| | <400> | 92 | |
| | | gcccttgact atgccacatc ctgagcaa attaacca ct | 42 |
| | <210> | 93 | |
| | <211> | 39 | |
| 15 | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador AFBamHI | |
| | <400> | 93 | |
| 20 | | cattggatcc atgaataa ag acacactaat acctacaac | 39 |
| | <210> | 94 | |
| | <211> | 39 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| 25 | <220> | | |
| | <223> | Cebador ARAat2 | |
| | <400> | 94 | |
| | | catgacgtca ctagtgttaa caagaagta gccggaag | 39 |
| | <210> | 95 | |
| 30 | <211> | 50 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador Directo 1(E) | |
| 35 | <400> | 95 | |
| | | catgttaaca aaggaggaaa gatctatggc gatgtttacg accaccgcaa | 50 |
| | <210> | 96 | |
| | <211> | 43 | |
| | <212> | DNA | |
| 40 | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador inferior inverso 1(E) | |
| | <400> | 96 | |
| | | cccctcctt gccgcgcctt actgctggc gccgctcggc aga | 43 |
| 45 | <210> | 97 | |
| | <211> | 51 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 50 | <223> | Cebador superior directo 2(B) | |

| | | |
|----|--|----|
| | <400> 97 gcccgagcagt aaggcgcgcc aaaggagggg ttaaatggt tgatttcgaa t | 51 |
| 5 | <210> 98 <211> 42 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador inverso 2(B) | |
| 10 | <400> 98 gtcgacgtca tactagtta cacagatttt ttgaatattt gt | 42 |
| | <210> 99 <211> 47 <212> DNA <213> Secuencia artificial | |
| 15 | <220> <223> Cebador Pamy/lacOF | |
| | <400> 99 cattgtacag aattcgagct ctgaggccc cgcacatacg aaaagac | 47 |
| 20 | <210> 100 <211> 52 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador Pam/la cOR | |
| 25 | <400> 100 cattgtacag tttaaacata ggtcacccctc atttcgtag gaattgttat cc | 52 |
| 30 | <210> 101 <211> 52 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador Spac F | |
| | <400> 101 cattgtacag tttaaacata ggtcacccctc atttcgtag gaattgttat cc | 52 |
| 35 | <210> 102 <211> 36 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador Spac R | |
| 40 | <400> 102 catgtttaa cggtgaccga agctggggat ccgcgg | 36 |
| 45 | <210> 103 <211> 44 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador Top TF | |
| 50 | <400> 103 cattggtcac cattccggg catgcaaagg aggttagtag aatg | 44 |

| | | | |
|----|-------|--|----|
| | <210> | 104 | |
| | <211> | 51 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| 5 | <220> | | |
| | <223> | Cebador Bot TR | |
| | <400> | 104 | |
| | | cctttacgcg accggtacta gtcaagtcga cagggcgcg ccaatacttt c | 51 |
| 10 | <210> | 105 | |
| | <211> | 57 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador Top CF | |
| 15 | <400> | 105 | |
| | | cgcgccctgt cgacttgact agtaccggtc gcgtaaagga ggtattagtc atggaac | 57 |
| | <210> | 106 | |
| | <211> | 38 | |
| | <212> | DNA | |
| 20 | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador Bot CR | |
| | <400> | 106 | |
| | | catcgtttaa acttgatcc agatccctta cctctat | 38 |
| 25 | <210> | 107 | |
| | <211> | 20 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 30 | <223> | Cebador N3SeqF1 | |
| | <400> | 107 | |
| | | ccatcatacc atactgaccc | 20 |
| | <210> | 108 | |
| | <211> | 20 | |
| 35 | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Cebador N3SeqF2 | |
| | <400> | 108 | |
| 40 | | gctactggag cattgtcac | 20 |
| | <210> | 109 | |
| | <211> | 24 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | | |
| | <223> | Cebador N3SeqF3 | |
| | <400> | 109 | |
| | | ccattaacag ctgctattac aggc | 24 |
| | <210> | 110 | |
| 50 | <211> | 20 | |
| | <212> | DNA | |

| | | |
|----|----------------------------|----|
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador N4SeqR3 | |
| | <400> 110 | |
| 5 | ggtctcggaa taacacctgg | 20 |
| | <210> 111 | |
| | <211> 22 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> | |
| | <223> Cebador N5SeqF3 | |
| | <400> 111 | |
| | caagcttcac aacaggagct gg | 22 |
| | <210> 112 | |
| 15 | <211> 22 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador N7SeqR2 , | |
| 20 | <400> 112 | |
| | atcccacaat ccgtcagtgga tc | 22 |
| | <210> 113 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| 25 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador N31SeqF1 | |
| | <400> 113 | |
| | ctgagataag aaaggccgca | 20 |
| 30 | <210> 114 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 35 | <223> Cebador N62SeqF2 | |
| | <400> 114 | |
| | caaccctggg cgtgtttctg | 20 |
| | <210> 115 | |
| | <211> 20 | |
| 40 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador N625SeqF3 | |
| | <400> 115 | |
| 45 | gtggcgaaga ttgggaactg | 20 |
| | <210> 116 | |
| | <211> 24 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 50 | <220> | |

| | | |
|----|--|----|
| | <223> Cebador N62SeqF4 | |
| | <400> 116 gggaaatggc agaagatgtt cagc | 24 |
| 5 | <210> 117 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Cebador N63SeqR1 | |
| 10 | <400> 117 cggctctgata acctgcaaaa tcgc | 24 |
| | <210> 118 <211> 21 <212> DNA | |
| 15 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Cebador N63SeqR2 | |
| | <400> 118 caccagcgcgt ttggcaacaa c | 21 |
| 20 | <210> 119 <211> 23 <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Cebador N63SeqR3 | |
| | <400> 119 gaacgtgcat acagacctgc ttc | 23 |
| | <210> 120 <211> 20 <212> DNA | |
| 30 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Cebador N63SeqR4 | |
| | <400> 120 cggctgaata actttgctgg | 20 |
| | <210> 121 <211> 24 <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 40 | <220> <223> Cebador Pamy SeqF2 | |
| | <400> 121 gcctttgatg actgatgatt tggc | 24 |
| | <210> 122 <211> 24 <212> DNA | |
| 45 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Cebador Pamy SeqF | |
| 50 | <400> 122 | |

| | | |
|----|--|-----|
| | tctccggtaa acattacggc aaac | 24 |
| | <210> 123 | |
| | <211> 24 | |
| | <212> DNA | |
| 5 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador Pamy seqR | |
| | <400> 123 | |
| | cggtcagatg caattcgaca tgtg | 24 |
| 10 | <210> 124 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> Cebador SpacF Seq | |
| | <400> 124 | |
| | gaagtgggtca agacctcact | 20 |
| | <210> 125 | |
| | <211> 24 | |
| 20 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador sacB Up | |
| | <400> 125 | |
| 25 | cggtttgtt actgataaag cagg | 24 |
| | <210> 126 | |
| | <211> 24 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> | |
| | <223> Cebador sacB Dn | |
| | <400> 126 | |
| | cggttagcca ttgcctgct tttta | 24 |
| | <210> 127 | |
| 35 | <211> 22 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador HT R | |
| 40 | <400> 127 | |
| | acaaagatct ccatggacgc gt | 22 |
| | <210> 128 | |
| | <211> 1185 | |
| | <212> DNA | |
| 45 | <213> Escherichia coli | |
| | <400> 128 | |
| | atgaaaaatt gtgtcatcgt cagtgcggta cgtactgcta tcggtagttt taacggttca | 60 |
| | ctcgcttcca ccagcgccat cgacctgggg gcgacagtaa tttaaagccgc cattgaacgt | 120 |
| | gcaaaaaatcg attcacaaca cgttgatgaa gtgattatgg gtaacgtgtt acaagccggg | 180 |

ctggggcaaa atccggcgcg tcaggcactg ttaaaaagcg ggctggcaga aacgggtgtgc 240
 ggattcacgg tcaataaagt atgtggttcg ggtcttaaaa gtgtggcgct tgccgcccag 300
 gccattcagg caggtcaggc gcagagcatt gtggcggggg gtatggaaaa tatgagttta 360
 gccccctact tactcgatgc aaaagcacgc tctggttata gtcttggaaga cggacaggtt 420
 tatgacgtaa tcctgcgcga tggcctgatg tgcgccaccc atggttatca tatggggatt 480
 accgccgaaa acgtggctaa agagtacgga attaccctgt aaatgcagga tgaactggcg 540
 ctacattcac agcgtaaagc ggcagccgca attgagtcgg gtgcttttac agccgaaatc 600
 gtcccggtaa atgttgtcac tcgaaagaaa accttcgtct tcagtcaaga cgaattcccg 660
 aaagcgaatt caacggctga agcgttaggt gcattgcgcc cggccttcga taaagcagga 720
 acagtcaccg ctgggaacgc gtctggtatt aacgacgggt ctgccgctct ggtgattatg 780
 gaagaatctg cggcgctggc agcaggcctt acccccctgg ctgcgattaa aagttatgcc 840
 agcgggtggcg tgccccccgc attgatgggt atggggccag tacctgccac gcaaaaagcg 900
 ttacaactgg cggggctgca actggcggat attgatctca ttgaggctaa tgaagcattt 960
 gctgcacagt tccttgccgt tgggaaaaac ctgggctttg attctgagaa agtgaatgtc 1020
 aacggcgggg ccatacgctc cgggcatact atcggtgcca gtggtgctcg tattctggtc 1080
 acactattac atgccatgca ggcacgcgat aaaacgctgg ggctggcaac actgtgcatt 1140
 ggcggcgggtc aggaattgc gatggtgatt gaacggttga attaa 1185

<210> 129

<211> 394

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 129

Met Lys Asn Cys Val Ile Val Ser Ala Val Arg Thr Ala Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Phe Asn Gly Ser Leu Ala Ser Thr Ser Ala Ile Asp Leu Gly Ala Thr
 20 25 30
 Val Ile Lys Ala Ala Ile Glu Arg Ala Lys Ile Asp Ser Gln His Val
 35 40 45
 Asp Glu Val Ile Met Gly Asn Val Leu Gln Ala Gly Leu Gly Gln Asn
 50 55 60
 Pro Ala Arg Gln Ala Leu Leu Lys Ser Gly Leu Ala Glu Thr Val Cys
 65 70 75 80
 Gly Phe Thr Val Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Lys Ser Val Ala
 85 90 95
 Leu Ala Ala Gln Ala Ile Gln Ala Gly Gln Ala Gln Ser Ile Val Ala

ES 2 446 520 T3

| 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Met | Glu | Asn | Met | Ser | Leu | Ala | Pro | Tyr | Leu | Leu | Asp | Ala | Lys |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Ala | Arg | Ser | Gly | Tyr | Arg | Leu | Gly | Asp | Gly | Gln | Val | Tyr | Asp | Val | Ile |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Leu | Arg | Asp | Gly | Leu | Met | Cys | Ala | Thr | His | Gly | Tyr | His | Met | Gly | Ile |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Thr | Ala | Glu | Asn | Val | Ala | Lys | Glu | Tyr | Gly | Ile | Thr | Arg | Glu | Met | Gln |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Asp | Glu | Leu | Ala | Leu | His | Ser | Gln | Arg | Lys | Ala | Ala | Ala | Ala | Ile | Glu |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | | 190 | |
| Ser | Gly | Ala | Phe | Thr | Ala | Glu | Ile | Val | Pro | Val | Asn | Val | Val | Thr | Arg |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Lys | Lys | Thr | Phe | Val | Phe | Ser | Gln | Asp | Glu | Phe | Pro | Lys | Ala | Asn | Ser |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Thr | Ala | Glu | Ala | Leu | Gly | Ala | Leu | Arg | Pro | Ala | Phe | Asp | Lys | Ala | Gly |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Thr | Val | Thr | Ala | Gly | Asn | Ala | Ser | Gly | Ile | Asn | Asp | Gly | Ala | Ala | Ala |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Leu | Val | Ile | Met | Glu | Glu | Ser | Ala | Ala | Leu | Ala | Ala | Gly | Leu | Thr | Pro |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| Leu | Ala | Arg | Ile | Lys | Ser | Tyr | Ala | Ser | Gly | Gly | Val | Pro | Pro | Ala | Leu |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Met | Gly | Met | Gly | Pro | Val | Pro | Ala | Thr | Gln | Lys | Ala | Leu | Gln | Leu | Ala |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Gly | Leu | Gln | Leu | Ala | Asp | Ile | Asp | Leu | Ile | Glu | Ala | Asn | Glu | Ala | Phe |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| Ala | Ala | Gln | Phe | Leu | Ala | Val | Gly | Lys | Asn | Leu | Gly | Phe | Asp | Ser | Glu |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Lys | Val | Asn | Val | Asn | Gly | Gly | Ala | Ile | Ala | Leu | Gly | His | Pro | Ile | Gly |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| Ala | Ser | Gly | Ala | Arg | Ile | Leu | Val | Thr | Leu | Leu | His | Ala | Met | Gln | Ala |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Arg | Asp | Lys | Thr | Leu | Gly | Leu | Ala | Thr | Leu | Cys | Ile | Gly | Gly | Gly | Gln |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Gly | Ile | Ala | Met | Val | Ile | Glu | Arg | Leu | Asn | | | | | | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | | | | | | |

<210> 130
<211> 1182

<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 130

```

ttaatgaacc tgcactaaga cggcgtctcc ctgtgctgcc ccgctgcaaa tagcggcaac      60
gcccagaccc cctccccgtc gctttaattc ataaacaagc gtcattgagaa ttctcgacc      120
gctcgcgccg atcgggtggc cgagcgcgat cgcaccgcca ttcacattta ctttttcaag      180
atcgaaacct acgatttttt cacatgtcaa aacaactgaa gcaaaagctt catttacttc      240
aaacaagtca atatcttgga cagttaaacc attctttttc aggagcttgt taatagcaaa      300
ccctggcgct gccgccagct cgtgcgctgg cattcccgtg gttgaaaaac caagaattgt      360
agccagaggc cgtttgcca gctcagcagc tttttcctca gacatcagca cgaacgcgcc      420
ggctccgtca ttgactccag gagcattgcc ggctgtgata gaaccgtcac ttgcataaat      480
cggagcaagt tttgcgagct gatccagact tgtgtcacgg cgaatcgctt catctttatc      540
aacaacgttt ggttttcctt ttcgaccgat ccagttgacg ggaacaattt catcctgaaa      600
cttcccttca tcggcggcct tagctgccct tgcattgactt ctcaacgccc attcgtcctg      660
ctctcttcgt gagattgcat attccttggc agctgtattt ccgtgaacag ccatgtgcac      720
ctcgtcaaat gcgcacgtta atccgtcata caccattaag tccctaagct cgcctgcccc      780
catccgtgct cccagcgcc cggcggaac ggcatacggg atattgctca tgctttccat      840
ccccccgca acaagtatgt ccgcatcctg cggccgaatc atttgatcac ataaagtgac      900
agcgcgaagg ccggaagcac agactttatt cagtgtttct gacggcacac tccaaggcat      960
tcccgccaga cgggcagctt gacgggaagg tatctgccct gagccggcct ggacaaccat     1020
gcccattgacg tttccttcta catcatctcc agagactcca gcctgttgca gcgcttcctt     1080
catcacaatg cccccaagct cagcagcttt cacctctttc aaaactccgc cgaatttgcc     1140
aatggagtt cttgcagcac ttacaatgac tgttttcctc at                               1182

```

5 <210> 131
<211> 393
<212> PRT
<213> Bacillus subtilis

<400> 131

Met Arg Lys Thr Val Ile Val Ser Ala Ala Arg Thr Pro Phe Gly Lys
1 5 10 15

10 Phe Gly Gly Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Glu Leu Gly Gly Ile

20 25 30
 Val Met Lys Glu Ala Leu Gln Gln Ala Gly Val Ser Gly Asp Asp Val
 35 40 45
 Glu Gly Asn Val Met Gly Met Val Val Gln Ala Gly Ser Gly Gln Ile
 50 55 60
 Pro Ser Arg Gln Ala Ala Arg Leu Ala Gly Met Pro Trp Ser Val Pro
 65 70 75 80
 Ser Glu Thr Leu Asn Lys Val Cys Ala Ser Gly Leu Arg Ala Val Thr
 85 90 95
 Leu Cys Asp Gln Met Ile Arg Ala Gln Asp Ala Asp Ile Leu Val Ala
 100 105
 Gly Gly Met Glu Ser Met Ser Asn Ile Pro Tyr Ala Val Pro Ala Gly
 115 120 125
 Arg Trp Gly Ala Arg Met Gly Asp Gly Glu Leu Arg Asp Leu Met Val
 130 135 140
 Tyr Asp Gly Leu Thr Cys Ala Phe Asp Glu Val His Met Ala Val His
 145 150 155 160
 Gly Asn Thr Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Ile Ser Arg Arg Glu Gln Asp
 165 170 175
 Glu Trp Ala Leu Arg Ser His Ala Arg Ala Ala Lys Ala Ala Asp Glu
 180 185 190
 Gly Lys Phe Gln Asp Glu Ile Val Pro Val Asn Trp Ile Gly Arg Lys
 195 200 205
 Gly Lys Pro Asn Val Val Asp Lys Asp Glu Ala Ile Arg Arg Asp Thr
 210 215 220
 Ser Leu Asp Gln Leu Ala Lys Leu Ala Pro Ile Tyr Ala Ser Asp Gly
 225 230 235 240
 Ser Ile Thr Ala Gly Asn Ala Pro Gly Val Asn Asp Gly Ala Gly Ala
 245 250 255
 Phe Val Leu Met Ser Glu Glu Lys Ala Ala Glu Leu Gly Lys Arg Pro
 260 265 270
 Leu Ala Thr Ile Leu Gly Phe Ser Thr Thr Gly Met Pro Ala His Glu
 275 280 285

Leu Ala Ala Ala Pro Gly Phe Ala Ile Asn Lys Leu Leu Lys Lys Asn
290 295 300

Gly Leu Thr Val Gln Asp Ile Asp Leu Phe Glu Val Asn Glu Ala Phe
305 310 315 320

Ala Ser Val Val Leu Thr Cys Glu Lys Ile Val Gly Phe Asp Leu Glu
325 330 335

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

Ala Ser Gly Ala Arg Ile Leu Met Thr Leu Val Tyr Glu Leu Lys Arg
355 360 365

Arg Gly Gly Gly Leu Gly Val Ala Ala Ile Cys Ser Gly Ala Ala Gln
370 375 380

Gly Asp Ala Val Leu Val Gln Val His
385 390

<210> 132

<211> 1197

<212> DNA

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 132

atgtctcaga acgtttacat tgtatcgact gccagaaccc caattgggtc attccagggc 60
tctctatcct ccaagacagc agtgggaattg ggtgctgttg ctttaaaagg cgccttggtc 120
aaggttccag aattggatgc atccaaggat tttagcagaa ttatttttgg taacgttctt 180
tctgccaatt tgggccaagc tccggccaga caagtgtctt tggctgccgg tttagtaat 240
catatcgttg caagcacagt taacaaggtc tgtgcatccg ctatgaaggc aatcattttg 300
ggtgctcaat ccatcaaagtg tggtaatgct gatgttgtcg tagctgggtg ttgtgaatct 360
atgactaacg caccatacta catgccagca gccctgtcgg gtgccaaatt tggccaaact 420
gttcttgttg atggtgtcga aagagatggg ttgaacgatg cgtacgatgg tctagccatg 480
ggtgtacacg cagaaaagtg tgcccgtgat tgggatatta ctagagaaca acaagacaat 540
tttgccatcg aatcctacca aaaatctcaa aaatctcaaa aggaaggtaa attcgacaat 600
gaaattgtac ctgttaccat taagggattt agaggtaagc ctgatactca agtcacgaag 660
gacgaggaac ctgctagatt acacgttgaa aaattgagat ctgcaaggac tgttttccaa 720
aaagaaaacg gtactgttac tgccgctaac gtttctcaa tcaacgatgg tgctgcagcc 780
gtcatcttgg tttccgaaaa agttttgaag gaaaagaatt tgaagccttt ggctattatc 840
aaaggttggg gtgaggccgc tcatcaacca gctgatttta catgggctcc atctcttgca 900
gttccaaagg ctttgaacaa tgctggcatc gaagacatca attctgttga ttactttgaa 960
ttcaatgaag ccttttcggt tgtcggtttg gtgaacacta agattttgaa gctagaccca 1020
tctaaggtta atgtatatgg tgggtgctgtt gctctaggtc acccattggg ttgttctggt 1080
gctagagtgg ttgttacact gctatccatc ttacagcaag aaggaggtaa gatcgggtgtt 1140
gccgccattt gtaatggtgg tgggtggtgct tcctctattg tcattgaaaa gatatga 1197

<210> 133

<211> 398
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 133

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

5

Gly Phe Arg Gly Lys Pro Asp Thr Gln Val Thr Lys Asp Glu Glu Pro
 210 215 220
 Ala Arg Leu His Val Glu Lys Leu Arg Ser Ala Arg Thr Val Phe Gln
 225 230 235 240
 Lys Glu Asn Gly Thr Val Thr Ala Ala Asn Ala Ser Pro Ile Asn Asp
 245 250 255
 Gly Ala Ala Ala Val Ile Leu Val Ser Glu Lys Val Leu Lys Glu Lys
 260 265 270
 Asn Leu Lys Pro Leu Ala Ile Ile Lys Gly Trp Gly Glu Ala Ala His
 275 280 285
 Gln Pro Ala Asp Phe Thr Trp Ala Pro Ser Leu Ala Val Pro Lys Ala
 290 295 300
 Leu Lys His Ala Gly Ile Glu Asp Ile Asn Ser Val Asp Tyr Phe Glu
 305 310 315 320
 Phe Asn Glu Ala Phe Ser Val Val Gly Leu Val Asn Thr Lys Ile Leu
 325 330 335
 Lys Leu Asp Pro Ser Lys Val Asn Val Tyr Gly Gly Ala Val Ala Leu
 340 345 350
 Gly His Pro Leu Gly Cys Ser Gly Ala Arg Val Val Val Thr Leu Leu
 355 360 365
 Ser Ile Leu Gln Gln Glu Gly Gly Lys Ile Gly Val Ala Ala Ile Cys
 370 375 380
 Asn Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ser Ile Val Ile Glu Lys Ile
 385 390 395

<210> 134
 <211> 864
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis

<400> 134

atggaaatca acaaatcat ggtagctggc gcaggtcaga tggggagcgg aattgctcaa 60
 acagccgccg acgcgggctt ttatgtgcgg atgtatgatg tgaatccaga ggccgcggag 120
 gcaggattga aacggctgaa gaaacagctg gcccgatgat ctgagaaagg aaaaaggacc 180
 gagacggaag tgaagagcgt aatcaaccgc atttcgattt ctcaaactact tgaggaggca 240
 gagcatgcgg acattgtgat tgaggctatc gcagaaaaca tggcggcaaa aactgagatg 300
 tttaaaacac ttgatcgcat ttgccgcct catacgattt tggccagcaa tacatcttcc 360
 ttgcctatta cagaaatcgc tgctgtaaca aaccggcctc aacgggttat tggcatgcat 420

tttatgaatc ccgctccctgt aatgaagctg gtagaagtga ttcgaggctt ggctacatca 480
gaagaaacgg ccttagatgt tatggcatta gcggaaaaga tggggaaaac agcggtagaa 540
gtcaatgatt ttcctgggtt tgtttccaac cgtgtgcttc ttccaatgat taatgaagcc 600
atctattgcy tgtatgaggg agtggcgaag ccggaggcaa tagatgaagt gatgaagctg 660
ggcatgaatc atccgatggg tccgcttgca ttagcggatt ttatcggact ggatacgtgt 720
ttatcaatta tggaagtcct tcactcaggc cttggcgatt ccaaataccg tccttgcccg 780
ctgctccgca agtatgtcaa agcaggctgg cttggcaaaa agagcggacg cggtttttat 840
gactatgagg agaagacttc ctga 864

<210> 135
<211> 287
<212> PRT
5 <213> Bacillus subtilis

<400> 135

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

Thr Ala Val Glu Val Asn Asp Phe Pro Gly Phe Val Ser Asn Arg Val
180 185 190

Leu Leu Pro Met Ile Asn Glu Ala Ile Tyr Cys Val Tyr Glu Gly Val
195 200 205

Ala Lys Pro Glu Ala Ile Asp Glu Val Met Lys Leu Gly Met Asn His
210 215 220

Pro Met Gly Pro Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ile Gly Leu Asp Thr Cys
225 230 235 240

Leu Ser Ile Met Glu Val Leu His Ser Gly Leu Gly Asp Ser Lys Tyr
245 250 255

Arg Pro Cys Pro Leu Leu Arg Lys Tyr Val Lys Ala Gly Trp Leu Gly
260 265 270

Lys Lys Ser Gly Arg Gly Phe Tyr Asp Tyr Glu Glu Lys Thr Ser
275 280 285

<210> 136

<211> 855

<212> DNA

5 <213> Ralstonia eutropha

<400> 136

| | |
|---|-----|
| atggcaatca ggacagtggg catcgtgggt gccggcacca tgggcaacgg catcgcgcag | 60 |
| gcttgtgctgg tgggtggcct ggacgtgggt atggtggata tcagcgacgc agcgggtgcag | 120 |
| aagggcatcg ccaccgtcgc cggcagcctg gaccgcctga tcaagaagga caagatcagc | 180 |
| gaagccgaca agatgactgc gctcgcgcgc atccacggca gcaccgcgta tgacgacctg | 240 |
| aagaaggccg atatcgtgat cgaggccgcc accgagaact ttgacctgaa ggtcaagatc | 300 |
| ctcaagcaga tcgacagcat cgtcggcgag aacgtcatca ttgcttcgaa cacgtcgtcg | 360 |
| atctcgatca ccaagctggc cgccgtgacg agtcgccccg agcgcttcat cggcatgcac | 420 |
| ttcttcaacc cgggtgccgt gatggcgctg gtggaactga tccgcggcct gcagaccagc | 480 |
| gacgcggctc acgccgatgt cgaggcgctg gccaaaggaa tgggcaagta cccgatcacc | 540 |
| gtcaagaaca gcccgggctt cgtcgtcaac cgcacacctgt gcccgatgat caacgaagcc | 600 |
| ttctgcgtgc tcggtgaagg cctggcctcg ccggaagaga tcgacgaagg catgaagctc | 660 |
| ggctgcaacc atccgatcgg cccctggca ctggccgaca tgatcggcct ggacaccatg | 720 |
| ctggcagtga tggaaagtgt gtacacagaa tttgccgacc cgaagtatcg tccggccatg | 780 |
| ctgatgcgcg agatgggtggc tgcgggggtat ctgggccgca agactggccg tggcgtgtac | 840 |
| gtctacagca agtaa | 855 |

<210> 137

<211> 284

10 <212> PRT

<213> Ralstonia eutropha

<400> 137

Met Ala Ile Arg Thr Val Gly Ile Val Gly Ala Gly Thr Met Gly Asn
1 5 10 15

Gly Ile Ala Gln Ala Cys Ala Val Val Gly Leu Asp Val Val Met Val
20 25 30

Asp Ile Ser Asp Ala Ala Val Gln Lys Gly Ile Ala Thr Val Ala Gly
35 40 45

Ser Leu Asp Arg Leu Ile Lys Lys Asp Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys
50 55 60

Met Thr Ala Leu Ala Arg Ile His Gly Ser Thr Ala Tyr Asp Asp Leu
65 70 75 80

Lys Lys Ala Asp Ile Val Ile Glu Ala Ala Thr Glu Asn Phe Asp Leu
85 90 95

Lys Val Lys Ile Leu Lys Gln Ile Asp Ser Ile Val Gly Glu Asn Val
100 105 110

Ile Ile Ala Ser Asn Thr Ser Ser Ile Ser Ile Thr Lys Leu Ala Ala
115 120 125

Val Thr Ser Arg Pro Glu Arg Phe Ile Gly Met His Phe Phe Asn Pro
130 135 140

Val Pro Val Met Ala Leu Val Glu Leu Ile Arg Gly Leu Gln Thr Ser
145 150 155 160

Asp Ala Ala His Ala Asp Val Glu Ala Leu Ala Lys Glu Leu Gly Lys
165 170 175

Tyr Pro Ile Thr Val Lys Asn Ser Pro Gly Phe Val Val Asn Arg Ile
180 185 190

Leu Cys Pro Met Ile Asn Glu Ala Phe Cys Val Leu Gly Glu Gly Leu
195 200 205

Ala Ser Pro Glu Glu Ile Asp Glu Gly Met Lys Leu Gly Cys Asn His
210 215 220

Pro Ile Gly Pro Leu Ala Leu Ala Asp Met Ile Gly Leu Asp Thr Met
225 230 235 240

Leu Ala Val Met Glu Val Leu Tyr Thr Glu Phe Ala Asp Pro Lys Tyr
245 250 255

Arg Pro Ala Met Leu Met Arg Glu Met Val Ala Ala Gly Tyr Leu Gly
260 265 270

Arg Lys Thr Gly Arg Gly Val Tyr Val Tyr Ser Lys
275 280

<210> 138
<211> 741
<212> DNA
<213> Alcaligenes eutrophis
<400> 138

```

atgactcagc gcattgcgta tgtgaccggc ggcatgggtg gtatcggaac cgccatttgc 60
cagcggctgg ccaaggatgg ctttcgtgtg gtggccggtt gcggcccaa ctcgccgcgc 120
cgcgaaaagt ggctggagca gcagaaggcc ctgggcttcg atttcattgc ctcggaaggc 180
aatgtggctg actgggactc gaccaagacc gcattcgaca aggtcaagtc cgaggtcggc 240
gaggttgatg tgctgatcaa caacgccggt atcaccgcgc acgtgggtgtt ccgcaagatg 300
acccgcgccg actgggatgc ggtgatcgac accaacctga cctcgctgtt caacgtcacc 360
aagcaggatga tcgacggcat ggccgaccgt ggctggggcc gcacgtcaa catctcgtcg 420
gtgaacgggc agaagggcca gttcgccag accaactact ccaccgcaa ggccggcctg 480
catggcttca ccatggcact ggcgcaggaa gtggcgacca agggcgtgac cgtcaacacg 540
gtctctccgg gctatatcgc caccgacatg gtcaaggcga tccgccagga cgtgctcgac 600
aagatcgtcg cgacgatccc ggtcaagcgc ctgggcctgc cggaagagat cgcctcgatc 660
tgcgctgggt tgtcgtcgga ggagtccggt ttctcgaccg gcgccgactt ctcgctcaac 720
ggcggcctgc atatgggctg a 741

```

<210> 139

<211> 246

<212> PRT

5 <213> *Alcaligenes eutrophus*

<400> 139

```

Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly
1         5         10        15
Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala
20        25        30
Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln
35        40        45
Lys Ala Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ser Glu Gly Asn Val Ala Asp
50        55        60

```

Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly
 65 70 75 80
 Glu Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Val Val
 85 90 95
 Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn
 100 105 110
 Leu Thr Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Gly Met Ala
 115 120 125
 Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln
 130 135 140
 Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu
 145 150 155 160
 His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val
 165 170 175
 Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys
 180 185 190
 Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val
 195 200 205
 Lys Arg Leu Gly Leu Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu
 210 215 220
 Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn
 225 230 235 240
 Gly Gly Leu His Met Gly
 245

<210> 140
 <211> 768
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<400> 140

| | |
|--|-----|
| atgagcgaac tgatcgtcag ccgtcagcaa cgagtattgt tgctgaccct taaccgtccc | 60 |
| gccgcacgta atgcgctaaa taatgccctg ctgatgcaac tggtaaatga actggaagct | 120 |
| gcggctaccg ataccagcat ttcggtctgt gtgattaccg gtaatgcacg cttttttgcc | 180 |
| gctggggccg atctcaacga aatggcagaa aaagatctcg cggccacctt aaacgataca | 240 |
| cgtccgcagc tatgggcgcg attgcaggcc ttttaataaac cacttatcgc agccgtcaat | 300 |
| ggttacgcgc ttggggcggg ttgcgaactg gcattgttgt gcgatgtggt gggtgccgga | 360 |

gagaacgcgc gttttgggtt gccggaaatc actctcggca tcatgcctgg cgcaggcgga 420
 acgcaacgtt taatccgtag tgtcggtaaa tcgttagcca gcaaatggt gctgagcgga 480
 gaaagtatca ccgctcagca agcacagcag gccgggctgg ttagcgacgt cttccccagc 540
 gatttaaccc tcgaatacgc cttacagctg gcatacgaata tggcacgtca ctcgccgctg 600
 gccttacaag cggcaaagca agcgtgcgc cagtcgcagg aagtggcttt gcaagccgga 660
 cttgccagc agcgacagtt attcaccttg ctggcggcaa cagaagatcg tcatgaaggc 720
 atctccgctt tcttcaaaa acgcacgccc gactttaag gacgctaa 768

<210> 141

<211> 255

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 141

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

180 185 190

Lys Met Ala Arg His Ser Pro Leu Ala Leu Gln Ala Ala Lys Gln Ala
195 200 205

Leu Arg Gln Ser Gln Glu Val Ala Leu Gln Ala Gly Leu Ala Gln Glu
210 215 220

Arg Gln Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Thr Glu Asp Arg His Glu Gly
225 230 235 240

Ile Ser Ala Phe Leu Gln Lys Arg Thr Pro Asp Phe Lys Gly Arg
245 250 255

<210> 142

<211> 783

<212> DNA

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 142

atgggagatt ctattctttt tactgttaaa aatgaacata tggcgttgat caccttaaac 60
aggcctcagg cagcaaatgc tctttcagcg gaaatgctta gaaacctgca aatgattatc 120
caggaaattg aatttaactc aaacatccgt tgcgtcatcc tcacaggcac cggtgaaaaa 180
gcgttttgtg caggggcaga cctgaaggaa cgataaaaac tgaaagaaga tcaggttctg 240
gaaagtgtat ctctcattca aagaacggcg gctttacttg atgccttgcc gcagccggtc 300
atagctgcga taaatggaag cgcattaggc ggcggactag aattggcatt ggcatgcgac 360
cttcgaatcg caactgaagc agctgtgctg ggacttccgg aaacagggtt agctattatc 420
ccgggcgctg gagggaccca aaggctgccc cggttgattg gcagaggaaa agcaaaagaa 480
ttcatttata caggcagacg cgtgaccgca cacgaagcaa aagaaatcgg ccttgtagag 540
catgtcacgg ctcttgtga ccttatgcc aagcagagg aactggccgc agccatttct 600
gccaacggac cgatcgctgt ccgtcaggct aaatttgcaa tcaataaagg attggagaca 660
gatcttgcta caggccttgc gattgaacaa aaagcgtatg aacaaaccat cccgacaaaa 720
gacaggagag aagggttca ggcctttcaa gaaaaagac gggccgtata caaggaata 780
taa 783

<210> 143

<211> 260

10 <212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 143

Met Gly Asp Ser Ile Leu Phe Thr Val Lys Asn Glu His Met Ala Leu
1 5 10 15

Ile Thr Leu Asn Arg Pro Gln Ala Ala Asn Ala Leu Ser Ala Glu Met
20 25 30

Leu Arg Asn Leu Gln Met Ile Ile Gln Glu Ile Glu Phe Asn Ser Asn
 35 40 45
 Ile Arg Cys Val Ile Leu Thr Gly Thr Gly Glu Lys Ala Phe Cys Ala
 50 55 60
 Gly Ala Asp Leu Lys Glu Arg Ile Lys Leu Lys Glu Asp Gln Val Leu
 65 70 75 80
 Glu Ser Val Ser Leu Ile Gln Arg Thr Ala Ala Leu Leu Asp Ala Leu
 85 90 95
 Pro Gln Pro Val Ile Ala Ala Ile Asn Gly Ser Ala Leu Gly Gly Gly
 100 105 110
 Leu Glu Leu Ala Leu Ala Cys Asp Leu Arg Ile Ala Thr Glu Ala Ala
 115 120 125
 Val Leu Gly Leu Pro Glu Thr Gly Leu Ala Ile Ile Pro Gly Ala Gly
 130 135 140
 Gly Thr Gln Arg Leu Pro Arg Leu Ile Gly Arg Gly Lys Ala Lys Glu
 145 150 155 160
 Phe Ile Tyr Thr Gly Arg Arg Val Thr Ala His Glu Ala Lys Glu Ile
 165 170 175
 Gly Leu Val Glu His Val Thr Ala Pro Cys Asp Leu Met Pro Lys Ala
 180 185 190
 Glu Glu Leu Ala Ala Ala Ile Ser Ala Asn Gly Pro Ile Ala Val Arg
 195 200 205
 Gln Ala Lys Phe Ala Ile Asn Lys Gly Leu Glu Thr Asp Leu Ala Thr
 210 215 220
 Gly Leu Ala Ile Glu Gln Lys Ala Tyr Glu Gln Thr Ile Pro Thr Lys
 225 230 235 240
 Asp Arg Arg Glu Gly Leu Gln Ala Phe Gln Glu Lys Arg Arg Ala Val
 245 250 255
 Tyr Lys Gly Ile
 260

<210> 144
 <211> 405
 <212> DNA
 5 <213> *Aeromonas caviae*
 <400> 144

atgagcgcac aatccctgga agtaggccag aaggcccgtc tcagcaagcg gttcggggcg 60
 gcggaggtag cgccttcgc cgcgtctcg gaggacttca accccctgca cctggacccg 120
 gccttcgccg ccaccacggc gttcgagcgg cccatagtcc acggcatgct gctcgccagc 180
 ctcttctccg ggctgctggg ccagcagttg ccgggcaagg ggagcatcta tctgggtcaa 240
 agcctcagct tcaagctgcc ggtctttgtc ggggacgagg tgacggccga ggtggaggtg 300
 accgcccttc gcgaggacaa gcccacgcc accctgacca cccgcatctt caccgaaggc 360
 ggcgccctcg ccgtgacggg ggaagccgtg gtcaagctgc cttaa 405

<210> 145

<211> 134

<212> PRT

5 <213> Aeromonas caviae

<400> 145

Met Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys
 1 5 10 15

Arg Phe Gly Ala Ala Glu Val Ala Ala Phe Ala Ala Leu Ser Glu Asp
 20 25 30

Phe Asn Pro Leu His Leu Asp Pro Ala Phe Ala Ala Thr Thr Ala Phe
 35 40 45

Glu Arg Pro Ile Val His Gly Met Leu Leu Ala Ser Leu Phe Ser Gly
 50 55 60

Leu Leu Gly Gln Gln Leu Pro Gly Lys Gly Ser Ile Tyr Leu Gly Gln
 65 70 75 80

Ser Leu Ser Phe Lys Leu Pro Val Phe Val Gly Asp Glu Val Thr Ala
 85 90 95

Glu Val Glu Val Thr Ala Leu Arg Glu Asp Lys Pro Ile Ala Thr Leu
 100 105 110

Thr Thr Arg Ile Phe Thr Gln Gly Gly Ala Leu Ala Val Thr Gly Glu
 115 120 125

Ala Val Val Lys Leu Pro
 130

<210> 146

<211> 1912

10 <212> DNA

<213> Euglena gracilis

<400> 146

ttttcgcccg tgcaccacga tgtcgtgccc cgcctcgccg tctgctgccg tgggtgtctgc 60

cggcgccttc tgcctgtgcg tggcaacggt attgttggcg actggatcca accccaccgc 120
cctgtccact gcttccactc gctctccgac ctactgggtc cgtgggggtg acaggggctt 180
gatgaggcca accactgcag cggctctgac gacaatgaga gaggtgcccc agatggctga 240
gggattttca ggcgaagcca cgtctgcatg ggccgcccgc gggccgcagt gggcggcgcc 300
gctcgtggcc ggggcctcct ccgactggc gctgtggtgg tgggcccgcc ggcgcagcgt 360
gcggcggccg ctggcagcgc tggcggagct gccaccgcg gtcaccacc tggccccccc 420
gatggcgatg ttcaccacca cagcgaaggt catccagccc aagattcgtg gcttcatctg 480
cacgaccacc caccgatcg gctgtgagaa gcgggtccag gaggagatcg cgtacgcccg 540
tgcccaccgc cccaccagcc ctggcccga gaggggtgctg gtcacgggt gcagtaccgg 600
ctacgggctc tccaccgca tcaccgtgc cttcggctac caggccgcca cgtgggctg 660
gttcctggcg gggccccga cgaagggccg ccccgccgc gcgggctggt acaacaccgt 720
ggcgttcgag aaggccgccc tggaggccgg gctgtacgcc cggagcctta atggcgacgc 780
cttcgactcc acaacgaagg cgcgacggt cgaggcgatc aagcgggacc tcggcacggt 840
ggacctcgtg gtgtacagca tcgccgccc gaagcggacg gacctgcca ccggcgtcct 900
ccacaaggcc tgcctgaagc ccatcggcgc cacgtacacc aaccgactg tgaacaccga 960
caaggcggag gtgaccgatg tcagattga gccggcctcc cccgaagaga tcgcgacac 1020
ggtgaagggt atgggcgggg aggactggga gctctggatc caggcgctgt cggaggccgg 1080
cgtgctggcg gagggggcca agacggtggc gtactcctac atcgcccccg agatgacgtg 1140
gcctgtctac tggctcggca ccatcgggga ggccaagaag gacgtggaga aggctgcaa 1200
gcgcatcacg cagcagtacg gctgcccggc gtaccgggtg gtggccaagg ccttggtcac 1260
ccaggccagc tccgccatcc cggtggtgcc gctctacatc tgcctgctgt accgcgttat 1320
gaaggagaag ggcaccacg agggctgcat cgagcagatg gtgcggctgc tcaccacgaa 1380
gctgtacccc gagaacgggg ccccatcgt cgatgaggcc ggacgtgtgc ggggtgatga 1440
ctgggagatg gcggaggatg tgcagcaggc tgtaaggac ctctggagcc aggtgagcac 1500
tgccaacctc aaggacatct ccgacttcgc tgggtatcaa actgagttcc tgcggctgtt 1560
cgggttcggc attgacggcg tggactacga ccagcccgtg gacgtggagg cggacctccc 1620
cagtgtgcc cagcagtagg tgctggacgc gcctctctc cggggggtct gccaaaatgg 1680
tcgtcccccc aaccaaccc cctgccacc atcggggtcc cgcggtgaa tgcggcccc 1740
acccaaaggc aaaggtaag gccggggccc caccgcaaa gggtaacaca tatgtatccg 1800
tcgggggctg atccgcgtgc gacacgggcc ataattgtgc cccacgggat gtccatgcgc 1860
ctaagacaac tgccccggcc gacagtcgct accgccttga gttccccagg ca 1912

<210> 147
<211> 539
<212> PRT
5 <213> Euglena gracilis
<400> 147

ES 2 446 520 T3

Met Ser Cys Pro Ala Ser Pro Ser Ala Ala Val Val Ser Ala Gly Ala
1 5 10 15

Leu Cys Leu Cys Val Ala Thr Val Leu Leu Ala Thr Gly Ser Asn Pro
20 25 30

Thr Ala Leu Ser Thr Ala Ser Thr Arg Ser Pro Thr Ser Leu Val Arg
35 40 45

Gly Val Asp Arg Gly Leu Met Arg Pro Thr Thr Ala Ala Ala Leu Thr
50 55 60

Thr Met Arg Glu Val Pro Gln Met Ala Glu Gly Phe Ser Gly Glu Ala
65 70 75 80

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

Ala Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Leu Trp Trp Trp Ala Ala Arg Arg
100 105 110

Ser Val Arg Arg Pro Leu Ala Ala Leu Ala Glu Leu Pro Thr Ala Val
115 120 125

Thr His Leu Ala Pro Pro Met Ala Met Phe Thr Thr Thr Ala Lys Val
130 135 140

Ile Gln Pro Lys Ile Arg Gly Phe Ile Cys Thr Thr Thr His Pro Ile
145 150 155 160

Gly Cys Glu Lys Arg Val Gln Glu Glu Ile Ala Tyr Ala Arg Ala His
165 170 175

Pro Pro Thr Ser Pro Gly Pro Lys Arg Val Leu Val Ile Gly Cys Ser
180 185 190

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

Ala Ala Thr Leu Gly Val Phe Leu Ala Gly Pro Pro Thr Lys Gly Arg
210 215 220

Pro Ala Ala Ala Gly Trp Tyr Asn Thr Val Ala Phe Glu Lys Ala Ala
225 230 235 240

Leu Glu Ala Gly Leu Tyr Ala Arg Ser Leu Asn Gly Asp Ala Phe Asp
245 250 255

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

Thr Val Asp Leu Val Val Tyr Ser Ile Ala Ala Pro Lys Arg Thr Asp
275 280 285

Pro Ala Thr Gly Val Leu His Lys Ala Cys Leu Lys Pro Ile Gly Ala
290 295 300

Thr Tyr Thr Asn Arg Thr Val Asn Thr Asp Lys Ala Glu Val Thr Asp
305 310 315 320

Val Ser Ile Glu Pro Ala Ser Pro Glu Glu Ile Ala Asp Thr Val Lys
325 330 335

Val Met Gly Gly Glu Asp Trp Glu Leu Trp Ile Gln Ala Leu Ser Glu
340 345 350

Ala Gly Val Leu Ala Glu Gly Ala Lys Thr Val Ala Tyr Ser Tyr Ile
355 360 365

Gly Pro Glu Met Thr Trp Pro Val Tyr Trp Ser Gly Thr Ile Gly Glu
370 375 380

Ala Lys Lys Asp Val Glu Lys Ala Ala Lys Arg Ile Thr Gln Gln Tyr
385 390 395 400

Gly Cys Pro Ala Tyr Pro Val Val Ala Lys Ala Leu Val Thr Gln Ala
405 410 415

Ser Ser Ala Ile Pro Val Val Pro Leu Tyr Ile Cys Leu Leu Tyr Arg
420 425 430

Val Met Lys Glu Lys Gly Thr His Glu Gly Cys Ile Glu Gln Met Val
435 440 445

Arg Leu Leu Thr Thr Lys Leu Tyr Pro Glu Asn Gly Ala Pro Ile Val
450 455 460

Asp Glu Ala Gly Arg Val Arg Val Asp Asp Trp Glu Met Ala Glu Asp
465 470 475 480

Val Gln Gln Ala Val Lys Asp Leu Trp Ser Gln Val Ser Thr Ala Asn
485 490 495

Leu Lys Asp Ile Ser Asp Phe Ala Gly Tyr Gln Thr Glu Phe Leu Arg
500 505 510

Leu Phe Gly Phe Gly Ile Asp Gly Val Asp Tyr Asp Gln Pro Val Asp
515 520 525

Val Glu Ala Asp Leu Pro Ser Ala Ala Gln Gln
530 535

<210> 148
<211> 1344
<212> DNA
<213> Streptomyces collinus

<400> 148

```

gtgaccgtga aggacatcct ggacgcgatc cagtcgaagg acgccacgtc cgccgacttc      60
gccgccctgc agctccccga gtcgtaccgt gcgatcaccg tgcacaagga cgagacggag     120
atgttcgcgg gtctggagac ccgcgacaag gacccgcgca agtcgatcca cctcgacgag     180
gtgcccgtgc ccgaactggg cccgggcgaa gccctgggtg ccgtcatggc ctccctcggtc     240
aactacaact cgggtgtggac ctcgatcttc gagccggtgt cgacgttcgc cttcctggag     300
cgctacggca agctgtcgcc gctgaccaag cgccacgacc tgccgtacca catcatcggc     360
tccgacctcg cgggcgtcgt cctgcgcacc ggccccggcg tcaacgcctg gcagcccggt     420
gacgaggtcg tcgcgcactg cctgagcgtc gagctggagt cggccgacgg ccacgacgac     480
accatgctcg accccgagca gcgcattctg ggcttcgaga ccaacttcgg cggcctcgcg     540
gagatcgcgc tggtaagac gaaccagctg atgccgaagc cgaagcacct cacctgggag     600
gaggccgcgg ccccgggcct ggtgaactcc accgcctacc gccagctggt ctcccgcaac     660
ggcgcgcgca tgaagcaggg cgacaacgtc ctgatctggg gcgcgagcgg cgggctcggc     720
tcgtacgcca cgagttcgc gctcgcgggc ggtgccaaacc cgatctgtgt cgtctcctcg     780
ccccagaagg cgagatctg ccgctcgatg ggcgcggagg cgatcatcga ccgcaacgcc     840
gagggtctaca agttctggaa ggacgagcac acccaggacc ccaaggagtg gaagcgcttc     900
ggcaagcgca tccgcgagct gaccggcggc gaggacatcg acatcgtctt cgagcacccc     960
ggccgcgaga ccttcggcgc ctccgtctac gtcacccgca agggcggcac catcaccacc    1020
tgcgctcga cctcgggcta catgcacgag tacgacaacc ggtacctgtg gatgtccctg    1080
aagcggatca tcggctcgca cttcgccaac taccgcgagg cgtacgaggc caaccgcctg    1140
atcgccaagg gcaagatcca cccgacgtg tcgaagacgt actccctgga ggagaccggc    1200
caggcggcgt acgacgtcca ccgcaacctg caccagggca aggtcggcgt cctgtgcctc    1260
gcgcccggagg aaggcctcgg cgtgcgcgac gcggagatgc gcgcccagca catcgacgcc    1320
atcaaccgct tccgcaacgt ctga                                           1344

```

<210> 149

<211> 447

<212> PRT

<213> Streptomyces collinus

<400> 149

```

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

```

Ser Ala Asp Phe Ala Ala Leu Gln Leu Pro Glu Ser Tyr Arg Ala Ile
 20 25 30
 Thr Val His Lys Asp Glu Thr Glu Met Phe Ala Gly Leu Glu Thr Arg
 35 40 45
 Asp Lys Asp Pro Arg Lys Ser Ile His Leu Asp Glu Val Pro Val Pro
 50 55 60
 Glu Leu Gly Pro Gly Glu Ala Leu Val Ala Val Met Ala Ser Ser Val
 65 70 75 80
 Asn Tyr Asn Ser Val Trp Thr Ser Ile Phe Glu Pro Val Ser Thr Phe
 85 90 95
 Ala Phe Leu Glu Arg Tyr Gly Lys Leu Ser Pro Leu Thr Lys Arg His
 100 105 110
 Asp Leu Pro Tyr His Ile Ile Gly Ser Asp Leu Ala Gly Val Val Leu
 115 120 125
 Arg Thr Gly Pro Gly Val Asn Ala Trp Gln Pro Gly Asp Glu Val Val
 130 135 140
 Ala His Cys Leu Ser Val Glu Leu Glu Ser Pro Asp Gly His Asp Asp
 145 150 155 160
 Thr Met Leu Asp Pro Glu Gln Arg Ile Trp Gly Phe Glu Thr Asn Phe
 165 170 175
 Gly Gly Leu Ala Glu Ile Ala Leu Val Lys Thr Asn Gln Leu Met Pro
 180 185 190
 Lys Pro Lys His Leu Thr Trp Glu Glu Ala Ala Ala Pro Gly Leu Val
 195 200 205
 Asn Ser Thr Ala Tyr Arg Gln Leu Val Ser Arg Asn Gly Ala Ala Met
 210 215 220
 Lys Gln Gly Asp Asn Val Leu Ile Trp Gly Ala Ser Gly Gly Leu Gly
 225 230 235 240
 Ser Tyr Ala Thr Gln Phe Ala Leu Ala Gly Gly Ala Asn Pro Ile Cys
 245 250 255
 Val Val Ser Ser Pro Gln Lys Ala Glu Ile Cys Arg Ser Met Gly Ala
 260 265 270
 Glu Ala Ile Ile Asp Arg Asn Ala Glu Gly Tyr Lys Phe Trp Lys Asp

275 280 285

Glu His Thr Gln Asp Pro Lys Glu Trp Lys Arg Phe Gly Lys Arg Ile
290 295 300

Arg Glu Leu Thr Gly Gly Glu Asp Ile Asp Ile Val Phe Glu His Pro
305 310 315 320

Gly Arg Glu Thr Phe Gly Ala Ser Val Tyr Val Thr Arg Lys Gly Gly
325 330 335

Thr Ile Thr Thr Cys Ala Ser Thr Ser Gly Tyr Met His Glu Tyr Asp
340 345 350

Asn Arg Tyr Leu Trp Met Ser Leu Lys Arg Ile Ile Gly Ser His Phe
355 360 365

Ala Asn Tyr Arg Glu Ala Tyr Glu Ala Asn Arg Leu Ile Ala Lys Gly
370 375 380

Lys Ile His Pro Thr Leu Ser Lys Thr Tyr Ser Leu Glu Glu Thr Gly
385 390 395 400

Gln Ala Ala Tyr Asp Val His Arg Asn Leu His Gln Gly Lys Val Gly
405 410 415

Val Leu Cys Leu Ala Pro Glu Glu Gly Leu Gly Val Arg Asp Ala Glu
420 425 430

Met Arg Ala Gln His Ile Asp Ala Ile Asn Arg Phe Arg Asn Val
435 440 445

<210> 150
<211> 1344
<212> DNA
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 150

gtgaccgtga aggacatcct ggacgcgac cagtcgccccg actccacgcc ggccgacatc 60

gccgcactgc cgctccccga gtcgtaccgc gcgatcaccg tgcacaagga cgagaccgag 120

atgttcgcgg gcctcgagac ccgcgacaag gacccccgca agtcgatcca cctggacgac 180

gtgccggtgc ccgagctggg ccccggcgag gccctggtgg ccgtcatggc ctctctggtc 240

aactacaact cgggtgtggac ctcgatcttc gagccgctgt ccaccttcgg gttcctggag 300

cgctacggcc gggtcagcga cctcgccaag cggcacgacc tgccgtacca cgtcatcggc 360

tccgacctcg ccggtgtcgt cctgcgcacc ggtccgggcg tcaacgcctg gcaggcgggc 420

gacgaggtcg tcgcgcactg cctctccgtc gagctggagt cctccgacgg ccacaacgac 480

acgatgctcg accccgagca gcgcacatcgg ggcttcgaga ccaacttcgg cggcctcgcg 540

gagatcgcgc tggtaagtc caaccagctg atgccgaagc cggaccacct gagctgggag 600
gaggccgcgc ctcccgccct ggtcaactcc accgcgtacc gccagctcgt ctcccgcaac 660
ggcgccggca tgaagcaggg cgacaacgtg ctcatctggg gcgcgagcgg cggactcggc 720
tcgtacgcca ccagttcgc cctcgccggc ggcgccaacc cgatctgcgt cgtctcctcg 780
ccgcagaagg cggagatctg ccgcgcgatg ggcgccgagg cgatcatcga ccgcaacgcc 840
gagggctacc ggttctggaa ggacgagaac acccaggacc cgaaggagtg gaagcgcttc 900
ggcaagcgca tccgcgaact gaccggcggc gaggacatcg acatcgtctt cgagcaccctc 960
ggccgcgaga ccttcggcgc ctccgtcttc gtcaccgcga agggcggcac catcaccacc 1020
tgcgccctga cctcgggcta catgcacgag tacgacaacc gctacctgtg gatgtccctg 1080
aagcgcatca tcggctcgca cttcgccaac taccgcgagg cctgggaggc caaccgcctc 1140
atcgccaagg gcaggatcca cccacgctc tccaaggtgt actccctcga ggacaccggc 1200
caggccgcct acgacgtcca ccgcaacctc caccagggca aggtcggcgt gctgtgcctg 1260
gcgcccgagg agggcctggg cgtgcgcgac cgggagaagc gcgcgcagca cctcgacgcc 1320
atcaaccgct tccggaacat ctga 1344

<210> 151

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 151

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

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

Thr Val His Lys Asp Glu Thr Glu Met Phe Ala Gly Leu Glu Thr Arg
35 40 45

Asp Lys Asp Pro Arg Lys Ser Ile His Leu Asp Asp Val Pro Val Pro
50 55 60

Glu Leu Gly Pro Gly Glu Ala Leu Val Ala Val Met Ala Ser Ser Val
65 70 75 80

Asn Tyr Asn Ser Val Trp Thr Ser Ile Phe Glu Pro Leu Ser Thr Phe
85 90 95

Gly Phe Leu Glu Arg Tyr Gly Arg Val Ser Asp Leu Ala Lys Arg His
100 105 110

Asp Leu Pro Tyr His Val Ile Gly Ser Asp Leu Ala Gly Val Val Leu
115 120 125

Arg Thr Gly Pro Gly Val Asn Ala Trp Gln Ala Gly Asp Glu Val Val
 130 135 140
 Ala His Cys Leu Ser Val Glu Leu Glu Ser Ser Asp Gly His Asn Asp
 145 150 155 160
 Thr Met Leu Asp Pro Glu Gln Arg Ile Trp Gly Phe Glu Thr Asn Phe
 165 170 175
 Gly Gly Leu Ala Glu Ile Ala Leu Val Lys Ser Asn Gln Leu Met Pro
 180 185 190
 Lys Pro Asp His Leu Ser Trp Glu Glu Ala Ala Ala Pro Gly Leu Val
 195 200 205
 Asn Ser Thr Ala Tyr Arg Gln Leu Val Ser Arg Asn Gly Ala Gly Met
 210 215 220
 Lys Gln Gly Asp Asn Val Leu Ile Trp Gly Ala Ser Gly Gly Leu Gly
 225 230 235 240
 Ser Tyr Ala Thr Gln Phe Ala Leu Ala Gly Gly Ala Asn Pro Ile Cys
 245 250 255
 Val Val Ser Ser Pro Gln Lys Ala Glu Ile Cys Arg Ala Met Gly Ala
 260 265 270
 Glu Ala Ile Ile Asp Arg Asn Ala Glu Gly Tyr Arg Phe Trp Lys Asp
 275 280 285
 Glu Asn Thr Gln Asp Pro Lys Glu Trp Lys Arg Phe Gly Lys Arg Ile
 290 295 300
 Arg Glu Leu Thr Gly Gly Glu Asp Ile Asp Ile Val Phe Glu His Pro
 305 310 315 320
 Gly Arg Glu Thr Phe Gly Ala Ser Val Phe Val Thr Arg Lys Gly Gly
 325 330 335
 Thr Ile Thr Thr Cys Ala Ser Thr Ser Gly Tyr Met His Glu Tyr Asp
 340 345 350
 Asn Arg Tyr Leu Trp Met Ser Leu Lys Arg Ile Ile Gly Ser His Phe
 355 360 365
 Ala Asn Tyr Arg Glu Ala Trp Glu Ala Asn Arg Leu Ile Ala Lys Gly
 370 375 380
 Arg Ile His Pro Thr Leu Ser Lys Val Tyr Ser Leu Glu Asp Thr Gly
 385 390 395 400

Gln Ala Ala Tyr Asp Val His Arg Asn Leu His Gln Gly Lys Val Gly
405 410 415

Val Leu Cys Leu Ala Pro Glu Glu Gly Leu Gly Val Arg Asp Arg Glu
420 425 430

Lys Arg Ala Gln His Leu Asp Ala Ile Asn Arg Phe Arg Asn Ile
435 440 445

<210> 152

<211> 2589

<212> DNA

5 <213> clostridium acetobutylicum

<400> 152

| | |
|--|------|
| atgaaagtca caacagtaaa ggaattagat gaaaaactca aggtaattaa agaagctcaa | 60 |
| aaaaaattct cttgttactc gcaagaaatg gttgatgaaa tcttttagaaa tgcagcaatg | 120 |
| gcagcaatcg acgcaaggat agagctagca aaagcagctg ttttggaac cggtatgggc | 180 |
| ttagttgaag acaaggttat aaaaaatcat tttgcaggcg aatacatcta taacaaatat | 240 |
| aaggatgaaa aaacctgcgg tataattgaa cgaaatgaac cctacggaat tacaaaaata | 300 |
| gcagaaccta taggagtgtg agctgctata atccctgtaa caaacccac atcaacaaca | 360 |
| atatttaaat ccttaatatc ccttaaaact agaaatggaa ttttcttttc gcctcaccca | 420 |
| agggcaaaaa aatccacaat actagcagct aaaacaatac ttgatgcagc cgttaagagt | 480 |
| ggtgccccgg aaaatataat aggttggata gatgaacctt caattgaact aactcaatat | 540 |
| ttaatgcaaa aagcagatat aacccttgca actggtggtc cctcactagt taaatctgct | 600 |
| tattcttccg gaaaaccagc aataggtgtt ggtccgggta acaccccagt aataattgat | 660 |
| gaatctgctc atataaaaat ggcagtaagt tcaattatat tatccaaaac ctatgataat | 720 |
| ggtgttatat gtgcttctga acaatctgta atagtcttaa aatccatata taacaaggta | 780 |
| aaagatgagt tccaagaaag aggagcttat ataataaaga aaaacgaatt ggataaagtc | 840 |
| cgtgaagtga tttttaaaga tggatccgta aaccctaaaa tagtcggaca gtcagcttat | 900 |
| actatagcag ctatggctgg cataaaagta cctaaaacca caagaatatt aataggagaa | 960 |
| gttacctcct taggtgaaga agaacctttt gccacgaaa aactatctcc tgttttggct | 1020 |
| atgtatgagg ctgacaattt tgatgatgct ttaaaaaaag cagtaactct aataaactta | 1080 |
| ggaggcctcg gccatacctc aggaatatat gcagatgaaa taaaagcacg agataaaata | 1140 |
| gatagattta gtagtgccat gaaaaccgta agaacctttg taaatatccc aacctcacia | 1200 |
| ggtgcaagtg gagatctata taattttaga ataccacctt ctttcacgct tggctgcgga | 1260 |
| ttttggggag gaaattctgt ttccgagaat gttggtccaa aacatctttt gaatattaaa | 1320 |
| accgtagctg aaaggagaga aaacatgctt tggtttagag ttccacataa agtatatttt | 1380 |
| aagttcgggt gtcttcaatt tgctttaaaa gatttaaaag atctaaagaa aaaaagagcc | 1440 |

```

tttatagtta ctgatagtga ccctataat ttaactatg ttgattcaat aataaaaaata 1500
cttgagcacc tagatattga ttttaaagta ttttaataagg ttggaagaga agctgatctt 1560
aaaaccataa aaaaagcaac tgaagaaatg tcctccttta tgccagacac tataatagct 1620
ttaggtggta cccctgaaat gagctctgca aagctaattg gggactata tgaacatcca 1680
gaagtaaaat ttgaagatct tgcaataaaa tttatggaca taagaaagag aatatatact 1740
ttcccaaaac tcggtaaaaa ggctatgtta gttgcaatta caacttctgc tggttccggt 1800
tctgaggtta ctctttttgc tttagtaact gacaataaca ctggaaataa gtacatgtta 1860
gcagattatg aaatgacacc aaatatggca attgtagatg cagaacttat gatgaaaatg 1920
ccaaagggat taaccgctta ttcaggtata gatgcactag taaatagtat agaagcatac 1980
acatccgtat atgcttcaga atacacaaac ggactagcac tagaggcaat acgattaata 2040
tttaaataatt tgcctgaggc ttacaaaaac ggaagaacca atgaaaaagc aagagagaaa 2100
atggctcacg cttcaactat ggcaggatg gcattccgcta atgcatttct aggtctatgt 2160
cattccatgg caataaaatt aagttcagaa cacaatatc ctagtggcat tgccaatgca 2220
ttactaatag aagaagtaat aaaatttaac gcagttgata atcctgtaa acaagccct 2280
tgcccacaat ataagtatcc aaacaccata tttagatag ctcgaattgc agattatata 2340
aagcttggag gaaatactga tgaggaaaag gtatgctct taattaacaa aatacatgaa 2400
ctaaaaaaag ctttaaatat accaacttca ataaaggatg caggtgtttt ggaggaaaac 2460
ttctattcct cccttgatag aatatctgaa cttgcactag atgatcaatg cacaggcgct 2520
aatcctagat ttcctcttac aagttagata aaagaaatgt atataaattg ttttaaaaaa 2580
caaccttaa 2589

```

<210> 153

<211> 862

<212> PRT

5 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 153

Met Lys Val Thr Thr Val Lys Glu Leu Asp Glu Lys Leu Lys Val Ile
1 5 10 15

Lys Glu Ala Gln Lys Lys Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Glu Met Val Asp
20 25 30

Glu Ile Phe Arg Asn Ala Ala Met Ala Ala Ile Asp Ala Arg Ile Glu
35 40 45

Leu Ala Lys Ala Ala Val Leu Glu Thr Gly Met Gly Leu Val Glu Asp
50 55 60

Lys Val Ile Lys Asn His Phe Ala Gly Glu Tyr Ile Tyr Asn Lys Tyr
65 70 75 80

Lys Asp Glu Lys Thr Cys Gly Ile Ile Glu Arg Asn Glu Pro Tyr Gly
 85 90 95
 Ile Thr Lys Ile Ala Glu Pro Ile Gly Val Val Ala Ala Ile Ile Pro
 100 105 110
 Val Thr Asn Pro Thr Ser Thr Thr Ile Phe Lys Ser Leu Ile Ser Leu
 115 120 125
 Lys Thr Arg Asn Gly Ile Phe Phe Ser Pro His Pro Arg Ala Lys Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ile Leu Ala Ala Lys Thr Ile Leu Asp Ala Ala Val Lys Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Pro Glu Asn Ile Ile Gly Trp Ile Asp Glu Pro Ser Ile Glu
 165 170 175
 Leu Thr Gln Tyr Leu Met Gln Lys Ala Asp Ile Thr Leu Ala Thr Gly
 180 185 190
 Gly Pro Ser Leu Val Lys Ser Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro Ala Ile
 195 200 205
 Gly Val Gly Pro Gly Asn Thr Pro Val Ile Ile Asp Glu Ser Ala His
 210 215 220
 Ile Lys Met Ala Val Ser Ser Ile Ile Leu Ser Lys Thr Tyr Asp Asn
 225 230 235 240
 Gly Val Ile Cys Ala Ser Glu Gln Ser Val Ile Val Leu Lys Ser Ile
 245 250 255
 Tyr Asn Lys Val Lys Asp Glu Phe Gln Glu Arg Gly Ala Tyr Ile Ile
 260 265 270
 Lys Lys Asn Glu Leu Asp Lys Val Arg Glu Val Ile Phe Lys Asp Gly
 275 280 285
 Ser Val Asn Pro Lys Ile Val Gly Gln Ser Ala Tyr Thr Ile Ala Ala
 290 295 300
 Met Ala Gly Ile Lys Val Pro Lys Thr Thr Arg Ile Leu Ile Gly Glu
 305 310 315 320
 Val Thr Ser Leu Gly Glu Glu Glu Pro Phe Ala His Glu Lys Leu Ser
 325 330 335
 Pro Val Leu Ala Met Tyr Glu Ala Asp Asn Phe Asp Asp Ala Leu Lys

| | | |
|---|-----|-----|
| 340 | 345 | 350 |
| Lys Ala Val Thr Leu Ile Asn Leu Gly Gly Leu Gly His Thr Ser Gly | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Ile Tyr Ala Asp Glu Ile Lys Ala Arg Asp Lys Ile Asp Arg Phe Ser | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Ser Ala Met Lys Thr Val Arg Thr Phe Val Asn Ile Pro Thr Ser Gln | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Gly Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Arg Ile Pro Pro Ser Phe Thr | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Gly Cys Gly Phe Trp Gly Gly Asn Ser Val Ser Glu Asn Val Gly | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Pro Lys His Leu Leu Asn Ile Lys Thr Val Ala Glu Arg Arg Glu Asn | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Met Leu Trp Phe Arg Val Pro His Lys Val Tyr Phe Lys Phe Gly Cys | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Leu Gln Phe Ala Leu Lys Asp Leu Lys Asp Leu Lys Lys Lys Arg Ala | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Phe Ile Val Thr Asp Ser Asp Pro Tyr Asn Leu Asn Tyr Val Asp Ser | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Ile Ile Lys Ile Leu Glu His Leu Asp Ile Asp Phe Lys Val Phe Asn | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Lys Val Gly Arg Glu Ala Asp Leu Lys Thr Ile Lys Lys Ala Thr Glu | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Glu Met Ser Ser Phe Met Pro Asp Thr Ile Ile Ala Leu Gly Gly Thr | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Pro Glu Met Ser Ser Ala Lys Leu Met Trp Val Leu Tyr Glu His Pro | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Glu Val Lys Phe Glu Asp Leu Ala Ile Lys Phe Met Asp Ile Arg Lys | | |
| 565 | 570 | 575 |
| Arg Ile Tyr Thr Phe Pro Lys Leu Gly Lys Lys Ala Met Leu Val Ala | | |
| 580 | 585 | 590 |
| Ile Thr Thr Ser Ala Gly Ser Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe Ala Leu | | |
| 595 | 600 | 605 |

Val Thr Asp Asn Asn Thr Gly Asn Lys Tyr Met Leu Ala Asp Tyr Glu
610 615 620

Met Thr Pro Asn Met Ala Ile Val Asp Ala Glu Leu Met Met Lys Met
625 630 635 640

Pro Lys Gly Leu Thr Ala Tyr Ser Gly Ile Asp Ala Leu Val Asn Ser
645 650 655

Ile Glu Ala Tyr Thr Ser Val Tyr Ala Ser Glu Tyr Thr Asn Gly Leu
660 665 670

Ala Leu Glu Ala Ile Arg Leu Ile Phe Lys Tyr Leu Pro Glu Ala Tyr
675 680 685

Lys Asn Gly Arg Thr Asn Glu Lys Ala Arg Glu Lys Met Ala His Ala
690 695 700

Ser Thr Met Ala Gly Met Ala Ser Ala Asn Ala Phe Leu Gly Leu Cys
705 710 715 720

His Ser Met Ala Ile Lys Leu Ser Ser Glu His Asn Ile Pro Ser Gly
725 730 735

Ile Ala Asn Ala Leu Leu Ile Glu Glu Val Ile Lys Phe Asn Ala Val
740 745 750

Asp Asn Pro Val Lys Gln Ala Pro Cys Pro Gln Tyr Lys Tyr Pro Asn
755 760 765

Thr Ile Phe Arg Tyr Ala Arg Ile Ala Asp Tyr Ile Lys Leu Gly Gly
770 775 780

Asn Thr Asp Glu Glu Lys Val Asp Leu Leu Ile Asn Lys Ile His Glu
785 790 795 800

Leu Lys Lys Ala Leu Asn Ile Pro Thr Ser Ile Lys Asp Ala Gly Val
805 810 815

Leu Glu Glu Asn Phe Tyr Ser Ser Leu Asp Arg Ile Ser Glu Leu Ala
820 825 830

Leu Asp Asp Gln Cys Thr Gly Ala Asn Pro Arg Phe Pro Leu Thr Ser
835 840 845

Glu Ile Lys Glu Met Tyr Ile Asn Cys Phe Lys Lys Gln Pro
850 855 860

<210> 154
<211> 1164
<212> DNA
<213> Escherichia coli

5

<400> 154


```

atgaacaact ttaatctgca caccccaacc cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgct    60
ggtttacgcg aacaaattcc tcacgatgct cgcgtattga ttacctacgg cggcggcagc    120
gtgaaaaaaaa cggcggttct cgatcaagtt ctggatgccc tgaaaggcat ggacgtgctg    180
gaatttgggc gtattgagcc aaacccggct tatgaaacgc tgatgaacgc cgtgaaactg    240
gttcgcgaac agaaagtgac tttcctgctg gcggttggcg gcggttctgt actggacggc    300
accaaattta tcgccgcagc ggctaactat ccggaaaata tcgatccgtg gcacattctg    360
caaacgggcg gtaaagagat taaaagcgcc atcccgatgg gctgtgtgct gacgctgcca    420
gcaaccgggt cagaatccaa cgcaggcgcg gtgatctccc gtaaaaccac aggcgacaag    480
caggcggtcc attctgcccc tgttcagccg gtatttgccg tgctcgatcc ggtttatacc    540
tacaccctgc cgccgcgtca ggtggctaac ggcgtagtgg acgcctttgt acacaccgtg    600
gaacagtatg ttaccaaacc ggttgatgcc aaaattcagg accgtttcgc agaaggcatt    660
ttgctgacgc taatcgaaga tggtcgaaa gccctgaaag agccagaaaa ctacgatgtg    720
cgcgccaacg tcatgtgggc ggcgactcag gcgctgaacg gtttgattgg cgctggcgta    780
ccgcaggact gggcaacgca tatgtgggc cacgaactga ctgcgatgca cggctctggat    840
cacgcgcaaa cactggctat cgtcctgcct gcaactgtga atgaaaaacg cgataccaag    900
cgcgctaagc tgctgcaata tgctgaacgc gtctggaaca tcaactgaagg ttccgatgat    960
gagcgtattg acgccgcgat tggcgcaacc cgcaatttct ttgagcaatt aggcgtgccg   1020
accacctct ccgactacgg tctggacggc agctccatcc cggctttgct gaaaaaactg   1080
gaagagcacg gcatgaccca actgggcgaa aatcatgaca ttacgttgga tgtcagccgc   1140
cgtatatacg aagccgcccc ctaa                                     1164

```

<210> 155

<211> 387

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 155

Met Asn Asn Phe Asn Leu His Thr Pro Thr Arg Ile Leu Phe Gly Lys
1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Gly Leu Arg Glu Gln Ile Pro His Asp Ala Arg Val
20 25 30

Leu Ile Thr Tyr Gly Gly Gly Ser Val Lys Lys Thr Gly Val Leu Asp
35 40 45

Gln Val Leu Asp Ala Leu Lys Gly Met Asp Val Leu Glu Phe Gly Gly
50 55 60

Ile Glu Pro Asn Pro Ala Tyr Glu Thr Leu Met Asn Ala Val Lys Leu
65 70 75 80

Val Arg Glu Gln Lys Val Thr Phe Leu Leu Ala Val Gly Gly Gly Ser
85 90 95

Val Leu Asp Gly Thr Lys Phe Ile Ala Ala Ala Ala Asn Tyr Pro Glu
100 105 110

Asn Ile Asp Pro Trp His Ile Leu Gln Thr Gly Gly Lys Glu Ile Lys
115 120 125

Ser Ala Ile Pro Met Gly Cys Val Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser
130 135 140

Glu Ser Asn Ala Gly Ala Val Ile Ser Arg Lys Thr Thr Gly Asp Lys
145 150 155 160

Gln Ala Phe His Ser Ala His Val Gln Pro Val Phe Ala Val Leu Asp
165 170 175

Pro Val Tyr Thr Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Gln Val Ala Asn Gly Val
180 185 190

Val Asp Ala Phe Val His Thr Val Glu Gln Tyr Val Thr Lys Pro Val
195 200 205

Asp Ala Lys Ile Gln Asp Arg Phe Ala Glu Gly Ile Leu Leu Thr Leu
210 215 220

Ile Glu Asp Gly Pro Lys Ala Leu Lys Glu Pro Glu Asn Tyr Asp Val
225 230 235 240

Arg Ala Asn Val Met Trp Ala Ala Thr Gln Ala Leu Asn Gly Leu Ile
245 250 255

Gly Ala Gly Val Pro Gln Asp Trp Ala Thr His Met Leu Gly His Glu
260 265 270

Leu Thr Ala Met His Gly Leu Asp His Ala Gln Thr Leu Ala Ile Val
275 280 285

Leu Pro Ala Leu Trp Asn Glu Lys Arg Asp Thr Lys Arg Ala Lys Leu
290 295 300

Leu Gln Tyr Ala Glu Arg Val Trp Asn Ile Thr Glu Gly Ser Asp Asp
305 310 315 320

Glu Arg Ile Asp Ala Ala Ile Ala Ala Thr Arg Asn Phe Phe Glu Gln
325 330 335

Leu Gly Val Pro Thr His Leu Ser Asp Tyr Gly Leu Asp Gly Ser Ser
340 345 350

Ile Pro Ala Leu Leu Lys Lys Leu Glu Glu His Gly Met Thr Gln Leu
355 360 365

Gly Glu Asn His Asp Ile Thr Leu Asp Val Ser Arg Arg Ile Tyr Glu
370 375 380

Ala Ala Arg
385

<210> 156

<211> 3883

<212> DNA

5 <213> Escherichia coli

<400> 156

```
ctatatgtct gaaggtacag gcgtttccat aactatttgc tcgcgttttt tactcaagaa    60
gaaaatgcca aatagcaaca tcaggcagac aatacccgaa attgcgaaga aaactgtctg    120
gtagcctgcg tgggtcaaaga gtatcccagt cggcgttgaa agcagcacia tccaagcga    180
actggcaatt tgaaaaccaa tcagaaagat cgtcgacgac aggcgcttat caaagtttgc    240
cacgctgtat ttgaagacgg atatgacaca aagtggaacc tcaatggcat gtaacaactt    300
cactaatgaa ataatccagg ggtaacgaa cagcgcgcag gaaaggatac gcaacgcat    360
aatcacaact ccgataagta atgcattttt tggccctacc cgattcacia agaaaggaat    420
aatcgccatg cacagcgctt cgagtaccac ctggaatgag ttgagataac catacaggcg    480
cgttcctaca tcgtgtgatt cgaataaacc tgaataaaag acaggaaaaa gttgttgatc    540
aaaaatgtta tagaaagacc acgtccccac aataaatatg acgaaaaccg agaagtttcg    600
atccttgaaa actgcgataa aatcctcttt ttttaccctt cccgcatctg ccgctacgca    660
ctggtgatcc ttatctttta aacgcatggt gatcatcata aatacagcgc caaatagcga    720
gaccaaccag aagttgatat ggggactgat actaaaaaat atgccggcaa agaacgcgcc    780
aatagcatag ccaaaagatc ccagggcgcg cgctgttcca tattcgaaat gaaaatttcg    840
cgccattttt tcggtgaagc tatcaagcaa accgcatccc gccagatacc ccaagccaaa    900
aaatagcgcc ccagaatta gacctacaga aaaattgctt tgcagtaacg gttcataaac    960
gtaaatcata aacggtccgg tcaagaccag gatgaaactc atacaccaga tgagcgggtt   1020
cttcagaccg agtttatcct gaacgatgcc gtagaacatc ataaatagaa tgctggtaaa   1080
ctggttgacc gaataaagtg tacctaattc cgtccctgtc aaccctagat gtcctttcag   1140
ccaaatagcg tataacgacc accacagcga ccaggaaata aaaaagagaa atgagtaact   1200
ggatgcaaaa cgatagtacg ctttctgaa tggaaatatt agtgccataa ttacctgcct   1260
gtcgttaaaa aattcacgct ctatttagag ataagagcga cttcgccggt tactttcac   1320
```

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| tattccagtt | cttgtcgaca | tggcagcgct | gtcattgccc | ctttcgccgt | tactgcaagc | 1380 |
| gctccgcaac | gttgagcgag | atcgataatt | cgtcgcattt | ctctctcatc | tgtagataat | 1440 |
| cccgtagagg | acagacctgt | gagtaacccg | gcaacgaacg | catctcccg | ccccgtgcta | 1500 |
| tcgacacaat | tcacagacat | tccagcaaaa | tggatgaactt | gtcctcgata | acagaccacc | 1560 |
| acccttctg | cacctttagt | caccaacagc | atggcgatct | catactcttt | tgccagggcg | 1620 |
| catatatcct | gatcgttctg | tgtttttcca | ctgataagtc | gccattcttc | ttccgagagc | 1680 |
| ttgacgacat | ccgccagttg | tagcgcctgc | cgcaaacaca | agcggagcaa | atgctcgtct | 1740 |
| tgccatagat | cttcacgaat | attaggatcg | aagctgacaa | aacctccggc | atgccggatc | 1800 |
| gccgtcatcg | cagtaaatgc | gctggtacgc | gaaggctcgg | cagacaacgc | aattgaacag | 1860 |
| agatgtaacc | attcgccatg | tcgccagcag | ggcaagtctg | tcgtctctaa | aaaaagatcg | 1920 |
| gcactggggc | ggaccataaa | cgtaaatgaa | cgttccccct | gatcgttcag | atcgacaagc | 1980 |
| accgtggatg | tccggtgcc | ttcatcttgc | ttcagatacg | tgatatcgac | tccctcagtt | 2040 |
| agcagcgttc | tttgatttaa | cgcacaaaa | ggatcatccc | ccaccgacc | tataaaccca | 2100 |
| cttgttccgc | ctaactctggc | gattcccacc | gcaacgtag | ctggcgcgcc | gccaggacaa | 2160 |
| ggcagtaggc | gcccgtctga | ttctggcaag | agatctacga | ccgcatcccc | taaaaccat | 2220 |
| actttggctg | acattttttt | cccttaaatt | catctgagtt | acgcatagtg | ataaacctct | 2280 |
| ttttcgaaa | atcgatcatg | atttactaaa | acatgcatat | tcgatcacia | aacgtcatag | 2340 |
| ttaacgttaa | catttgtgat | attcatcgca | tttatgaaag | taagggactt | tatttttata | 2400 |
| aaagttaacg | ttacaatttc | accaaatttg | cttaaccagg | atgattaaaa | tgacgcaatc | 2460 |
| tcgattgcat | gcggcgcaaa | acgccctagc | aaaacttcat | gagcaccggg | gtaacacttt | 2520 |
| ctatccccat | tttccctcgc | cgccctcctg | cggttggtg | aacgatccaa | acggcctgat | 2580 |
| ctggtttaac | gatcgttatc | acgcgtttta | tcaacatcat | ccgatgagcg | aacactgggg | 2640 |
| gccaatgcac | tggggacatg | ccaccagcga | cgatatgatc | cactggcagc | atgagcctat | 2700 |
| tgcgctagcg | ccaggagacg | ataatgacaa | agacgggtgt | ttttcaggta | gtgctgtcga | 2760 |
| tgacaatggt | gtcctctcac | ttatctacac | cggacacgtc | tggctcgatg | gtgcaggtaa | 2820 |
| tgacgatgca | attcggaag | tacaatgtct | ggctaccagt | cgggatggta | ttcatttcga | 2880 |
| gaaacagggg | gtgatcctca | ctccaccaga | aggaatcatg | cacttccgcg | atcctaaagt | 2940 |
| gtggcgtgaa | gccgacacat | ggtggatggt | agtcggggcg | aaagatccag | gcaacacggg | 3000 |
| gcagatcctg | ctttatcgcg | gcagttcgtt | gcgtgaatgg | accttcgatc | gcgtactggc | 3060 |
| ccacgctgat | gcgggtgaaa | gctatatgtg | ggaatgtccg | gactttttca | gccttggcga | 3120 |
| tcagcattat | ctgatgtttt | ccccgcaggg | aatgaatgcc | gagggatata | gttaccgaaa | 3180 |
| tcgctttcaa | agtggcgtaa | taccgggaat | gtggtcgcca | ggacgacttt | ttgcacaatc | 3240 |
| cgggcatttt | actgaacttg | ataacgggca | tgacttttat | gcaccacaaa | gctttttagc | 3300 |
| gaaggatggt | cggcgatttg | ttatcggctg | gatggatatg | tgggaatcgc | caatgccctc | 3360 |

aaaacgtgaa ggatgggcag gctgcatgac gctggcgcgc gagctatcag agagcaatgg 3420
 caaacttcta caacgcccgg tacacgaagc tgagtcgtta cgccagcagc atcaatctgt 3480
 ctctccccgc acaatcagca ataaatatgt tttgcaggaa aacgcgcaag cagttgagat 3540
 tcagttgcag tgggcgctga agaacagtga tgccgaacat tacggattac agctcggcac 3600
 tggaatgcgg ctgtatatgt ataaccaatc tgagcgactt gttttgtggc ggtattaccc 3660
 acacgagaat ttagacggct accgtagtat tcccctcccg cagcgtgaca cgctcgcctt 3720
 aaggatattt atcgatacat catccgtgga agtatttatt aacgacgggg aagcgggtgat 3780
 gagtagtcga atctatccgc agccagaaga acgggaactg tcgctttatg cctcccacgg 3840
 agtggctgtg ctgcaacatg gagcactctg gctactgggt taa 3883

<210> 157

<211> 477

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 157

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

Asp Pro Lys Val Trp Arg Glu Ala Asp Thr Trp Trp Met Val Val Gly
 165 170 175
 Ala Lys Asp Pro Gly Asn Thr Gly Gln Ile Leu Leu Tyr Arg Gly Ser
 180 185 190
 Ser Leu Arg Glu Trp Thr Phe Asp Arg Val Leu Ala His Ala Asp Ala
 195 200 205
 Gly Glu Ser Tyr Met Trp Glu Cys Pro Asp Phe Phe Ser Leu Gly Asp
 210 215 220
 Gln His Tyr Leu Met Phe Ser Pro Gln Gly Met Asn Ala Glu Gly Tyr
 225 230 235 240
 Ser Tyr Arg Asn Arg Phe Gln Ser Gly Val Ile Pro Gly Met Trp Ser
 245 250 255
 Pro Gly Arg Leu Phe Ala Gln Ser Gly His Phe Thr Glu Leu Asp Asn
 260 265 270
 Gly His Asp Phe Tyr Ala Pro Gln Ser Phe Leu Ala Lys Asp Gly Arg
 275 280 285
 Arg Ile Val Ile Gly Trp Met Asp Met Trp Glu Ser Pro Met Pro Ser
 290 295 300
 Lys Arg Glu Gly Trp Ala Gly Cys Met Thr Leu Ala Arg Glu Leu Ser
 305 310 315 320
 Glu Ser Asn Gly Lys Leu Leu Gln Arg Pro Val His Glu Ala Glu Ser
 325 330 335
 Leu Arg Gln Gln His Gln Ser Val Ser Pro Arg Thr Ile Ser Asn Lys
 340 345 350
 Tyr Val Leu Gln Glu Asn Ala Gln Ala Val Glu Ile Gln Leu Gln Trp
 355 360 365
 Ala Leu Lys Asn Ser Asp Ala Glu His Tyr Gly Leu Gln Leu Gly Thr
 370 375 380
 Gly Met Arg Leu Tyr Ile Asp Asn Gln Ser Glu Arg Leu Val Leu Trp
 385 390 395 400
 Arg Tyr Tyr Pro His Glu Asn Leu Asp Gly Tyr Arg Ser Ile Pro Leu
 405 410 415
 Pro Gln Arg Asp Thr Leu Ala Leu Arg Ile Phe Ile Asp Thr Ser Ser
 420 425 430

Val Glu Val Phe Ile Asn Asp Gly Glu Ala Val Met Ser Ser Arg Ile
435 440 445

Tyr Pro Gln Pro Glu Glu Arg Gly Leu Ser Leu Tyr Ala Ser His Gly
450 455 460

Val Ala Val Leu Gln His Gly Ala Leu Trp Leu Leu Gly
465 470 475

<210> 158

<211> 304

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 158

Met Ser Ala Lys Val Trp Val Leu Gly Asp Ala Val Val Asp Leu Leu
1 5 10 15

Pro Glu Ser Asp Gly Arg Leu Leu Pro Cys Pro Gly Gly Ala Pro Ala
20 25 30

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

Gly Arg Val Gly Asp Asp Pro Phe Gly Ala Leu Met Gln Arg Thr Leu
50 55 60

Leu Thr Glu Gly Val Asp Ile Thr Tyr Leu Lys Gln Asp Glu Trp His
65 70 75 80

Arg Thr Ser Thr Val Leu Val Asp Leu Asn Asp Gln Gly Glu Arg Ser
85 90 95

Phe Thr Phe Met Val Arg Pro Ser Ala Asp Leu Phe Leu Glu Thr Thr
100 105 110

Asp Leu Pro Cys Trp Arg His Gly Glu Trp Leu His Leu Cys Ser Ile
115 120 125

Ala Leu Ser Ala Glu Pro Ser Arg Thr Ser Ala Phe Thr Ala Met Thr
130 135 140

Ala Ile Arg His Ala Gly Gly Phe Val Ser Phe Asp Pro Asn Ile Arg
145 150 155 160

Glu Asp Leu Trp Gln Asp Glu His Leu Leu Arg Leu Cys Leu Arg Gln
165 170 175

Ala Leu Gln Leu Ala Asp Val Val Lys Leu Ser Glu Glu Glu Trp Arg
180 185 190

Leu Ile Ser Gly Lys Thr Gln Asn Asp Gln Asp Ile Cys Ala Leu Ala
 195 200 205
 Lys Glu Tyr Glu Ile Ala Met Leu Leu Val Thr Lys Gly Ala Glu Gly
 210 215 220
 Val Val Val Cys Tyr Arg Gly Gln Val His His Phe Ala Gly Met Ser
 225 230 235 240
 Val Asn Cys Val Asp Ser Thr Gly Ala Gly Asp Ala Phe Val Ala Gly
 245 250 255
 Leu Leu Thr Gly Leu Ser Ser Thr Gly Leu Ser Thr Asp Glu Arg Glu
 260 265 270
 Met Arg Arg Ile Ile Asp Leu Ala Gln Arg Cys Gly Ala Leu Ala Val
 275 280 285
 Thr Ala Lys Gly Ala Met Thr Ala Leu Pro Cys Arg Gln Glu Leu Glu
 290 295 300
 <210> 159
 <211> 415
 <212> PRT
 5 <213> Escherichia coli
 <400> 159
 Met Ala Leu Asn Ile Pro Phe Arg Asn Ala Tyr Tyr Arg Phe Ala Ser
 1 5 10 15
 Ser Tyr Ser Phe Leu Phe Phe Ile Ser Trp Ser Leu Trp Trp Ser Leu
 20 25 30
 Tyr Ala Ile Trp Leu Lys Gly His Leu Gly Leu Thr Gly Thr Glu Leu
 35 40 45
 Gly Thr Leu Tyr Ser Val Asn Gln Phe Thr Ser Ile Leu Phe Met Met
 50 55 60
 Phe Tyr Gly Ile Val Gln Asp Lys Leu Gly Leu Lys Lys Pro Leu Ile
 65 70 75 80
 Trp Cys Met Ser Phe Ile Leu Val Leu Thr Gly Pro Phe Met Ile Tyr
 85 90 95
 Val Tyr Glu Pro Leu Leu Gln Ser Asn Phe Ser Val Gly Leu Ile Leu
 100 105 110
 Gly Ala Leu Phe Phe Gly Leu Gly Tyr Leu Ala Gly Cys Gly Leu Leu
 115 120 125

Asp Ser Phe Thr Glu Lys Met Ala Arg Asn Phe His Phe Glu Tyr Gly
 130 135 140
 Thr Ala Arg Ala Trp Gly Ser Phe Gly Tyr Ala Ile Gly Ala Phe Phe
 145 150 155 160
 Ala Gly Ile Phe Phe Ser Ile Ser Pro His Ile Asn Phe Trp Leu Val
 165 170 175
 Ser Leu Phe Gly Ala Val Phe Met Met Ile Asn Met Arg Phe Lys Asp
 180 185 190
 Lys Asp His Gln Cys Val Ala Ala Asp Ala Gly Gly Val Lys Lys Glu
 195 200 205
 Asp Phe Ile Ala Val Phe Lys Asp Arg Asn Phe Trp Val Phe Val Ile
 210 215 220
 Phe Ile Val Gly Thr Trp Ser Phe Tyr Asn Ile Phe Asp Gln Gln Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Val Phe Tyr Ser Gly Leu Phe Glu Ser His Asp Val Gly Thr
 245 250 255
 Arg Leu Tyr Gly Tyr Leu Asn Ser Phe Gln Val Val Leu Glu Ala Leu
 260 265 270
 Cys Met Ala Ile Ile Pro Phe Phe Val Asn Arg Val Gly Pro Lys Asn
 275 280 285
 Ala Leu Leu Ile Gly Val Val Ile Met Ala Leu Arg Ile Leu Ser Cys
 290 295 300
 Ala Leu Phe Val Asn Pro Trp Ile Ile Ser Leu Val Lys Leu Leu His
 305 310 315 320
 Ala Ile Glu Val Pro Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Lys Tyr Ser Val
 325 330 335
 Ala Asn Phe Asp Lys Arg Leu Ser Ser Thr Ile Phe Leu Ile Gly Phe
 340 345 350
 Gln Ile Ala Ser Ser Leu Gly Ile Val Leu Leu Ser Thr Pro Thr Gly
 355 360 365
 Ile Leu Phe Asp His Ala Gly Tyr Gln Thr Val Phe Phe Ala Ile Ser
 370 375 380
 Gly Ile Val Cys Leu Met Leu Leu Phe Gly Ile Phe Phe Leu Ser Lys
 385 390 395 400
 Lys Arg Glu Gln Ile Val Met Glu Thr Pro Val Pro Ser Ala Ile
 405 410 415

<210> 160
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

| | | | | |
|----|-------|---|----|--|
| | <220> | | | |
| | <223> | Cebador Scr1 | | |
| | <400> | 160 | | |
| | | cctttcttg tgaatcgg | 18 | |
| 5 | <210> | 161 | | |
| | <211> | 18 | | |
| | <212> | DNA | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | |
| | <220> | | | |
| 10 | <223> | Cebador Scr2 | | |
| | <400> | 161 | | |
| | | agaacacagg tgatgcc | 18 | |
| | <210> | 162 | | |
| | <211> | 20 | | |
| 15 | <212> | DNA | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | |
| | <220> | | | |
| | <223> | Cebador Scr3 | | |
| | <400> | 162 | | |
| 20 | | agtgatcatc acctgtgcc | 20 | |
| | <210> | 163 | | |
| | <211> | 20 | | |
| | <212> | DNA | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | |
| 25 | <220> | | | |
| | <223> | Cebador Scr4 | | |
| | <400> | 163 | | |
| | | agcacggcga ggtcgacgg | 20 | |
| | <210> | 164 | | |
| 30 | <211> | 74 | | |
| | <212> | DNA | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | |
| | <220> | | | |
| | <223> | Cebador OT731 | | |
| 35 | <400> | 164 | | |
| | | aaagctggag ctccaccgcg gtggcggccg ctctagaagt tttcaaagca gagtttcggt | 60 | |
| | | tgaatatattt acca | 74 | |
| | <210> | 165 | | |
| | <211> | 50 | | |
| | <212> | DNA | | |
| 40 | <213> | Secuencia artificial | | |
| | <220> | | | |
| | <223> | Cebador OT732 | | |
| | <400> | 165 | | |
| | | ttcaatatgc atgctcaga acgtttacat tgatcgact gccagaacct | 50 | |
| 45 | <210> | 166 | | |
| | <211> | 79 | | |
| | <212> | DNA | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | |

<220>
 <223> Cebador OT733
 <400> 166
 gcagtcgata caatgtaaac gttctgaggc atgcatattg aattttcaaa aattcttact 60
 ttttttttgg atggacgca 79

5 <210> 167
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Cebador OT734
 <400> 167
 acctgcacct ataacacata ctttttccat ggtagttttt tctccttgac gttaaagtat 60
 agaggtatat ta 72

<210> 168
 <211> 60
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador OT735
 <400> 168
 20 aaaaactacc atgaaaaagg tatgtgttat aggtgcaggt actatgggtt caggaattgc 60

<210> 169
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Cebador OT736
 <400> 169
 gtataaaaaa gaaggccgta taggccttat tttgaataat cgtagaaacc ttttctgat 60
 tttcttccaa g 71

<210> 170
 30 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador OT737

<400> 170
 35 acgattattc aaaataaggc ctatacggcc ttcttttttt tactttgttc agaacaactt 60
 ctcatTTTTT tctactcata a 81

<210> 171
 <211> 73
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador OT738

| | | | | |
|----|-------|--|----|--|
| | <400> | 171 | | |
| | | gaattgggta cggggccccc cctcgagggtc gaccgatgcc tcataaactt cggtagttat | 60 | |
| | | attactctga gat | 73 | |
| | <210> | 172 | | |
| | <211> | 65 | | |
| 5 | <212> | DNA | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | |
| | <220> | | | |
| | <223> | Cebador OT797 | | |
| | <400> | 172 | | |
| | | aaagtaagaa tttttgaaaa ttcaatatgc atgcaagaag ttgtaatagc tagtgcagta | 60 | |
| 10 | | agaac | 65 | |
| | <210> | 173 | | |
| | <211> | 73 | | |
| | <212> | DNA | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | |
| 15 | <220> | | | |
| | <223> | Cebador OT798 | | |
| | <400> | 173 | | |
| | | gaaaaagatc atgagaaaat cgcagaacgt aaggcgcgcc tcagcacttt tctagcaata | 60 | |
| | | ttgctgttcc ttg | 73 | |
| | <210> | 174 | | |
| 20 | <211> | 41 | | |
| | <212> | DNA | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | |
| | <220> | | | |
| | <223> | Cebador OT806 | | |
| 25 | <400> | 174 | | |
| | | ctcgaaaata gggcgcgccc cattaccga cattggggcg c | 41 | |
| | <210> | 175 | | |
| | <211> | 55 | | |
| | <212> | DNA | | |
| 30 | <213> | Secuencia artificial | | |
| | <220> | | | |
| | <223> | Cebador OT807 | | |
| | <400> | 175 | | |
| | | actgcactag ctattacaac ttctgcatg cgtgatgatt gattgattga ttgta | 55 | |
| 35 | <210> | 176 | | |
| | <211> | 55 | | |
| | <212> | DNA | | |
| | <213> | Secuencia artificial | | |
| | <220> | | | |
| 40 | <223> | Cebador OT808 | | |
| | <400> | 176 | | |
| | | actgcactag ctattacaac ttctgcatg cgtgatgatt gattgattga ttgta | 55 | |
| | <210> | 177 | | |
| | <211> | 60 | | |
| 45 | <212> | DNA | | |

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador OT809

<400> 177

5 ttcgaataa acacacataa acaaacaccc catggaaaag gtatgtgta taggtgcagg 60

<210> 178

<211> 62

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador OT799

<400> 178

taccgggccc cccctcgagg tgcacggcgc gccactggta gagagcgact ttgtatgccc 60

ca 62

<210> 179

15 <211> 60

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador OT761

20 <400> 179

cttggccttc actagcatgc tgaatatgta ttacttggtt atggttatat atgacaaaag 60

<210> 180

<211> 68

<212> DNA

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador OT803

<400> 180

ccctcactaa agggaacaaa agctggagct cgatatcggc gcgccacat gcagtgatgc 60

acgcgcga 68

30 <210> 181

<211> 49

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador OT804

<400> 181

aaggatgaca ttgttagtt ccatggtgt aatatgtgtg ttgtttgg 49

<210> 182

<211> 51

40 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador OT785

<400> 182

45 cacacatatt acaacatgg aactaaacaa tgcatcctt gaaaaggaag g 51

<210> 183
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador OT786

<400> 183

atcattcatt ggccattcag gccttatcta tttttgaagc cttcaatttt tcttttctct 60
atg 63

10 <210> 184
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador OT787

15 <400> 184

caaaaataga taaggcctga atggccaatg aatgatttga tgatttcttt ttccctccat 60
ttttc 65

20 <210> 185
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador PT805

<400> 185

gaattgggta ccgggcccc cctcgaggtc gacttatagt attatatattt ctgatttggt 60
tatagcaagc agcgttt 77

25 <210> 186
 <211> 1269
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Gen TER optimizado en cuanto a codones

<400> 186

```

actagtacca taaccaagta atacatattc agcatgctag tgaaggccaa gttcgtcaag      60
ggctttatta gagatgttca tccgtatggg tgtaggagag aagtgttaaa ccagattgac      120
tactgcaaga aagcaattgg ctttaggggc cctaaaaagg ttcttattgt aggtgcttct      180
tcaggcttcg gactagctac tagaatatct gttgcattcg gagggcctga agcccataca      240
atcgggtgtt catacgagac tggagctaca gacagaagga taggtacggc tgggtggtac      300
aataatatct tctttaaaga attcgctaag aagaaagggt tgggtggcaa gaatttcata      360
gaagatgcat ttctgaatga aaccaaggat aaagtataaa agtatataaa ggacgaattt      420
ggtaaaattg atttattcgt atattcttta gctgctccta gaagaaagga ctacaaaacc      480
ggtaatgttt atacctcaag aattaaaaca attctaggtg actttgaagg gcctactatt      540
gacgtagaaa gagatgaaat aactttaaag aaggatatct ctgctagtat cgaggaaatc      600
gaagaaacac gtaaagtaat gggcggagaa gactggcagg agtgggtgtga ggagttatta      660
tacgaagatt gtttttctga taaagctaca accatcgctt attcctatat tggcagtcct      720
agaacttata aaatatatcg tgaaggaacc attgggattg ctaagaagga tttagaagac      780
aaagccaagt tgatcaacga aaagcttaat agagtcatag gaggtagggc atttgtgtct      840
gttaacaaaag ctttagtaac caaggcatct gcttatattc caaccttccc tctatacgct      900
gccatattat ataaagtaat gaaagaaaag aacattcacg aaaattgtat tatgcaaatt      960
gagcgtatgt tctcagagaa aatatactcc aacgaaaaga ttcagttcga tgataagggc     1020
cgtcttagaa tggacgattt agaactaaga aaggatgttc aggatgaagt tgacagaatt     1080
tggcttaaca taacaccaga aaacttcaag gagcttagtg actacaaggg gtataagaaa     1140
gagtttatga atctaaatgg ttttgattta gatggagttg attattccaa ggatcttgat     1200
attgaattac ttagaaaact agagccttaa gcggccgcgt taattcaaatt taattgatat     1260
agtactagt                                     1269

```

<210> 187

<211> 398

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína Ter modificada

<400> 187

ES 2 446 520 T3

Met Leu Val Lys Ala Lys Phe Val Lys Gly Phe Ile Arg Asp Val His
1 5 10 15

Pro Tyr Gly Cys Arg Arg Glu Val Leu Asn Gln Ile Asp Tyr Cys Lys
20 25 30

Lys Ala Ile Gly Phe Arg Gly Pro Lys Lys Val Leu Ile Val Gly Ala
35 40 45

Ser Ser Gly Phe Gly Leu Ala Thr Arg Ile Ser Val Ala Phe Gly Gly
50 55 60

Pro Glu Ala His Thr Ile Gly Val Ser Tyr Glu Thr Gly Ala Thr Asp
65 70 75 80

Arg Arg Ile Gly Thr Ala Gly Trp Tyr Asn Asn Ile Phe Phe Lys Glu
85 90 95

Phe Ala Lys Lys Lys Gly Leu Val Ala Lys Asn Phe Ile Glu Asp Ala
100 105 110

Phe Ser Asn Glu Thr Lys Asp Lys Val Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Glu
115 120 125

Phe Gly Lys Ile Asp Leu Phe Val Tyr Ser Leu Ala Ala Pro Arg Arg
130 135 140

Lys Asp Tyr Lys Thr Gly Asn Val Tyr Thr Ser Arg Ile Lys Thr Ile
145 150 155 160

Leu Gly Asp Phe Glu Gly Pro Thr Ile Asp Val Glu Arg Asp Glu Ile
165 170 175

Thr Leu Lys Lys Val Ser Ser Ala Ser Ile Glu Glu Ile Glu Glu Thr
180 185 190

Arg Lys Val Met Gly Gly Glu Asp Trp Gln Glu Trp Cys Glu Glu Leu
195 200 205

Leu Tyr Glu Asp Cys Phe Ser Asp Lys Ala Thr Thr Ile Ala Tyr Ser
210 215 220

Tyr Ile Gly Ser Pro Arg Thr Tyr Lys Ile Tyr Arg Glu Gly Thr Ile
225 230 235 240

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

245 250 255

Lys Leu Asn Arg Val Ile Gly Gly Arg Ala Phe Val Ser Val Asn Lys
260 265 270

Ala Leu Val Thr Lys Ala Ser Ala Tyr Ile Pro Thr Phe Pro Leu Tyr
275 280 285

Ala Ala Ile Leu Tyr Lys Val Met Lys Glu Lys Asn Ile His Glu Asn
290 295 300

Cys Ile Met Gln Ile Glu Arg Met Phe Ser Glu Lys Ile Tyr Ser Asn
305 310 315 320

Glu Lys Ile Gln Phe Asp Asp Lys Gly Arg Leu Arg Met Asp Asp Leu
325 330 335

Glu Leu Arg Lys Asp Val Gln Asp Glu Val Asp Arg Ile Trp Ser Asn
340 345 350

Ile Thr Pro Glu Asn Phe Lys Glu Leu Ser Asp Tyr Lys Gly Tyr Lys
355 360 365

Lys Glu Phe Met Asn Leu Asn Gly Phe Asp Leu Asp Gly Val Asp Tyr
370 375 380

Ser Lys Asp Leu Asp Ile Glu Leu Leu Arg Lys Leu Glu Pro
385 390 395

<210> 188

<211> 1484

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen ald optimizado en cuanto a codones

<400> 188

actagttcga ataaacacac ataaacaaac accatggata aagatacctt aatcccaacc 60

accaaagact tgaaagtga gactaatggt gaaaacatca acttaaagaa ttacaaagat 120

aactcttcat gttttggagt atttgaaaat gttgagaatg ccatttcttc tgcagtacat 180

gcacaaaaga ttctttccct acactacaca aaggaacaaa gagagaaaat aatcaccgaa 240

ataagaaaag cgcattaca gaataaagag gtcttagcca caatgatcct ggaggaaacc 300

cacatgggaa ggtatgagga taaaatcttg aaacatgaat tagtggccaa gtatacccca 360

ggcactgaag atctgacaac aacagcatgg tccggcgata atggactaac agtggttgaa 420

atgagtccat acggagtat cggcgctata actccaagca cgaatccaac agaaaccgtt 480

atctgcaatt ctataggtat gatagctgcg gggaatgcag ttgtatttaa tggtcaccca 540

tgcgccaaaa agtgtgtcgc tttcgcagta gaaatgataa acaaagccat aattagctgt 600

```

ggtggacctg aaaaccttgt cactactata aagaacccaa ctatggaaag tttagacgct 660
attatcaaac atccatccat aaaattgttg tgcggtacgg gtggcccggg tatggtaaaa 720
acccttctta attctggtaa aaaggccatc ggagctggcg cggttaatcc tccggttatt 780
gtagacgata cagcagatat cgagaaggcc ggcagaagca ttattgaagg ttgttcgttt 840
gacaacaatc ttccttgtat cgcggaaaaa gaagtgttcg tgtttgaaaa cgttgcagat 900
gatctgatct ctaacatggt gaaaaacaac gccgtcatta tcaatgaaga ccaagtatcc 960
aagctgatag acctgtttct tcaaaagaac aatgaaactc aagaatattt cattaataag 1020
aagtgggttg gtaaggacgc taaactgttt ttggatgaaa tagatgtaga gtcaccaagt 1080
aatgtaaagt gtattatttg tgaagtcaac gcaaaccatc cgttcgttat gacggagttg 1140
atgatgccaa ttttgcctat agttagagtg aaggacattg atgaagccat taaatacgcc 1200
aagatagctg agcagaatag aaaacattcc gcctacattt attctaagaa catcgataac 1260
cttaatagat tcgaacgtga aattgataca actatctttg ttaagaatgc aaagtcattt 1320
gcagggtcgc gttatgaagc tgagggtttc acaaccttta caattgccgg atccacaggt 1380
gaaggaatca cgtcagctag aaactttacc aggcaaagac gttgtgtcct agcaggttag 1440
ggcctgcagg gccgtgaatt tactttaaat cttgcattac tagt 1484

```

<210> 189
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Gen Ald modificado
 <400> 189

```

Met Asp Lys Asp Thr Leu Ile Pro Thr Thr Lys Asp Leu Lys Val Lys
1      5      10
Thr Asn Gly Glu Asn Ile Asn Leu Lys Asn Tyr Lys Asp Asn Ser Ser
20     25     30
Cys Phe Gly Val Phe Glu Asn Val Glu Asn Ala Ile Ser Ser Ala Val
35     40     45
His Ala Gln Lys Ile Leu Ser Leu His Tyr Thr Lys Glu Gln Arg Glu
50     55     60
Lys Ile Ile Thr Glu Ile Arg Lys Ala Ala Leu Gln Asn Lys Glu Val
65     70     75     80
Leu Ala Thr Met Ile Leu Glu Glu Thr His Met Gly Arg Tyr Glu Asp
85     90     95
Lys Ile Leu Lys His Glu Leu Val Ala Lys Tyr Thr Pro Gly Thr Glu

```

| 100 | 105 | 110 |
|---|-----|-------------|
| Asp Leu Thr Thr Thr Ala Trp Ser Gly Asp Asn Gly Leu Thr Val Val | 115 | 120 125 |
| Glu Met Ser Pro Tyr Gly Val Ile Gly Ala Ile Thr Pro Ser Thr Asn | 130 | 135 140 |
| Pro Thr Glu Thr Val Ile Cys Asn Ser Ile Gly Met Ile Ala Ala Gly | 145 | 150 155 160 |
| Asn Ala Val Val Phe Asn Gly His Pro Cys Ala Lys Lys Cys Val Ala | 165 | 170 175 |
| Phe Ala Val Glu Met Ile Asn Lys Ala Ile Ile Ser Cys Gly Gly Pro | 180 | 185 190 |
| Glu Asn Leu Val Thr Thr Ile Lys Asn Pro Thr Met Glu Ser Leu Asp | 195 | 200 205 |
| Ala Ile Ile Lys His Pro Ser Ile Lys Leu Leu Cys Gly Thr Gly Gly | 210 | 215 220 |
| Pro Gly Met Val Lys Thr Leu Leu Asn Ser Gly Lys Lys Ala Ile Gly | 225 | 230 235 240 |
| Ala Gly Ala Gly Asn Pro Pro Val Ile Val Asp Asp Thr Ala Asp Ile | 245 | 250 255 |
| Glu Lys Ala Gly Arg Ser Ile Ile Glu Gly Cys Ser Phe Asp Asn Asn | 260 | 265 270 |
| Leu Pro Cys Ile Ala Glu Lys Glu Val Phe Val Phe Glu Asn Val Ala | 275 | 280 285 |
| Asp Asp Leu Ile Ser Asn Met Leu Lys Asn Asn Ala Val Ile Ile Asn | 290 | 295 300 |
| Glu Asp Gln Val Ser Lys Leu Ile Asp Leu Val Leu Gln Lys Asn Asn | 305 | 310 315 320 |
| Glu Thr Gln Glu Tyr Phe Ile Asn Lys Lys Trp Val Gly Lys Asp Ala | 325 | 330 335 |
| Lys Leu Phe Leu Asp Glu Ile Asp Val Glu Ser Pro Ser Asn Val Lys | 340 | 345 350 |
| Cys Ile Ile Cys Glu Val Asn Ala Asn His Pro Phe Val Met Thr Glu | 355 | 360 365 |

Leu Met Met Pro Ile Leu Pro Ile Val Arg Val Lys Asp Ile Asp Glu
370 375 380

Ala Ile Lys Tyr Ala Lys Ile Ala Glu Gln Asn Arg Lys His Ser Ala
385 390 395 400

Tyr Ile Tyr Ser Lys Asn Ile Asp Asn Leu Asn Arg Phe Glu Arg Glu
405 410 415

Ile Asp Thr Thr Ile Phe Val Lys Asn Ala Lys Ser Phe Ala Gly Val
420 425 430

Gly Tyr Glu Ala Glu Gly Phe Thr Thr Phe Thr Ile Ala Gly Ser Thr
435 440 445

Gly Glu Gly Ile Thr Ser Ala Arg Asn Phe Thr Arg Gln Arg Arg Cys
450 455 460

Val Leu Ala Gly
465

<210> 190

<211> 69

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador PT800

<400> 190

gggaacaaaa gctggagctc caccgcggtg gggcgcgccc tattttcgag gaccttgta 60

ccttgagcc 69

10 <210> 191

<211> 50

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador OT758

<400> 191

ttaaggtatc ttatccatg gtgttggtt atgtgtgtt attcgaaact 50

<210> 192

<211> 52

20 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador OT754

<400> 192

25 ttgggtaccg ggccccct cgaggtcgac tggcattaa tcttccat at 52

<210> 193

<211> 52

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador OT755

<400> 193
tgtgtcctag caggtaggg cctgcagggc cgtgaattta ctttaaactct tg 52

5 <210> 194
<211> 50
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador OT760

10 <400> 194
cgaaaatagg gcgcgccact ggtagagagc gactttgtat gcccgaattg 50

<210> 195
<211> 71
<212> DNA
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador OT792

<400> 195
cccttgacga acttggcctt cactagcatg ctgaatatgt attacttggt tatggttata 60
tatgacaaaa g 71

20 <210> 196
<211> 71
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Cebador OT791

<400> 196
cccttgacga acttggcctt cactagcatg ctgaatatgt attacttggt tatggttata 60
tatgacaaaa g 71

<210> 197
<211> 73
30 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador OT765

<400> 197
ggaacaaaag ctggagctcc accgcggtgg tttaacgtat agacttctaa tatatttctc 60
catacttggt att 73

35 <210> 198
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Cebador LDHEcoRV F

<400> 198
gacgtcatga ccaccgccc atcccttt 29

<210> 199

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador LDH AatIR

 <400> 199
 gatatccaac accagcgacc gacgtattac 30

 <210> 200
 <211> 47
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador Cm F

 <400> 200
 15 atttaaatct cgagtagagg atccaacaa acgaaaattg gataaag 47

 <210> 201
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Cebador Cm R

 <400> 201
 acgcgttatt ataaaagcca gtcattagg 29

 <210> 202
 25 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador P11 F

 30 <400> 202
 tcgagagcgc tatagtgtgtt gacagaatgg acatactatg atatattgtt gctatagcgc 60
 cc 62

 <210> 203
 <211> 58
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador P11 R

 <400> 203
 gggcgctata gcaacaatat atcatagtat gtccattctg tcaacaacta tagcgctc 58

 40 <210> 204
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Cebador PldhL F

 <400> 204
 gagctcgtcg acaaccaac attatgacgt gtctgggc 38

 <210> 205

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Cebador PldhL R

 <400> 205
 ggatcctacc atgttgtgc aaaataagtg 30

 10 <210> 206
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador F-PnisA (EcoRV)

 15 <400> 206
 ttcagtata tcgacatact tgaatgacct agtc 34

 <210> 207
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Cebador R-PnisA(PmeI BamHI)

 <400> 207
 ttgattagtt taaactgtag gatccttga gtgcctcctt ataattta 48

 25 <210> 208
 <211> 2460
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> DNA molde

 30 <400> 208

 tgatccaaag gagggtgagg aaatggcgat gtttacgacc accgcaaaag ttattcagcc 60
 gaaaattcgt ggttttattt gcaccaccac ccacccgatt ggttgcgaaa aacgtgttca 120
 ggaagaaatc gcatacgcac gcgcgcaccc gccgaccagc ccgggtccga aacgtgtgct 180

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| ggttattggc | tgcagtacgg | gctatggcct | gagcaccctg | atcaccgcgg | ccttttggtta | 240 |
| tcaggccgca | accctgggcg | tgtttctggc | aggcccgccg | accaaaggcc | gtccggccgc | 300 |
| ggcgggttg | tataatacgg | ttgcgttcga | aaaagccgcc | ctggaagcag | gtctgtatgc | 360 |
| acgttctctg | aatggtgatg | cgttcgattc | taccacgaaa | gcccgcaccg | tggaagcaat | 420 |
| taaactgat | ctgggtaccg | ttgatctggt | ggtgtatagc | attgcagcgc | cgaaacgtac | 480 |
| cgatccggcc | accggcgtgc | tgcataaagc | gtgcctgaaa | ccgattggtg | caacctacac | 540 |
| caatcgtacg | gtgaacaccg | ataaagcaga | agttaccgat | gtgagtattg | aaccggccag | 600 |
| tccggaagaa | atcgagata | ccgtgaaagt | tatgggtggc | gaagattggg | aactgtggat | 660 |
| tcaggcactg | agcgaagccg | gcgtgctggc | cgaaggcgca | aaaaccgttg | cgtattctta | 720 |
| tattggcccc | gaaatgacgt | ggccggtgta | ttggagtggc | accattggcg | aagccaaaaa | 780 |
| agatgttgaa | aaagcggcga | aacgcatac | ccagcagtag | ggctgtccgg | cgtatccggt | 840 |
| tgttgccaaa | gcgctggtga | cccaggccag | tagcgccatt | ccggtggtgc | cgctgtatat | 900 |
| ttgcctgctg | tatcgtgtta | tgaaagaaaa | aggcaccat | gaaggctgca | ttgaacagat | 960 |
| ggtgcgtctg | ctgacgacga | aactgtatcc | ggaaaatggt | gcgccgatcg | tggtatgaagc | 1020 |
| gggccgtgtg | cgtgttgatg | attgggaaat | ggcagaagat | gttcagcagg | cagttaaaga | 1080 |
| tctgtggagc | caggtgagta | cggccaatct | gaaagatatt | agcgattttg | caggttatca | 1140 |
| gaccgaattt | ctgcgtctgt | ttggcttttg | tattgatggt | gtggattacg | atcagccggt | 1200 |
| tgatgttgaa | gcggatctgc | cgagcgccgc | ccagcagtaa | gtcaacaaag | gaggggttaa | 1260 |
| aatggttgat | ttcgaatatt | caataccaac | tagaattttt | ttcggtaaag | ataagataaa | 1320 |
| tgtacttgga | agagagctta | aaaaatatgg | ttctaaagtg | cttatagttt | atggtggagg | 1380 |
| aagtataaag | agaaatggaa | tatatgataa | agctgtaagt | atacttgaaa | aaaacagtat | 1440 |
| taaattttat | gaacttgcat | gagtagagcc | aaatccaaga | gtaactacag | ttgaaaaagg | 1500 |
| agttaaaata | tgtagagaaa | atggagttga | agtagtacta | gctatagggt | gaggaagtgc | 1560 |
| aatagattgc | gcaaagggtta | tagcagcagc | atgtgaatat | gatggaaatc | catgggatat | 1620 |
| tgtgttagat | ggctcaaaaa | taaaaagggg | gcttcctata | gctagtatat | taaccattgc | 1680 |
| tgcaacagga | tcagaaatgg | atacgtgggc | agtaataaat | aatatggata | caaacgaaaa | 1740 |
| actaattgcg | gcacatccag | atatggctcc | taagttttct | atattagatc | caacgtatac | 1800 |
| gtataaccgta | cctaccaatc | aaacagcagc | aggaacagct | gatattatga | gtcatatatt | 1860 |
| tgaggtgtat | tttagtaata | caaaaacagc | atatttgcat | gatagaatgg | cagaagcggt | 1920 |
| attaagaact | tgtattaaat | atggaggaat | agctcttgag | aagccggatg | attatgaggc | 1980 |
| aagagccaat | ctaattgtgg | cttcaagtct | tgcgataaat | ggacttttaa | catatggtaa | 2040 |
| agacactaat | tggagtgtac | acttaatgga | acatgaatta | agtgcttatt | acgacataac | 2100 |
| acacggcgta | gggcttgcaa | ttttaacacc | taattggatg | gagtatat | tttaataatga | 2160 |
| tacagtgtac | aagtttggtg | aatatggtgt | aaatgtttgg | ggaatagaca | aagaaaaaaa | 2220 |
| tcactatgac | atagcacatc | aagcaatata | aaaaacaaga | gattactttg | taaatgtact | 2280 |
| aggtttacca | tctagactga | gagatgttgg | aattgaagaa | gaaaaattgg | acataatggc | 2340 |
| aaaggaatca | gtaaagctta | caggaggaac | cataggaaac | ctaagaccag | taaacgcctc | 2400 |
| cgaagtccta | caaataattca | aaaaatctgt | gtaaacctac | gtttaaactt | acgcgtatga | 2460 |

REIVINDICACIONES

1. Una célula huésped microbiana recombinante que comprende moléculas de DNA heterólogas que codifican polipéptidos que catalizan las conversiones de sustrato a producto:

- a) acetil-CoA a acetoacetil-CoA,
- 5 b) acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetil-CoA,
- c) 3-hidroxiacetil-CoA a crotonil-CoA,
- d) crotonil-CoA a butiril-CoA,
- e) butiril-CoA a butiraldehído, y
- f) butiraldehído a 1-butanol;

10 en donde dicha célula huésped microbiana produce 1-butanol.

2. La célula huésped según la Reivindicación 1, en donde el polipéptido que cataliza una conversión de sustrato a producto de acetil-CoA a acetoacetil-CoA es la acetil-CoA acetiltransferasa.

3. La célula huésped según la Reivindicación 1, en donde el polipéptido que cataliza una conversión de sustrato a producto de acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetil-CoA es la 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa.

15 4. La célula huésped según la Reivindicación 1, en donde el polipéptido que cataliza una conversión de sustrato a producto de 3-hidroxiacetil-CoA a crotonil-CoA es la crotonasa.

5. La célula huésped según la Reivindicación 1, en donde el polipéptido que cataliza una conversión de sustrato a producto de crotonil-CoA a butiril-CoA es la butiril-CoA deshidrogenasa.

20 6. La célula huésped según la Reivindicación 1, en donde el polipéptido que cataliza una conversión de sustrato a producto de butiril-CoA a butiraldehído es la butiraldehído deshidrogenasa.

7. La célula huésped según la Reivindicación 1, en donde el polipéptido que cataliza una conversión de sustrato a producto de butiraldehído a 1-butanol es la butanol deshidrogenasa.

8. La célula huésped según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, en donde la célula es seleccionada del grupo que consiste en: una bacteria, una cianobacteria, un hongo filamentoso y una levadura.

25 9. La célula huésped según la Reivindicación 8, en donde la célula es un miembro de un género seleccionado del grupo que consiste en *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* y *Saccharomyces*.

30 10. La célula huésped según la Reivindicación 9, en donde la célula es seleccionada del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus macerans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

35 11. La célula huésped según la Reivindicación 2, en donde la acetil-CoA acetiltransferasa tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ID. SEC. nº 2, ID. SEC. nº 4, ID. SEC. nº 129, ID. SEC. nº 131 e ID. SEC. nº 133.

12. La célula huésped según la Reivindicación 3, en donde la 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ID. SEC. nº 6, ID. SEC. nº 135, ID. SEC. nº 137 e ID. SEC. nº 139.

40 13. La célula huésped según la Reivindicación 4, en donde la crotonasa tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ID. SEC. nº 8, ID. SEC. nº 141, ID. SEC. nº 143 e ID. SEC. nº 145.

14. La célula huésped según la Reivindicación 5, en donde la butiril-CoA deshidrogenasa tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ID. SEC. nº 10, ID. SEC. nº 147, ID. SEC. nº 149, ID. SEC. nº 151 e ID. SEC. nº 187.

45 15. La célula huésped según la Reivindicación 6, en donde la butiraldehído deshidrogenasa tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ID. SEC. nº 12, ID. SEC. nº 153 e ID. SEC. nº 189.

16. La célula huésped según la Reivindicación 7, en donde la butanol deshidrogenasa tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ID. SEC. nº 14, ID. SEC. nº 16, ID. SEC. nº 153, ID. SEC. nº

155 e ID. SEC. nº 157.

17. La célula huésped según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, en donde la célula huésped es un anaerobio facultativo.

18. Un método para la producción de 1-butanol, que comprende:

- 5 i) proporcionar la célula huésped microbiana recombinante de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 17; y
ii) poner la célula huésped de (i) en contacto con un sustrato carbonado fermentable bajo unas condiciones mediante las cuales se produce 1-butanol.

19. El método según la Reivindicación 18, en donde el sustrato carbonado fermentable es seleccionado del grupo que consiste en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

- 10 20. El método según la Reivindicación 18, en donde el sustrato carbonado es seleccionado del grupo que consiste en glucosa, sacarosa y fructosa.

21. El método según la Reivindicación 18, en donde las condiciones mediante las cuales se produce 1-butanol son anaeróbicas.

- 15 22. El método según la Reivindicación 18, en donde las condiciones mediante las cuales se produce 1-butanol son microaeróbicas.

23. El método según la Reivindicación 18, en donde la célula huésped es puesta en contacto con el sustrato carbonado en medios mínimos.

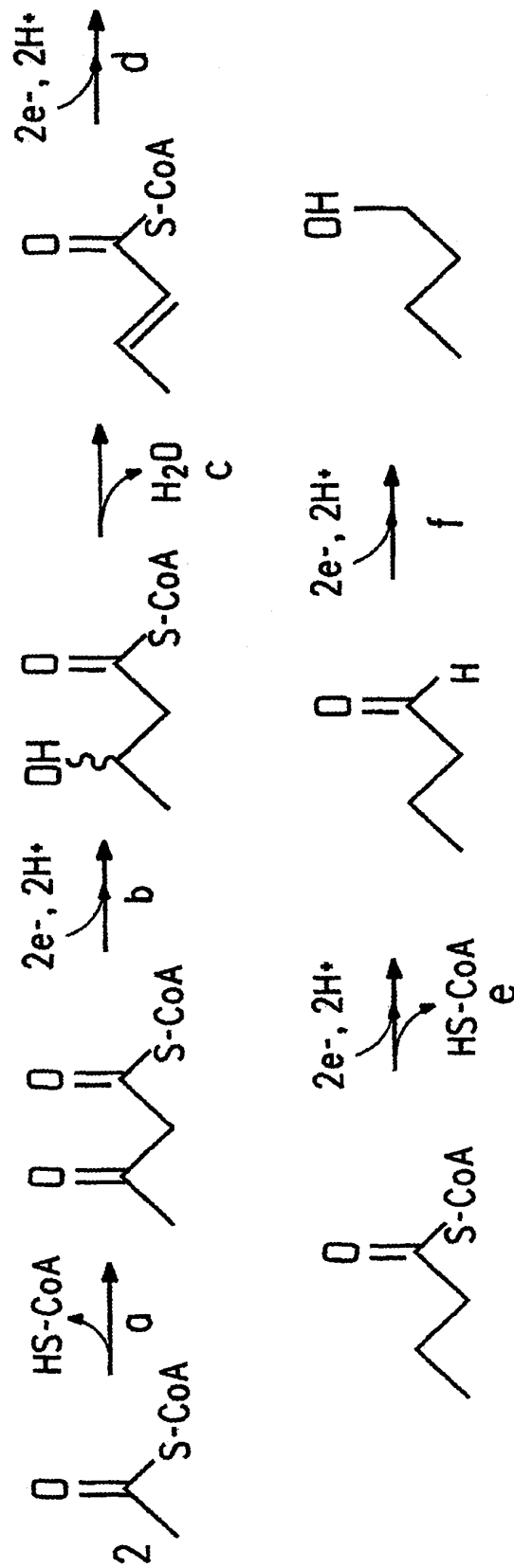


FIG. 1