



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



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

⑮ Int. Cl.:
C12P 7/16
(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2006 E 06804251 (4)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1929025**

⑭ Título: **Producción de alcoholes de cuatro carbonos por fermentación**

⑩ Prioridad:

**29.09.2005 US 721677 P
16.06.2006 US 814470 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2014

⑬ Titular/es:

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

⑭ Inventor/es:

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

⑭ 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

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

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.

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, 6^a 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.

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*.

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.

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.

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

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-hidroxibutiril-CoA,
- c) 3-hidroxibutiril-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 acetoacetyl-CoA,

b) acetoacetyl-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA,

c) 3-hidroxibutiril-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 Solicitud 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 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 thlA de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	1	2
Acetil-CoA acetiltransferasa thlB 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-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	5	6
3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa de <i>Bacillus subtilis</i>	134	135
3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa de <i>Ralstonia eutropha</i>	136	137
3-hidroxibutiril-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 coelocolor</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 *ter* 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 *ter* 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

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.

10 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 25 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 30 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 35 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)].

40 45 50 La expresión "3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de acetoacetil-CoA en 3-hidroxibutiril-CoA. Las 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasas pueden ser dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), con una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxibutiril-CoA o (R)-3-hidroxibutiril-CoA y son clasificadas como E.C. 1.1.1.35 y E.C. 1.1.1.30, respectivamente. Además, las 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasas pueden ser dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), con una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxibutiril-CoA o (R)-3-hidroxibutiril-CoA y son clasificadas como E.C. 1.1.1.157 y E.C. 1.1.1.36, respectivamente. Las 3-hidroxibutiril-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-hidroxibutiril-CoA en crotonil-CoA y H₂O. Las crotonasas pueden tener una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxibutiril-CoA o (R)-3-hidroxibutiril-CoA

5 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)].

10 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)].

15 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)].

20 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)].

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

30 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.

35 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 químico" 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 químico 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 químicos. Un "transgén" es un gen que ha sido introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.

40 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.

45 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. Bennan 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, O₂, NO₃⁻ y SO₄²⁻), los equivalentes de reducción pueden ser utilizados para aumentar la reserva energética; alternativamente, 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:

- 5 a) acetil-CoA a acetoacetil-CoA, según es catalizada, por ejemplo, por la acetil-CoA acetiltransferasa;
- b) acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA, según es catalizada, por ejemplo, por la 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa;
- c) 3-hidroxibutiril-CoA a crotonil-CoA, según es catalizada, por ejemplo, por la crotonasa;
- 10 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 exemplificada 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 polihidroxialcanoatos. 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. <i>phaseolicola</i> 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-hidroxibutiril-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 AFAKTLAAC[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]
butiraldehido 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. <i>Typhi</i> 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 BX571966.11 [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

5 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 clostrídios 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-
10 227 (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)].

15 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 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 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.
- 20 20 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.
- 25 25 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.
- 30 30 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 gallinarium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- 35 35 Construcción del huésped de producción
- 40 40 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-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, crotonasa, butiril-CoA deshidrogenasa, butiraldehído deshidrogenasa y butanol deshidrogenasa, pueden ser aislados de diversas fuentes, como se describió anteriormente.
- 45 45 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.
- 50 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'

5 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'
10 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'
15 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'
20 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'
25 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'
30 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'

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.

35 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 cassetes 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].

15 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)].

20 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.

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 *bdhB*) fueron clonados en plásmidos de expresión y usados para transformar la cepa de *Bacillus* que porta los genes de 1-butanol integrados.

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 construidos 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.

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 10 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, FBAt, GPDt, GPMt, ERG10t y GAL1t. 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 15 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 20 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: 5800-25 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 gallinarium* 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 35 (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 40 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* [Nallaapareddy 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

45 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 metilotrofos utilizan diversos compuestos diferentes que contienen carbono, tales 50 como metilamina, glucosamina y una diversidad de aminoácidos, para su actividad metabólica. Por ejemplo, se sabe que las levaduras metilotroficas 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 55 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.

10 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.

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

20 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).

25 Fermentaciones industriales discontinuas y continuas

30 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.

35 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, 40 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).

45 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.

50 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. Bennan 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 Phillip 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	CACCATGGAACTAACAAAT GTCATCCTTG	17	<i>crt</i> directo
<i>crt</i>	N4	CCTCCTATCTATTTTGAA 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	CTAGCACTTTCTAGCAAT ATTGCTG	22	<i>thlA</i> inverso
<i>bdhA</i>	N9	CACCATGCTAAGTTTGAT TATTCAATAC	23	<i>bdhA</i> directo
<i>bdhA</i>	N10	TTAATAAGATTTTAAATA TCTCA	24	<i>bdhA</i> inverso
<i>bdhB</i>	N11	CACCATGGTTGATTCGAA TATTCAATACC	25	<i>bdhB</i> directo
<i>bdhB</i>	N12	TTACACAGATTTTGAAATA 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	CACCATGATAGTAAAGCA AAGTTTG	29	CAC0462 directo
CAC0462	N21	GCTTAAAGCTAAACCGC TTCTGGCG	30	CAC0462 inverso
<i>ald</i>	N27F1	CACCATGAATAAAGACACA CTAATACC	31	<i>ald</i> directo
<i>ald</i>	N28R1	GCCAGACCATCTTGAAAA TGCAC	32	<i>ald</i> inverso

ES 2 446 520 T3

Cebadores oligonucleotídicos de clonación				
Gen	Nombre del cebador	Secuencia	ID. SEC. nº:	Descripción
<i>thlA</i>	N44	CATGCATGCAAAGGAGGTT AGTAGAATGAAAGAAG	33	<i>thlA</i> directo
<i>thlA</i>	N45	GTCCTGCAGGGCGCGCCC AATACTTCTAGCACTTTTC	34	<i>thlA</i> inverso
<i>hbd</i>	N42	CATGTCGACAAAGGAGGT CTGTTAATGAAAAAGGTA TG	35	<i>hbd</i> directo
<i>hbd</i>	N43	GTCGCATGCCTGTAACT TATTTGAA	36	<i>hbd</i> inverso
CAC0462	N68	CATAGATCTGGATCCAAAG GAGGGTGAGGAAATGATA GTAAGAAG	37	CAC0462 directo
CAC0462	N69	CATGTCGACGTGCAGCCTT TTAAGGTTCT	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	CATGCCCGGGGTCACCA AAGGAGGAATAGTCATGA ATAAA	41	<i>ald</i> directo
<i>ald</i>	N59	CATGGTTAACAAAGAAGTTA GCCGGCAAGTACA	42	<i>ald</i> inverso
<i>bdhB</i>	N64	CATGGTTAACAAAGGAGG GGTTAAATGGTTGATTTC GAAT	43	<i>bdhB</i> directo
<i>bdhB</i>	N65	CATGGCATGCGTTAACG TAGGTTTACACAGATTTT	44	<i>bdhB</i> inverso
--	BenF	ACTTCTTCGCCTGTTTC AC	73	--
--	BenMA R	CATGAAGCTTGGCGCGCC GGGACGCGTTTTGAAAAT AATGAAAACCT	74	--
--	BenBPR	CATGAAGCTTGTAAACT CGGTGACCTTGAAAATAAT GAAACTTATTTGTTTGA AAATAATGAAAACCTTATATT 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)	TTCCGTACTTCCGGACGAC TGACCGGTGCACCAATGC 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	CATGACGTCACTAGTGTAA ACAAGAAGTTAGCCGGCA AG	94	ald inverso
EgTER	Forward 1(E)	CATGTTAACAAAGGAGGAA AGATCTATGGCGATGTTA CGACCACCGCAA	95	EgTER SOE directo
EgTER	Bottom Reverse I (E)	CCCCTCTTGGCGGCC TTACTGCTGGCGGGCGCT CGGCAGA	96	EgTER SOE inverso
bdh	Top Forward 2 (B)	GCCCCAGCAGTAAGGCGCG CCAAAGGAGGGGTTAAAAT GGTTGATTCGAAT	97	bdh SOE directo
bdh	Reverse 2 (B)	GTCGACGTCATACTAGTT ACACAGATTTTGAAATATT TGT	98	bdh SOE inverso
---	Pamy/la cO F	CATTGTACAGAATTGAGC TCTCGAGGCCCGCACAT ACGAAAGAC	99	Pamy directo
---	Pamy/la cO R	CATTGTACAGTTAACAT AGGTACCCCTCATTTCGT AGGAATTGTTATCC	100	Pamy inverso
---	Spac F	CATCTCGAGTAATTCTACA CAGCCCAGTCC	101	Pspac directo
---	Spac R	CATGTTAACGGTGACCC AAGCTGGGATCCGCGG	102	Pspac inverso
thl	Top TF	CATTGGTCACCATTCCGG GCATGCAAAGGAGGTTAG TAGAATG	103	thl SOE directo
thl	Bot TR	CCTTACGCGACCGGTACT 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	CGCGCCCTGTCGACTTGA CTAGTACCGGTCGCGTAAA GGAGGTATTAGTCATGGAA C	105	crt SOE directo
crt	Bot CR	CATCGTTAAACTTGGATC CAGATCCCTTACCTCCTAT	106	crt SOE inverso
ERG10-ERG10t	OT731	AAAGCTGGAGCTCCACCG CGGTGGCGGCCGCTCTAG AAGTTTCAAGCAGAGTT TCGTTGAATATTTACCA	164	ERG10-ERG10t directo
ERG10-ERG10t	OT732	TTCAATATGCATGCCTCAG AACGTTTACATTGTATCGA CTGCCAGAACCC	165	ERG10-ERG10t inverso
GAL1-GAL10	OT733	GCAGTCGATACAATGTAAA CGTTCTGAGGCATGCATAT TGAATTTCAAAAATTCTTA CTTTTTTTGGATGGACG CA	166	GAL1-GAL10 directo
GAL1-GAL10	OT734	ACCTGCACCTATAACACAT ACCTTTCCATGGTAGTT TTTCTCCTGACGTTAAAG TATAGAGGTATATTA	167	GAL1-GAL10 inverso
hbd	OT735	AAAAACTACCAGGAAAAG GTATGTGTTATAGGTGCAG GTACTATGGGTTCAGGAAT TGC	168	hbd directo
hbd	OT736	GTAAAAAAAAAGAAGGCCGT ATAGGCCTTATTTGAATA ATCGTAGAACCTTTCCCT GATTTCTCCAAG	169	hbd inverso
GAL1t	OT737	ACGATTATTCAAAATAAGG CCTATACGGCCTTCTTTT TTTACTTGTTCAGAACAA CTTCTCATTTTTCTACTC ATAA	170	GAL1t directo
GAL1t	OT738	GAATTGGGTACCGGGCCC CCCCTCGAGGTGACCGA TGCCTCATAAACTTCGGTA GTTATATTACTCTGAGAT	171	GAL1t inverso
thIA	OT797	AAAGTAAGAATTTTGAAA ATTCAATATGCATGCAAGA AGTTGTAATAGCTAGTGCA GTAAGAAC	172	thIA directo

Cebadores oligonucleotídicos de clonación				
Gen	Nombre del cebador	Secuencia	ID. SEC. nº:	Descripción
thIA	OT798	GAAAAAGATCATGAGAAAA TCGCAGAACGTAAGGCGC GCCTCAGCACTTTCTAGC AATATTGCTGTTCCCTTG	173	thIA inverso
CUP1	OT806	CTCGAAAATAGGGCGCGC CCCCATTACCGACATTGG GCGC	174	CUP1 directo
CUP1	OT807	ACTGCACTAGCTATTACAA CTTCTTGATGCGTGATGA TTGATTGATTGATTGTA	175	CUP1 inverso
promotor GPD	OT808	TCGGTAATGGGGCGCGC CCTATTTCGAGGACCTTG TCACCTTGA	176	promotor GPD directo
promotor GPD	OT809	TTTCGAATAAACACACATA AACAAACACCCATGGAAA AGGTATGTGTTAGGTGC AGG	177	promotor GPD inverso
promotor FBA1	OT799	TACCGGGCCCCCTCGA GGTCGACGGCGCGCCACT GGTAGAGAGCGACTTTGTA TGCCCCA	178	promotor FBA1 directo
promotor FBA1	OT761	CTTGGCCTTCACTAGCATG CTGAATATGTATTACTTGG TTATGGTTATATGACAAA AG	179	promotor FBA1 inverso
promotor GPM1	OT803	CCCTCACTAAAGGAACAA AAGCTGGAGCTCGATATC GGCGCGCCACATGCAGT GATGCACGCGCGA	180	promotor GPM1 directo
promotor GPM1	OT804	AAGGATGACATTGTTAGT TCATGGTTGAATATGTG TGTTGTTGG	181	promotor GPM1 inverso
crt	OT785	CACACATATTACAACCATG GAACAAACAAATGTCATCC TTGAAAAGGAAGG	182	CRT directo
crt	OT786	ATCATTCAATTGGCCATTCA GGCCTTATCTATTTTGAA GCCTTCAATTTCCTTTCT CTATG	183	Crt inverso
terminador GPM1t	OT787	CAAAAATAGATAAGGCCTG AATGGCCAATGAATGATT GATGATTCTTTCCCTC CATTTTC	184	terminador GPM1t directo

Cebadores oligonucleotídicos de clonación				
Gen	Nombre del cebador	Secuencia	ID. SEC. nº:	Descripción
terminador GPM1t	OT805	GAATTGGGTACCGGGCCC CCCCTCGAGGTCGACTTAT AGTATTATATTTCTGATT GGTTATAGCAAGCAGCGTT T	185	terminador GPM1t inverso
promotor GPD	OT800	GGGAACAAAAGCTGGAGC TCCACCGCGGTGGGCGC GCCCTATTTCGAGGACCT TGTACACCTTGAGCC	190	promotor GPD directo
promotor GPD	OT758	TTAAGGTATCTTATCCAT GGTGTGTTATGTGTGT TTATTCGAAACT	191	promotor GPD inverso
terminador GPD	OT754	TTGGGTACCGGGCCCCC CTCGAGGTCGACTGGCCA TTAATCTTCCCATAT	192	terminador GPD directo
terminador GPD	OT755	TGTGTCCCTAGCAGGTTAGG GCCTGCAGGGCCGTGAAT TTACTTTAAATCTTG	193	terminador GPD inverso
promotor FBA1	OT760	CGAAAATAGGGCGCGCCA CTGGTAGAGAGCGACTTT GTATGCCCAATTG	194	promotor FBA1 directo
promotor FBA1	OT792	CCCTTGACGAACCTGGCCT TCACTAGCATGCTGAATAT GTATTACTGGTTATGGTT ATATATGACAAAAG	195	promotor FBA1 inverso
terminador FBA1	OT791	CCCTTGACGAACCTGGCCT TCACTAGCATGCTGAATAT GTATTACTGGTTATGGTT ATATATGACAAAAG	196	terminador FBA1 directo
terminador FBA1	OT765	GGAACAAAAGCTGGAGCT CCACCGCGGTGGTTAAC GTATAGACTCTAAATATATT TCTCCATACTGGTATT	197	terminador FBA1 inverso
IdhL	LDH EcoRV F	GACGTATGACCACCCGC CGATCCCTTT	198	IdhL directo
IdhL	LDH AatII R	GATATCCAACACCCAGCGAC CGACGTATTAC	199	IdhL inverso
Cm	Cm F	ATTTAAATCTCGAGTAGAG GATCCCACAAACGAAAAT TGGATAAAG	200	Cm directo

Cebadores oligonucleotídicos de clonación				
Gen	Nombre del cebador	Secuencia	ID. SEC. nº:	Descripción
Cm	Cm R	ACCGCGTTATTATAAAAGCC AGTCATTAGG	201	Cm inverso
P11	P11 F	TCGAGAGCGCTATAGTTGT TGACAGAATGGACATACTA TGATATATTGTTGCTATAG CGCCC	202	promotor P11 directo
P11	P11 R	GGCGCTATAGCAACAATA TATCATAGTATGTCCATTCT GTCAACAATAGCGCTC	203	promotor P11 inverso
PldhL	PldhL F	GAGCTCGTCGACAAACCA ACATTATGACGTGTCTGGG C	204	promotor IdhL directo
PldhL	PldhL R	GGATCCTACCATGTTGTG CAAAATAAGTG	205	promotor IdhL inverso
PnisA	F-PnisA (EcoRV)	TTCAGTGATATCGACATAC TTGAATGACCTAGTC	206	PnisA directo
PnisA	R-PnisA (P mel BamHI)	TTGATTAGTTAAACTGTA GGATCCTTGAGTGCTCC TTATAATTAA	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	CCAACCTGCTTTCAATAGCTGC	<i>thlA</i>	48
N15SeqF1	CAGAGATGGGTCAAAGAATG	<i>thlB</i>	49
N16SeqR1	GTGGTTTATTCCGAGAGCG	<i>thlB</i>	50
N5SeqF2	GGTCTATACTTAGAATCTCC	<i>hbd</i>	51
N6SeqR2	CGGAACAGTTGACCTTAATATGGC	<i>hbd</i>	52
N22SeqF1	GCCTCATCTGGTTGGTCTTG	CAC0426	53
N22SeqF2	CGCCTAGGAGAAAGGACTATAAAA CTGG	CAC0426	54
N22SeqF3	CAGAGTTAGGTGGTAGAGCC	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	GGCATCATGAGTTCTGTATGAC	<i>ald</i>	62
N32SeqR3	GCCTTCAATGATACTCTTACAGCC	<i>ald</i>	63
N32SeqR4	GCATTTCCAGCAGCTATCATGC	<i>ald</i>	64
N32SeqR5	CCTTCCCATAATGTGTTCTTCC	<i>ald</i>	65
N11SeqF1	GTTGAAGTAGTACTAGCTATAG	<i>bdhB</i>	66
N11SeqF2	GACATAACACACGGCGTAGGGC	<i>bdhB</i>	67
N12SeqR1	TAAGTGTACACTCCAATTAGTG	<i>bdhB</i>	68
N12SeqR2	GCCATCTAACACAATATCCCATGG	<i>bdhB</i>	69
N9SeqF1	GCGATACATGGGACATGGTTAAAG	<i>bdhA</i>	70
N10SeqR1	TGCACTTAACTCGTGTTCCATA	<i>bdhA</i>	71
T7Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	vector pET23	82
Trc99aF	TTGACAATTAAATCATCCGGC	vector pTRc99a	83
N5SeqF4	GGTCAACTGTTCCGGAAATT	<i>hbd</i>	84
T-ald (BamHI)	TGATCTGGATCCAAGAAGGAGCCC TTCACCATGAATAAGACACAC	<i>ald</i>	85
B-ald (EgTER)	CATGCCATTCTCACCCCTCTT 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	ATCCCACAATCCGTCAGTGATC	<i>thIA</i>	112
N31SeqF1	CTGAGATAAGAAAGGCCGCA	<i>ald</i>	113
N62SeqF2	CAACCCCTGGCGTGTCTG	EgTER	114
N62SeqF3	GTGGCGAAGATTGGGAACTG	EgTER	115
N62SeqF4	GGGAAATGGCAGAAGATGTCAGC	EgTER	116

Cebadores de secuenciación y de exploración por PCR			
Nombre	Secuencia	Especificidad génica	ID. SEC. nº:
N63SeqR1	CGGTCTGATAACCTGAAATCGC	EgTER	117
N63SeqR2	CACCAGCGCTTGGCAACAAAC	EgTER	118
N63SeqR3	GAACGTGCATACAGACCTGCTTC	EgTER	119
N63SeqR4	CGGCTGAATAACTTTGCGG	EgTER	120
Pamy SeqF2	GCCTTGATGACTGATGATTGGC	vector pFP988	121
Pamy SeqF	TCTCCGGTAAACATTACGGCAAAC	vector pFP988	122
Pamy SeqR	CGGTCAGATGCAATTGACATGTG	vector pFP988	123
SpacF Seq	GAAGTGGTCAAGACCTCACT	promotor Pspac	124
sacB Up	CGGGTTGTTACTGATAAAGCAGG	sacB	125
sacB Dn	CGGTTAGCCATTGCCTGCTTTA	sacB	126
HT R	ACAAAGATCTCCATGGACGCGT	vector pHT01	127
Scr1	CCTTTCTTGTGAATCGG	csc	160
Scr2	AGAACAGGGTGTGATCC	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

5 Corporation (Milford, Massachusetts, EE.UU.), con detección por índice de refracción (RI; del inglés, refractive index). La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando H_2SO_4 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, 10 1 μ m 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 15 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 μ m de espesor de película; Varian, Inc., Palo Alto, California, EE.UU.).

20 El significado de las abreviaturas es el siguiente: "s" significa segundos, "min" significa minutos, "h" significa horas, "nm" significa nanómetros, "d" significa días, " μ l" significa microlitros, "ml" significa mililitros, "l" significa litros, "mm" significa milímetros, "nm" significa nanómetros, "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "mmol" significa milimoles, " μ mol" significa micromoles, "g" significa gramos, " μ g" 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 kilodaltones, "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 15 Se preparó DNA genómico usando el kit Genta Puregene® (Genta 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: 20 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.).

20 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-TOPOthlA. 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.

30 35 40 45 50 Para crear un clon de expresión, se transfirió el gen *thlA* al vector pDEST 14 mediante recombinación para generar pDEST14thlA. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14thlA. 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 60 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 (ditiotreitol) 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 acetooacetil-CoA tiolasa, en *E. coli*. El gen *thlB* de acetooacetil-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-TOPOthlB. 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 pDEST14thlB. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14thlB 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-hidroxibutiril-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-TOPOhbd. 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 pDEST14hbd. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14hbd 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 hidroxibutiril-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, acetooacetil-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-TOPO_{bdhA}. 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 pDEST14_{bdhA}. Se transformaron células BL21-AI con el vector pDEST14_{bdhA} 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.

25 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-hidroxibutiril-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.

- 35 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).

- 40 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.

- 45 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).

- 55 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 Hpal y un RBS. El cebador inverso llevaba incorporados un Pmel 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 Hpal de 1,2 kbp de pCRBluntII-bdhB, un fragmento Hpal 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 Pmel, 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 Ncol/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, Pmel y HindIII cadena abajo del promotor. El producto de PCR fue digerido con Ncol 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 Pmel 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 Ascl 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 Sall 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-Sall 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/Sall, 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

5 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 *thlA* de pCR4 Blunt-TOPO-thlA, 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-thlA.

10 Se digiere el vector pUC19dSS-crt-CaTER-hbd-thlA 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 Ncol/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 15 cebador BenMAR lleva incorporados sitios MluI, Ascl y HindIII cadena abajo del promotor. El producto de PCR es digerido con Ncol 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-thlA.

Ejemplo 11 (profético)

20 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*.

25 Se transforma *E. coli* NM522 (ATCC 47000) con los plásmidos pBen-crt-hbd-CaTER-thlA y pBen-ald-bdhB, construidos del modo descrito en los Ejemplos 10 y 9, respectivamente, y se controla la expresión de los genes en

30 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 Pmel 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-thlA es digerido con Pvull 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.

35 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: 40 MgCl₂ 200 mM, CaCl₂ 70 mM, MnCl₂ 5 mM, FeCl₃ 0,1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, hidrocloruro 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*

45 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 construidos 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.

50 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 *Sph*I y un sitio de unión al ribosoma (RBS). El cebador inverso llevaba incorporados sitios de restricción *Ascl* y *Pst*I. 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-hidroxibutiril-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 *Sall* y un RBS. El cebador inverso llevaba incorporado un sitio de restricción *Sph*I. 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 *Mlu*I y un RBS. El cebador inverso llevaba incorporado un sitio de restricción *Bam*HI. 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 *Bam*HI-*Sall* 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 *Hinc*II y *Pmel* y fue clonada en pET23+ (Novagen) linealizado con *Hinc*II. 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.

5 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/*Sal*I de 1287 bp de pET23+::EgTER(opt). El vector pTrc99a de 4,2 kbp fue linealizado con *Bam*HI/*Sal*I. 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.

10 Construcción del plásmido pTrc99a-E-C-H-T que comprende genes que codifican acetil-CoA acetiltransferasa (*thlA*), 3-hidroxibutiril-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 EcoRI y BamHI, liberándose un fragmento de *crt* de 0,8 kbp. También se digirió el vector pUC19dSS (descrito en el Ejemplo 10) con EcoRI y BamHI, 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 BamHI y *Sall*, liberándose un fragmento de CaTER de 1,2 kbp. Se digirió pUC19dSS-crt con BamHI 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.

20 25 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 BamHI/*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 EcoRI/*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.

30 35 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 EcoRI y se purificó en gel el fragmento de PT7-ald de 2245 bp. Se digirió el plásmido pBHR1 con *Scal* y EcoRI 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(BamHI) 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 EcoRI y DrdI confirmó los esperados fragmentos de 4757 y 2405 bp.

40 45 50 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. nº 78.

55 60 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(BspEI) y B-aldopt(Scal) (ID. SEC. números 87 y 88, respectivamente) que llevaban incorporados sitios de restricción BspEI y Scal dentro de los correspondientes cebadores. El producto de PCR fue digerido con BspEI y Scal. Se digirió el plásmido pBHR1 con Scal y BspEI 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 BspEI 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-BspEI AatII y B-BspEI AatII (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

5 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 10 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.

15 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 Pmel. 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 ayuste 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 Pmel, 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 Pmel 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 Spel entre los dos genes. Para añadir el gen *hbd* al casete,

el gen *hbd* fue subclonado de pCR4Blunt-TOPO-hbd como un fragmento Sall/Spel de 0,9 kbp. Se digirió el vector pFP988Dss-T-C con Sall y Spel 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 Xhol y se purificó en gel el fragmento de 0,3 kbp. Se digirió el vector pFP988Dss-T-H-C con SmaI y Xhol 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 pH01 (MoBitec). El plásmido pH01 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 pH01 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 pH01-*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 pH01, se diseñaron dos esquemas de clonación. Para ambos esquemas, se multiplicaron conjuntamente EgTER y *bdhB* mediante SOE. Posteriormente, el fragmento de EgTER-*bdh* fue clonado en pH01-*ald* creándose pH01-*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 pH01, creándose pH01-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 Hpal 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

5 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 10 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 lacB::T-H-C::erm #28 competente, formándose la cepa *B. subtilis* Δ lacB::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 15 colonias con los cebadores N31 SeqF1 y N63SeqR4.

En la estrategia de clonación alterna, se digirió pCR4Blunt-TOPO-E-B con Hpal y AatII, liberándose un fragmento de 2,4 kbp que fue purificado en gel. Se digirió el plásmido pCR4-TOPO-B/A-ald con Hpal 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 Hpal-AatII de E-B, creándose pCR4-TOPO-ald-EB. Se transformaron células de *E. coli* TOP10 con el producto de ligación y se

20 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 25 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 lacB::T-H-C::erm #28 competente, formándose la cepa *B. subtilis* Δ lacB::T-H-C::erm #23/pHT01-AEB. Se prepararon células 30 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 lacB::T-H-C::erm #28/pHT01-ald-EB y *B. subtilis* Δ lacB::T-H-C::erm #28/pHT01-AEB a matraces para sacudimiento (volumen total de

35 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 40 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, hidrocloruro 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.

45 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.

Producción de 1-butanol por las cepas <i>B. subtilis</i> Δ lacB::T-H-C::erm y <i>B. subtilis</i> Δ lacB::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> ΔsacB::T-H-C::erm y <i>B. subtilis</i> ΔsacB::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 pScrl (descrito más adelante) fue subclonado en pBHR-Ptrc-ald(opt) (descrito en el Ejemplo 13) en este organismo. Los genes para

5 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

10 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 15 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 pScrl.

20 Se digirió el plásmido pScrl con Xhol y se trató con el fragmento Klenow de DNA polimerasa para despuntar los extremos. Luego se digirió el plásmido con Agel 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 Agel y Nael. 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 McConkey que 30 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*.

35 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 Agel 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 McConkey que 40 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*.

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

- 5 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.
- 15

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.

20 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.

25

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.
- 5 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.
- 10 10 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 DO_{550} de partida $\leq 0,1$ unidades, y fueron tapados con tapas ventiladas e incubados a 34 °C con sacudimiento a 300 rpm.
- 15 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.

20

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 acetyltransferasa (*thlA*, tiolasa), la 3-hidroxibutiril-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, *adhI* y *adhII*.

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 cassetes 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 cassetes de expresión para cada gen. Los cassetes de expresión fueron opcionalmente combinados en un único vector mediante clonación con reparación de huecos, como se describe más adelante. Por ejemplo, los tres cassetes 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.

- 25 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.
- 30 Los plásmidos empleados en este Ejemplo fueron los vectores lanzadera pRS423, pRS424, pRS425 y pRS426 de *E.*

5 *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 μ m 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 his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0 ura3 Δ 0) (Research Genetics, Huntsville, Alabama, EE.UU.; también disponible de ATCC 201388), y una cepa diploide, BY4743 (MATa/alpha his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0, lys2 Δ 0/LYS2 MET15/met15 Δ 0 ura3 Δ 0/ura3 Δ 0) (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.

10 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 \geq 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.

15 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).

20 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.

25 Construcción del plásmido NY102 para la coexpresión de *thIA* y *hbd*. Se construyó un número de vectores de expresión duales para la coexpresión de los genes *thIA* y *hbd*. El gen ERG10 de *Saccharomyces cerevisiae* es un ortólogo funcional del gen *thIA*. 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. nº 164) y OT732 (ID. SEC. nº 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. nº 166) y OT734 (ID. SEC. nº 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. nº 168) y OT736 (ID. SEC. nº 169) para PCR. Se multiplicó GAL1t a partir de DNA genómico de BY4743 usando los cebadores OT737 (ID. SEC. nº 170) y OT738 (ID. SEC. nº 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-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 sustituyó 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 sustituyó el promotor GAL10 de pNY7 por el promotor CUP1 y se sustituyó 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 Ncol 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-crt-GPM1). Despues 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 *tery* (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.

5 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 Ncol y Sfil (ID. SEC. nº 188, y un producto de PCR del terminador GPD [sintetizado a partir de los cebadores OT754 (ID. SEC. nº 192) y 10 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 15 *BY4741* que contenían pNY8 fueron analizados en cuanto a actividad Ald, y la actividad específica hacia butiril-CoA fue aproximadamente 0,07 U/mg.

20 Construcción de los plásmidos pNY9 y pNY13 para la expresión de *ter*. El gen *tery* 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 *tery* 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 25 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-tery-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.

30 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-tery-FBA1t fue aislado del plásmido pNY9 por digestión con las enzimas de restricción SacI y Xhol y fue ligado en el vector pRS423 que había sido cortado con estas dos mismas enzimas. El nuevo plásmido, pNY13 (pRS423-FBA1-tery-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.

35 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 40 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*, 45 *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.

50 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.

55 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 DPD5213 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-hidroxibutiril-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 cloran 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 *IdhL1*, mediante recombinación homóloga. Para construir el vector de direccionamiento para integración de *IdhL1*, un fragmento de DNA de *Lactobacillus plantarum* (Genbank NC_004567) con homología con respecto a *IdhL*, es multiplicado por PCR con los cebadores LDH EcoRV F (ID. SEC. nº 198) y LDH AatIIR (ID. SEC. nº 199). El fragmento de PCR de 1986 bp es clonado en pCR4Blunt-TOPO y es secuenciado. El clon pCR4Blunt-TOPO-*IdhL1* es digerido con EcoRV y AatII, liberándose un fragmento de *IdhL1* 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 *IdhL1* 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-*IdhL*.

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 Mlul/Swal de 828 bp y es purificado en gel. El vector de integración pFP988-IdhL que contiene homología con IdhL es digerido con Mlul y Swal, 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-DIdhL::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-DIdhL::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 hibrido 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 Xhol 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 Xhol y BamHI, y el fragmento de P11-T-H-C de 3034 bp es purificado en gel. Se digiere pFP988-DIdhL::Cm con Xhol 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-DIdhL-P11-THC::Cm.

Integración de pFP988-DIdhL-P11-THC::Cm en *L. plantarum* BAA-793 para formar *L. plantarum* ΔIdhL1::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 PIdhL F (ID. SEC. nº 204) y PIdhL 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-PIdhL, es digerido con SacI y BamHI, liberándose el fragmento de pIdhL de 359 bp.

Se digiere pH01-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 PIdhL y el vector para crear pH01-PIdhL-ald-EB.

Para subclonar el casete de promotor IdhL-ald-EgTER-bdh, se digiere pH01-PIdhL-ald-EB con Mlul 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 PIdhL-AEB. El plásmido pTRKH3 es digerido con Sall y EcoRV, y el fragmento de vector purificado en gel es ligado con el fragmento PIdhL-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* ΔIdhL1::T-H-C::Cm con el plásmido de expresión pTRKH3-ald-E-B por electroporación de la manera anteriormente descrita.

Se inocula *L. plantarum* ΔIdhL1::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 nisin 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(Pmel 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.

10 Se digiere el plásmido pTRKH3-PnisA con Pmel 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 Pmel 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 *bhdB* (ID. SEC. nº 44). El plásmido resultante es denominado pTRKH3-PnisA-*ald-EgTER-bdhB* (= pTRKH3-A-E-B).

15 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 *bhdB*. 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.

20 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).

25 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)], nisin (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 ttgttaatgc tagtgcagta agaacagcga ttggatctta tgaaaagtct	60
cttaaggatg taccagcagt agattttagga gctacagcta taaaggaagc agttaaaaaa	120
gcaggaataa aaccagagga tgttaatgaa gtcattttag gaaatgttct tcaagcaggt	180
ttaggacaga atccagcaag acaggcatct tttaaagcag gattaccagt tgaaattcca	240
gctatgacta ttaataaggt ttgtggttca ggacttagaa cagttagctt agcagcacaa	300
attataaaaag caggagatgc tgacgtaata atagcaggtg gtatggaaaa tatgtctaga	360
gctccttact tagcgaataa cgctagatgg ggatataaaaa tgggaaacgc taaatttgtt	420
gatgaaatga tcactgacgg attgtggat gcatttaatg attaccacat gggataaaca	480
gcagaaaaaca tagctgagag atgaaacatt tcaagagaag aacaagatga gttgctctt	540
gcatcacaaa aaaaagctga agaagctata aaatcaggtc aatttaaaaga taaaaatgtt	600
cctgtagtaa tttaaggcag aaagggagaa actgttagtt atacagatga gcaccctaga	660
tttggatcaa ctatagaagg acttgcaaaa ttaaaacctg cttcaaaaa agatggaca	720
gttacagctg gtaatgcattc aggattaaat gactgtgcag cagttactgt aatcatgagt	780
gcagaaaaag cttaaagagct tggagtaaaa ccacttgcta agatagttc ttatggttca	840
gcaggagttt acccagcaat aatggatata ggacctttct atgcaacaaa agcagctatt	900
gaaaaagcag gttggacagt tggatgatc gatataatg aatcaaatga agctttgca	960
gctcaagtt tagcgttagc aaaagattttta aaatttgata tgaataaaatg aatgtaaat	1020
ggaggagcta ttgccttgg tcatccaatt ggagcatcag gtgcagaat actcgttact	1080
cttgcacacg caatgcacaaa aagagatgca aaaaaaggct tagcaacttt atgtataatgtt	1140
ggcggacaag gaacagcaat attgctagaa aagtgcgt	1179

<210> 2

<211> 392

<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 Ala Glu Gln 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 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 Gln Gly
370 375 380

Thr Ala Ile Leu Leu Glu Lys Cys
385 390

<210> 3

<211> 1179

<212> DNA

5 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 3

atgagagatg tagtaatagt aagtgtgtta agaactgcaa taggagcata tggaaaaaca	60
ttaaaggatg tacctgcaac agagtttaga gctatagtaa taaaggaagc tgtaagaaga	120
gctaatataa atccaaatga gattaatgaa gttattttg gaaatgtact tcaagctgga	180
ttaggccaaa acccagcaag acaagcagca gtaaaagcag gattacctt agaaacacct	240
gcgtttacaa tcaataaggt ttgtggttca ggtttaagat ctataagttt agcagctcaa	300
attataaaag ctggagatgc tgataccatt gtagtaggtg gtatggaaaa tatgtctaga	360
tcaccatatt tgattaacaa tcagagatgg ggtcaaagaa tggagatag tgaatttagtt	420
gatgaaatga taaaggatgg tttgtggat gcatttaatg gatatcatat gggagtaact	480
gcagaaaata ttgcagaaca atgaaatata acaagagaag agcaagatga attttcactt	540
atgtcacaac aaaaagctga aaaagccatt aaaaatggag aatttaagga tgaaatagtt	600
cctgtattaa taaagactaa aaaaggtgaa atagtctttg atcaagatga atttcctaga	660
ttcggaaaca ctattgaagc attaagaaaa cttaaaccta ttttcaagga aaatggtact	720
gttacagcag gtaatgcac cggattaaat gatggagctg cagcactagt aataatgagc	780
gctgataaag ctaacgctct cggaaataaaa ccacttgcta agattacttc ttacggatca	840

tatggggtag atccatcaat aatgggatat ggagctttt atgcactaa agctgcctta 900
 gataaaatta atttaaaacc tgaagactta gatttaattt aagctaacga ggcatatgct 960
 tctcaaagta tagcagtaac tagagattt aatttagata tgagtaaagt taatgttaat 1020
 ggtggagcta tagcacttgg acatccaata ggtgcacgtat tttagtaaca 1080
 ttactatacg ctatgcaaaa aagagattca aaaaaaggtc ttgctactct atgtattgg 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 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 tcaataaaaaa tctttctaaa ttagttaaaa aaggaaagat agaagaagct	180
actaaagttg aaatcttaac tagaatttcc ggaacagttg accttaatat ggtagctgat	240

tgcgat tag ttatagaagc agctgtt gaa agaatggata taaaaagca gattttgct 300
 gacttagaca atatatgca a cccagaaaca attcttgcat caaatacatc atcactttca 360
 ataacagaag tggcatcagc aactaaaaga cctgataagg ttataggtat gcatttctt 420
 aatccagctc ctgttatgaa gctttagag gtaataagag gaatagctac atcacaagaa 480
 actttttagt cagttaaaga gacatctata gcaataggaa aagatcctgt agaagtagca 540
 gaagcaccag gatttgggt aaatagaata ttaataccaa tgattaatga agcagttgg 600
 atattagcag aaggaatagc ttcagtagaa gacatagata aagctatgaa acttggagct 660
 aatcacccaa tgggaccatt agaatttagt gattttatag gtcttgat atgtcttgct 720
 ataatggatg ttttatactc agaaactgga gattctaagt atagaccaca tacattactt 780
 aagaagtatg taagagcagg atggctt gaa agaaaatcag gaaaagg tttt 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 ccttggaaaag gaaggtaaag ttgctgtagt taccattaac 60
 agacctaaag cattaaatgc gttaaatagt gatacactaa aagaaatgga ttatgttata 120
 ggtgaaattg aaaatgatag cgaagtactt gcagtaattt taactggagc aggagaaaaaa 180
 tcatttttag caggagcaga tatttctgag atgaaggaaa tgaataccat tgaaggtaga 240
 aaattcggga tacttggaaa taaagtgttt agaagattag aacttcttga aaagcctgta 300
 atagcagctg ttaatggttt tgcttttagga ggcggatgctg aaatagctat gtcttgtat 360
 ataagaatag cttcaagcaa cgcaagattt ggtcaaccag aagtaggtct cggaataaca 420
 cctggttttg gtggtacaca aagactttca agattagttt gaatggccat ggcaaagcag 480
 cttatattta ctgcacaaaaa tataaggca gatgaagcat taagaatcgg acttgtaaat 540
 aaggttagtag aacctagtga attaatgaat acagcaaaag aaattgcaaa caaaattgtg 600
 agcaatgctc cagtagctgt taagttaagc aaacaggctt ttaatagagg aatgcagtgt 660
 gatattgata ctgcttttagc atttgaatca gaagcattt gagaatgctt ttcaacagag 720
 gatcaaaagg atgcaatgac agcttcata gagaaaaagaa 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

atgatagtaa aagcaaagtt	tgtaaaagga	tttatcagag	atgtacatcc	ttatgggtgc	60	
agaagggaag	tactaaatca	aatagattat	tgtaaaagg	ctattgggtt	taggggacca	120
aagaagggtt	taattgttg	agcctcatct	gggtttggtc	ttgctactag	aatttcagtt	180
gcatttggag	gtccagaagc	tcacacaatt	ggagtatcct	atgaaacagg	agctacagat	240
agaagaatag	gaacagcggg	atggtataat	aacatatttt	ttaaagaatt	tgtaaaaaaaa	300
aaaggattag	ttgcaaaaaa	cttcatttgag	gatgcctttt	ctaataac	caaagataaa	360
gttattaagt	atataaagga	tgaatttggt	aaaatagatt	tatttggta	tagtttagct	420
gcccctagga	gaaaggacta	taaaactgga	aatgtttata	cttcaagaat	aaaaacaatt	480
tttaggagatt	ttgagggacc	gactatttgat	gttggaaagag	acgagattac	tttaaaaaaaaag	540
gttagtagtg	ctagcattga	agaaattgaa	gaaactagaa	aggtatggg	tggagaggat	600
tggcaagagt	ggtgtgaaga	gctgctttat	gaagattgtt	tttcggataa	agcaactacc	660
atagcatact	cgtatataagg	atccccaaaga	acctacaaga	tatataagaga	aggtactata	720
ggaatagcta	aaaaggatct	tgaagataag	gctaagctta	taaatgaaaa	acttaacaga	780
gttataagtg	gtagagccctt	tgtgtctgtg	aataaagcat	tagttacaaa	agcaagtgc	840
tatattccaa	ctttccctct	ttatgcagct	attttatata	aggtcatgaa	agaaaaaaaaat	900
attcatgaaa	attgtattat	gcaaatttgag	agaatgtttt	ctgaaaaaat	atattcaaata	960
gaaaaaatac	aatttgatga	caagggaga	ttaaggatgg	acgatttaga	gcctgaaaa	1020
gacgttcaag	acgaagttga	tagaatatgg	agtaatattta	ctcctgaaaa	ttttaaggaa	1080
ttatctgatt	ataagggata	caaaaaagaa	ttcatgaact	taaacggttt	tgatctagat	1140
ggggttgatt	atagtaaaga	cctggatata	gaatttattaa	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				
5 <213> Clostridium beijerinckii				
<400> 11				
atgaataaaag acacactaat acctacaact aaagatttaa aagtaaaaac aaatggtgaa			60	
aacattaatt taaagaacta caaggataat tcttcatgtt tcggagtatt cggaaatgtt			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 tgcttggtca			360	
gggtataatg gtcttacagt tgttagaaatg tctccatatg gtgttatagg tgcaataact			420	
ccttctacga atccaaactga aactgtaata tgtaatagca taggcatgat agctgctgga			480	
aatgctgttag tatttaacgg acacccatgc gctaaaaat gtgttgcctt tgctgttcaa			540	
atgataaaata aggcaattat ttcatgtggc ggtcctgaaa atctagtaac aactataaaa			600	
aatccaaacta tggagtctct agatgcaatt attaagcatc cttcaataaaa acttctttgc			660	
ggaactgggg gtccaggaat ggtaaaaacc ctcttaaatt ctggtaagaa agctataaggt			720	
gctggtgctg gaaatccacc agttattgtt gatgatactg ctgatataga aaaggctgg			780	
aggagcatca ttgaaggctg ttctttgtt aataattac cttgttattgc agaaaaagaa			840	
gtatgggtt ttgagaatgt tgcagatgat ttaatatcta acatgctaaa aaataatgct			900	

gtaattataa atgaagatca agtatcaaaa ttaatagatt tagtattaca aaaaaataat 960
 gaaactcaag aatactttat aaacaaaaaa tggtaggaa aagatgcaaa attattctta 1020
 gatgaaatag atgttgagtc tccttcaa at gttaaatgca taatctgcga agttaatgca 1080
 aatcatccat ttgttatgac agaactcatg atgccaatat tgccaaatgt aagagttaaa 1140
 gatataatg aagctattaa atatgcaag atagcagaac aaaatagaaa acatagtgcc 1200
 tatattttat ctaaaaatat agacaaccta aatagattt aagagaat agatactact 1260
 attttgtaa agaatgctaa atctttgct ggtgtgggat atgaagcaga aggatttaca 1320
 actttcacta ttgctggatc tactggtag 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 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 agaattttt tcggtaaaga taagataaat	60
gtacttggaa gagagcttaa aaaatatggt tctaaagtgc ttatagttt tggtggagga	120
agtataaaga gaaatggaat atatgataaa gctgtaaagta tacttggaaa aaacagtatt	180
aaattttatg aacttgccagg agtagagcca aatccaagag taactacagt tgaaaaagga	240
gttaaaatat gttagaaaaa tggagttgaa gtagtactag ctataggtgg aggaagtgc	300
atagattgcg caaagggttat agcgcgcgc tgtgaatatg atggaaatcc atggatatt	360
gtgttagatg gctcaaaaat aaaaagggtg cttcctatag ctagtatatt aaccattgct	420
gcaacaggat cagaaatgga tacgtggcga gtaataaata atatggatac aaacgaaaaa	480
ctaattgcgg cacatccaga tatggctcct aagtttcta tattagatcc aacgtatacg	540
tataccgtac ctaccaatca aacagcagca ggaacagctg atattatgag tcatatattt	600
gaggtgtatt ttagtaatac aaaaacagca tatttgcagg atagaatggc agaagcgtta	660
ttaagaactt gtattaaata tggaggaata gctcttgaga agccgatga ttatgaggca	720
agagccaatc taatgtggc ttcaagtctt gcgataaaatg gacttttaac atatggtaaa	780
gacactaatt ggagtgtaca cttaatggaa catgaattaa gtgcttatta cgacataaca	840
cacggcgtag ggcttgcaat tttaacacct aattggatgg agtataattt aaataatgat	900
acagtgtaca agtttgttga atatggtga aatgtttggg gaatagacaa agaaaaaaat	960
cactatgaca tagcacatca agcaatacaa aaaacaagag attacattgt aaatgtacta	1020
ggtttaccat ctagactgag agatgttggc attgaagaag aaaaattggc cataatggca	1080
aaggaatcag taaagcttac aggaggaacc ataggaaacc taagaccagt aaacgcctcc	1140
gaagtcctac aaatattcaa aaaatctgtg taaaacgcct ccgaagtcct acaaataattc	1200
aaaaaatctg tgtaa	1215

5 <210> 14

<211> 390

<212> PRT

<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 14

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 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

5 <213> clostridium acetobutylicum

<400> 15

atgcttaagtt ttgattattc aataccaaact aaagttttt ttggaaaagg aaaaatagac	60
gtaattggag aagaaattaa gaaatatggc tcaagagtgc ttatagttt tggcggagga	120
agtataaaaa ggaacggtat atatgataga gcaacagcta tattaaaaga aaacaatata	180
gctttctatg aactttcagg agtagagcca aatccttaga taacaacagt aaaaaaaggc	240
atagaaatat gtagagaaaa taatgtggat ttagtattag caataggggg aggaagtgca	300
atagactgtt ctaaggtaat tgcagctgga gtttattatg atggcgatac atgggacatg	360
gtttaagatc catctaaaat aactaaagtt cttccaattt caagtatact tactcttca	420
gcaacagggt ctgaaatgga tcaaattgca gtaatttcaa atatggagac taatgaaaag	480
cttggagtag gacatgtga tatgagacct aaattttcag tggtagatcc tacatatact	540
tttacagtac ctaaaaatca aacagcagcg ggaacagctg acattatgag tcacaccc	600
gaatcttact ttagtgggt tgaagggtct tatgtgcagg acggatagc agaagcaatc	660
ttaagaacat gtataaagta tggaaaaata gcaatggaga agactgatga ttacgaggct	720
agagctaatt tgatgtgggc ttcaagttt gctataatg gtctattatc acttggtaag	780
gatagaaaat ggagttgtca tcctatggaa cacgagttaa gtgcataatc tgatataaca	840

catggtag gacttgcatttacacccat aattggatgg aatataattct aaatgacgat 900
 acacttcata aatttgcatttcc ttatgaaata aatgtttggg gaatagacaa gaacaaagat 960
 aactatgaaa tagcacgaga ggctattaaa aatacgagag aatactttaa ttcattgggt 1020
 attccttcaa agcttagaga agttgaata gaaaaagata aactagaact aatggcaaag 1080
 caagctgtta gaaattctgg aggaacaata ggaagttaa 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 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 tcatcctg 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	cattgataa 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 agtttgatt attcaatac		29
40	<210>	24	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
45	<223>	Cebador	
	<400>	24	
	ttaataagat ttttaaataa tctca		25
	<210>	25	
	<211>	30	
50	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia Artificial	

<220>		
<223>	Cebador	
<400>	25	
	caccatgggtt gatttcgaat attcaataacc	30
5	<210>	26
	<211>	25
	<212>	DNA
	<213>	Secuencia Artificial
	<220>	
10	<223>	Cebador
	<400>	26
	ttcacacagat ttttgaata ttgt	25
	<210>	27
	<211>	32
15	<212>	DNA
	<213>	Secuencia Artificial
	<220>	
	<223>	Cebador
	<400>	27
20	caccatgaga gatgttagtaa tagtaagtgc tg	32
	<210>	28
	<211>	24
	<212>	DNA
	<213>	Secuencia Artificial
25	<220>	
	<223>	Cebador
	<400>	28
	ccgcaattgt atccatattg aacc	24
30	<210>	29
	<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 ctttggaaat gcgc	24
	<210> 33	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 33	
	catgcatca aaggagggtta gttagaatgaa agaag	35
20	<210> 34	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 34	
	gtcctgcagg gcgcgccaa tactttctag cactttc	38
	<210> 35	
	<211> 39	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 35	
	catgtcgaca aaggagggtct gttagaatgaa aaaggatag	39
35	<210> 36	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador	
	<400> 36	
	gtcgcatgcc ttgtaaactt atttgaa	28
	<210> 37	
	<211> 44	
45	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 37	
50	catagatctg gatccaaagg agggtgagga 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	ttacccctta tctatTTTG	30
25	<210>	41	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
30	<223>	Cebador	
	<400>	41	
	catgccccgg	ggtcaccaaa ggaggaatag ttcatgaata aa	42
	<210>	42	
	<211>	32	
35	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	42	
40	catggtaac	aagaagttag ccggcaagta ca	32
	<210>	43	
	<211>	41	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
45	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	43	
	catggtaac	aaaggagggg taaaaatggt tgatttcgaa t	41
	<210>	44	
50	<211>	37	
	<212>	DNA	

	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	44	
5	catggcatgc	gtttaaacgt	37
	aggttacac	agatttt	
	<210>	45	
	<211>	17	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
10	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	45	
	gtaaaacgac	ggccagt	17
15	<210>	46	
	<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	22
30	<210>	48	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
35	<223>	Cebador	
	<400>	48	
	ccaacctgct	tttcaatag	24
	ctgc		
40	<210>	49	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	49	
45	cagagatggg	gtcaaagaat	21
	g		
	<210>	50	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
50	<220>		

	<223>	Cebador	
	<400>	50	
	gtggtttat	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	24
	tggc		
20	<210>	53	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
25	<223>	Cebador	
	<400>	53	
	gcctcatctg	ggTTGGTCT	22
	tg		
	<210>	54	
	<211>	28	
30	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	54	
35	cgcctaggag	aaaggactat	28
	aaaactgg		
	<210>	55	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
40	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	55	
	cagagtata	ggTGGTAGAG	22
	cc		
45	<210>	56	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
50	<400>	56	

	ccatcccgt gttcctattc ttct	24
	<210> 57	
	<211> 22	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 57	
	ccaatccctc 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	ccaaactatgg aatccctaga tgc	23
	<210> 60	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 60	
	gcatagtctg cgaagtaaat 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	
	gcctcaatg atactttac 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	
	cctcccccata tgtgtttctt cc	22
	<210> 66	
25	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
30	<400> 66	
	gttgaagtag tactagctat ag	22
	<210> 67	
	<211> 22	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 67	
	gacataaacac acggcgtagg gc	22
40	<210> 68	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador	
	<400> 68	
	taagtgtaca ctccaattag tg	22
	<210> 69	
	<211> 24	
50	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	69	
	gccccatctaac acaatataccc atgg		24
5	<210>	70	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
10	<223>	Cebador	
	<400>	70	
	gcgatacatg ggacatgggtt aaag		24
	<210>	71	
	<211>	22	
15	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	71	
20	tgcacttaac tcgtgttcca ta		22
	<210>	72	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	72	
	gttagccggc aagtacacat c		21
30	<210>	73	
	<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 ggcgcgcgg gacgcgttt tgaaaataat gaaaact		47
45	<210>	75	
	<211>	79	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
50	<223>	Cebador	

<400> 75
catgaagctt gttaaactc ggtgacccctg aaaataatga aaacttatat tgaaaaaa 60
ataataaaaa cttatattt 79

5 <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
cgccgtgaag ttctgaatca gatcgactac tgcaaaaaag ccattggctt tcgcggccca
aagaaagtgc tgatcggtgg tgcttcctct ggcttcggtc tggctacccg catttcgtg
gcgttcggtg gcccagaagc ccacactatc ggcgtcagct atgaaaccgg tgcgaccgat
cgccgtattg gcacagcagg gtggtataac aatattttct ttaaagaatt tgccaaaaag
aaaggcctgg tggcaaaaaa ctttatcgaa gacgccttct cgaacgaaac caaggacaaa
gtcatcaaattt atattaaaga cgaatttggc aaaatcgatc tgttcggtta ctcgctggca
gcaccgcgtc gtaaggatta taagactggg aacgtttata cctcacgtat taaaacgatc
ctgggtgatt ttgaagggcc gactatcgat gtggAACgtg atgaaattac actgaaaaag
gtctcatctg cgtcaatcgaa agagattgaa gaaacccgta aggtgatggg cgccgaaagat
tggcaagagt ggtgtgaaga actgctgtac gaagattgtt tcagtataa agccaccacc
atgccttattt cctatatcggtt tcctcctcgac acctacaaaaa tctaccgcga aggcaactatc
ggcattgcga aaaaggatct ggaagataag gcaaaactga tcaacgagaa gctgaatcg
gtcattggcg ggcgcgcatt cgtagcgtg aataaagccc tggttactaa ggcgagcgc
tatattccga ccttcctct gtacggcga attctgtata aagttatgaa agaaaagaat
attcacgaaa actgcattat gcaaattgaa cgcatgtttt ccgagaaaaat ttattcaaatt
gaaaagattc aatttgcgt taaaggtcgatc ctgcgtatgg atgacctggatc gctgcgtaa
gatgttcagg atgaaagttaga ccgtatgg agcaatatta caccggagaa ttttaaggaa
ctgagcgtact ataaaggcta caaaaaagaa tttatgaaacc tgaatggatt tgatctggac
ggcgttggattt attccaaagggta tctggacattt gaaactgcgtc qccaaactggaa accataaa
1197

<210> 77

<211> 1224

<212> DNA

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> EgTE

atggcgatgt ttacgaccac cgcaaaagtt attcagccga aaattcgtgg ttttatttgc	60
accaccaccc acccgattgg ttgcgaaaaa cgtgttcagg aagaaatcgc atacgcacgc	120
gcmcacccgc cgaccagccc gggtccgaaa cgtgtgcgg ttattggctg cagtacggc	180
tatggcctga gcacccgtat caccgcggcc tttggttatc aggccgcaac cctgggcgtg	240
tttctggcag gcccgcgcac caaaggccgt ccggccgcgg cgggttggta taatacggtt	300
gcgttcgaaa aagccgcctt ggaagcaggt ctgtatgcac gttctctgaa tggtgatgcg	360
ttcgattcta ccacgaaagc ccgcaccgtg gaagcaatta aacgtgatct gggtaccgtt	420
gatctggtgg tgtatagcat tgcagcgcgc aaacgtaccg atccggccac cggcgtgcgt	480
cataaagcgt gcctgaaacc gattggtgca acctacacca atcgtacggt gaacaccgat	540
aaagcagaag ttaccgatgt gaggattgaa ccggccagtc cggaagaaat cgcagatacc	600
gtgaaagttt tgggtggcga agattggaa ctgtggattc aggcaactgag cgaagccggc	660
gtgctggccg aaggcgc当地 aaccgttgcg tattctata ttggccggaa aatgacgtgg	720
ccggtgtatt ggagtggcac cattggcga gccaaaaaag atgttgaaaa agcggcgaaa	780
cgcacccatccc agcagtaacgg ctgtccggcg tatccggttt ttgccaagc gctggtgacc	840
caggccagta gcccattcc ggtggtgccg ctgtatattt gcctgctgta tcgtgttatg	900
aaagaaaaag gcacccatga aggctgcatt gaacagatgg tgcgtctgct gacgacgaaa	960
ctgtatccgg aaaatggtgc gccgatcgtg gatgaagcgg gccgtgtgcg tggatgtat	1020
tggaaatgg cagaagatgt tcagcaggca gttaaagatc tggatggcca ggtgagtacg	1080
gccaatctga aagatattag cgattttgcg gtttatcaga ccgaatttct gcgtctgtt	1140
ggctttggta ttgatgggtt ggattacgtat cagccgggtt atgttgaaagc ggatctgccc	1200
agcggccccc agcagtaagt cgac	1224

<210> 78

<211> 1498

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 78

<210> 79

<211> 6509

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pFP988

<400> 79

tcgaggcccc gcacatacga aaagactggc tggaaacatt gagccttga tgactgtga 60
tttggctgaa gaagtggatc gattgttga gaaaagaaga agaccataaaa aataccttgt 120

ctgtcatcag acagggtatt tttatgctg tccagactgt ccgctgtgt aaaaatagga 180
ataaaggggg gttgttatta tttactgat atgtaaaata taatttgtat aaggaattgt 240
gagcggataa caattcctac gaaaatgaga gggagaggaa acatgattca aaaacgaaag 300
cgacagttt cgttcagact tgtgctttag tgcacgctgt tatttgcag tttgccatt 360
acaacacat cagccggatc ccaccatcac catcaccatt aagaattcct agaaactcca 420
agctatctt aaaaaatcta gtaaatgcac gagcaacatc tttgttgct cagtcattt 480
tttattttgt acactagata tttcttctcc gcttaaatca tcaaagaaat ctttatcact 540
tgtaaccagt ccgtccacat gtcgaattgc atctgaccga atttacgtt tccctgaata 600
attctcatca atcgtttcat caattttatc tttatacttt atatttgtg cgtaatcaa 660
atcataattt ttatatgttt cctcatgatt tatgtctta ttattatagt ttttattctc 720
tctttgatta tgtcttgta tcccggttgt attacttgat cctttaactc tggcaacccct 780
caaaattgaa tgagacatgc tacacctccg gataataat atatataaac gtatatagt 840
ttcataaaagt ctaacacact agacttattt acttcgtaat taagtcgtta aaccgtgtgc 900
tctacgacca aaactataaa acctttaaga actttcttt tttacaagaa aaaagaaatt 960
agataaaatct ctcatatctt ttattcaata atcgcacccg attgcagtat aaattnaacg 1020
atcactcatc atgttcatat ttatcagagc tcgtgtata attatactaa ttttataagg 1080
aggaaaaaat atggcattt ttagtatttt tgaatcagc acagttcatt atcaaccaa 1140
caaaaaataa gtggttataa tgaatcgtta ataagaaaa ttcatataac caaattaaag 1200
agggttataa tgaacgagaa aaatataaaa cacagtcaaa actttattac ttcaaaacat 1260
aatatagata aaataatgac aaatataaga ttaaatgaac atgataatat cttgaaatc 1320
ggctcaggaa aaggccattt tacccttgaa ttagtaaaga ggtgttaattt cgtaactgcc 1380
attgaaatag accataaattt atgcaaaact acagaaaaata aacttggta tcacgataat 1440
ttccaagttt taaacaagga tatattgcag tttaaatttc ctaaaaacca atcctataaa 1500
atatatggta atataccttta taacataagt acggatataa tacgcaaaat tgttttgtat 1560
agtatacgta atgagattta ttaatcgtg gaatacggtt ttgtctaaag attattaaat 1620
acaacacgtt cattggcattt acttttaatg gcagaagttg atatttctat attaagtatg 1680
gttccaagag aatattttca tcctaaacccaaatgtaata gctcacttt cagattaatg 1740
agaaaaaaaat caagaatatc acacaaaaagat aaacaaaaagt ataatttattt cgttatgaaa 1800
tgggttaaca aagaatacaa gaaaatattt acaaaaaatc aattnaacaa ttccttaaaa 1860
catgcaggaa ttgacgattt aaacaatattt agcttgcac aattcttatac tctttcaat 1920
agctataat tatttaataa gtaagttaaag ggtgcagttt catgcgtgaa ggcaactaca 1980
gctcaggcga caaccatacg ctgagagatc ctcactacgt agaagataaa ggccacaaat 2040
acttagtattt tgaagcaaac actggaaactg aagatggta ccaaggcga qaattttat 2100

ttaacaaagc atactatggc aaaagcacat cattttccg tcaagaaagt caaaaacttc	2160
tgcaaagcga taaaaaacgc acggctgagt tagcaaacgg cgctctcggt atgattgagc	2220
taaacgatga ttacacactg aaaaaagtga tgaaaccgct gattgcatct aacacagtaa	2280
cagatgaaat tgaacgcgcg aacgtttta aaatgaacgg caaatggtac ctgttcaactg	2340
actccccggg ataaaaatg acgattgacg gcattacgtc taacgatatt tacatgcttg	2400
gttatgtttc taattttta actggccat acaagccgct gaacaaaact ggccttgt	2460
taaaaatgga tcttgatcct aacgatgtaa cctttactta ctcacacttc gctgtaccc	2520
aaggcggaaagg aaacaatgtc gtgattacaa gctatatgac aaacagagga ttctacgcag	2580
acaaacaatc aacgtttgcg ccaagcttgc atgcgagagt agggactgc caggcatcaa	2640
ataaaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gccttcgtt ttatctgttg tttgtcggtg	2700
aacgctctcc tgagttaggac aaatccgccc ggagcggatt tgaacgttgc gaagcaacgg	2760
cccgagggt ggcggcagg acgcccgc aaaaactgcca ggcataaat taagcagaag	2820
gccatcctga cggatggcct ttttgcgtt ctacaaactc tttttgttta tttttctaaa	2880
tacattcaaa tatgtatccg ctcatgctcc ggatctgcgat cgccaggatgc tgctggctac	2940
cctgtggAAC acctacatct gtatTAACGA agcgctggca ttgaccctga gtgatTTTC	3000
tctggtcccg ccgcattccat accgcccagg ttttaccctc acaacgttcc agtaaccggg	3060
catgttcatc atcagtaacc cgtatcgtga gcatcctctc tcgtttcatc ggtatcatta	3120
cccccatgaa cagaaattcc cccttacacg gaggcatcaa gtgaccaaac agaaaaaaac	3180
cgccttaac atggcccgct ttatcagaag ccagacatta acgctctgg agaaactcaa	3240
c gagctggac gcggatgaac aggacgacat ctgtgaatcg cttcacgacc acgctgatga	3300
gctttaccgc agctgcctcg cgcgttccgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca	3360
gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagccccgtca	3420
gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggcgcagcc atgaccaggat cactgatgca	3480
tagcggagtg tatactggct taactatgct gcatcagac agattgtact gagagtgcac	3540
catatgcgtt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct	3600
tccgcttcct cgctcaactga ctgcgtgcgc tcggcggttc ggctgcggcg agcggtatca	3660
gctcaactcaa aggccgtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc agggaaagaac	3720
atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcggtt	3780
ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtgg	3840
cggaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaaagctc ctcgtgcgc	3900
tctccgttcc cgaccctgccc gcttaccgga tacctgtccg ctttctccc ttcggaaagc	3960
gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcaggat cggtaggt cgttcgctcc	4020
aagctgggct gtgtgcacga acccccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac	4080
tatcgcttt agtccaaccc ggtaagacac gacttacgc cactggcagc agccactgg	4140

aacaggatta	gcagagcgag	gtatgttaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	gtggtggcct	4200
aactacggct	acactagaag	gacagtattt	ggtatctgcg	ctctgctgaa	gccagttacc	4260
ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaacaaa	ccaccgctgg	tagcggtgg	4320
tttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	agatcctttg	4380
atcttttcta	cggggtctga	cgctcagtgg	aacgaaaact	cacgtaagg	gattttggtc	4440
atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atcctttaa	attaaaaatg	aagttttaaa	4500
tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	aatcagttag	4560
gcacctatct	cagcgatctg	tctatccgt	tcatccatag	ttgcctgact	ccccgtcgt	4620
tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	tctggcccca	gtgctgcaat	gataccgcga	4680
gacccacgct	caccggctcc	agatttatca	gcaataaaacc	agccagccgg	aagggccgag	4740
cgcagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgcc	tccatccagt	ctattaattg	ttgccgggaa	4800
gctagagtaa	gtagttcgcc	agtaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	tgctgcaggc	4860
atcgtggtgt	cacgctcgtc	gtttggtatg	gcttcattca	gctccggttc	ccaacgatca	4920
aggcgagtt	catgatcccc	catgttgtgc	aaaaaaagcg	ttagtcctt	cggtccctccg	4980
atcggtgtca	gaagtaagtt	ggccgcagtg	ttatcactca	tggttatggc	agcactgcat	5040
aattctctta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	tgctttctg	tgactggta	gtactcaacc	5100
aagtcttct	gagaatagt	tatgcggcga	ccgagttgct	cttgcggcgc	gtcaatacgg	5160
gataataccg	cgccacatag	cagaacttta	aaagtgctca	tcattggaaa	acgttctcg	5220
ggcgaaaaac	tctcaaggat	cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	acccactcgt	5280
gcacccaact	gattttcagc	atctttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	agcaaaaaca	5340
ggaaggcaaa	atgcccggaaa	aaagggaaata	aggcgacac	ggaaatgtt	aataactcata	5400
ctcttccttt	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcagggtt	attgtctcat	gagcggatac	5460
atatttgaat	gtattttagaa	aaataaaacaa	ataggggttc	cgcgcacatt	tcccccggaaa	5520
gtgccacctg	acgtctaaga	aaccattatt	atcatgacat	taacctataa	aaataggcgt	5580
atcacgaggc	cctttcgct	cgcgcgttcc	ggtgatgacg	gtgaaaacct	ctgacacatg	5640
cagctcccg	agacggtcac	agcttgtctg	taagcggatg	ccgggagcag	acaagcccgt	5700
cagggcgcgt	cagcgggtgt	tcatgtgcgt	aactaacttg	ccatcttcaa	acaggaggcgc	5760
tggaagaagc	agaccgctaa	cacagtacat	aaaaaaaggag	acatgaacga	tgaacatcaa	5820
aaagtttgc	aaacaagcaa	cagtattaac	ctttactacc	gcactgctgg	caggaggcgc	5880
aactcaagcg	tttgcgaaag	aaacgaacca	aaagccat	aaggaaacat	acggcatttc	5940
ccatattaca	cgcacatgata	tgctgcaaat	ccctgaacag	aaaaaaaatg	aaaaatata	6000
agttcctgaa	ttcgattcgt	ccacaattaa	aaatatctct	tctgcaaaag	gcctggacgt	6060
ttgggacagc	tggccattac	aaaacgctga	cggcactg	gcaactatc	acggctacca	6120

	catcgcttt gcattagccg gagatcctaa aaatgcggat gacačatcga tttacatgtt	6180
	ctatcaaaaa gtcggcgaaa cttctattga cagctggaaa aacgctggcc gcgtctttaa	6240
	agacagcgac aaattcgatg caaatgattc tattcctaaaa gaccaaacac aagaatggtc	6300
	aggttcagcc acatttacat ctgacggaaa aatccgttta ttctacactg atttctccgg	6360
	taaacattac ggcaaacaacaa cactgacaac tgcacaagtt aacgtatcag catcagacag	6420
	ctctttgaac atcaacggtg tagaggatta taaatcaatc tttgacggtg acggaaaaac	6480
	gtatcaaaat gtacagcatg ccacgcgtc	6509
	<210> 80	
	<211> 46	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador N85	
	<400> 80	
	catagatctg gatccaaagg agggtgagga 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 cactataggg	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	
	ggtaactgt tccggaaatt c	21
	<210> 85	

	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
5	<220>		
	<223>	Cebador T-ald(BamHI)	
	<400>	85	
		tgatctggat ccaagaagga gcccttcacc atgaataaaag acacac	46
10	<210>	86	
	<211>	54	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador B-ald(ETGER)	
15	<400>	86	
		catgccatt tcctcaccct ccttttagc cgccaagtac acatcttctt tgtc	54
	<210>	87	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
20	<220>		
	<223>	Cebador T-Ptrc(BspEI)	
	<400>	87	
		ttccgtactt ccggacgact gcacggtgca ccaatgcttc tg	42
25	<210>	88	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador B-aldopt(BspEI)	
30	<400>	88	
		cgatcttaac gtacttaac ccggcagcac 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 1.6GI	
	<400>	91	
		gcccttgaca atgccacatc ctgagcaa at aattcaacca ct	42
5	<210>	92	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
10	<223>	Promotor 1.5GI	
	<400>	92	
		gcccttgact atgccacatc ctgagcaa at aattcaacca ct	42
	<210>	93	
	<211>	39	
15	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador AFBamHI	
	<400>	93	
20	cattggatcc atgaataaa ag acacactaa at cc tacaac		39
	<210>	94	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	Cebador ARAat2	
	<400>	94	
		catgacgtca ctatgttaa caagaagttt gccggcaag	39
	<210>	95	
30	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador Directo 1(E)	
35	<400>	95	
		catgttaaca aaggaggaaa gatctatggc gatgttacg accaccgcaa	50
	<210>	96	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
40	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador inferior inverso 1(E)	
	<400>	96	
		ccctccctt ggcgcgcctt actgctgggc ggcgctcggc aga	43
45	<210>	97	
	<211>	51	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
50	<223>	Cebador superior directo 2(B)	

	<400> 97 gcccagcagt aaggcgcgcc aaaggagggg ttaaaatggt tgattcgaat t	51
5	<210> 98 <211> 42 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso 2(B)	
10	<400> 98 gtcgacgtca tactagttt cacagattt ttgaatattt gt	42
	<210> 99 <211> 47 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador Pamy/lacOF	
	<400> 99 catgtacag aattcgagct ctcgaggccc cgcacatacg aaaagac	47
20	<210> 100 <211> 52 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador Pam/la cOR	
25	<400> 100 catgtacag tttaaacata ggtcaccctc atttcgtat gaattgttat cc	52
	<210> 101 <211> 52 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador Spac F	
	<400> 101 catgtacag tttaaacata ggtcaccctc atttcgtat gaattgttat cc	52
35	<210> 102 <211> 36 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador Spac R	
40	<400> 102 catgttaaaa cggtgaccca agctggggat ccgcgg	36
	<210> 103 <211> 44 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador Top TF	
	<400> 103 catggtcac cattccggg catgcaaagg aggttagtag aatg	44

	<210> 104	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador Bot TR	
	<400> 104	
	ccttacgcg accggacta gtcaagtcga cagggcgcbc ccaatactt c	51
10	<210> 105	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Top CF	
15	<400> 105	
	cgcgccctgt cgactgact agtaccggc gcgtaaagga ggtattagtc atgaaac	57
	<210> 106	
	<211> 38	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Bot CR	
	<400> 106	
	catcgittaa acttggatcc agatccctta cctcctat	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 cattgctcac	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	
5	<400> 110 ggtctcgaa taacacctgg	20
	<210> 111	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador N5SeqF3	
	<400> 111 caagcttcat aacaggagct gg	22
15	<210> 112	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador N7SeqR2 ,	
20	<400> 112 atccccacaat ccgtcagtga 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 cgtttctg	20
	<210> 115	
	<211> 20	
40	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador N625SeqF3	
	<400> 115 gtggcgaaga ttgggaactg	20
45	<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 cggtctgata acctgcaaaa tcgc	24
	<210> 118 <211> 21 <212> DNA	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador N63SeqR2	
	<400> 118 caccagcgct ttggcaacaa c	21
20	<210> 119 <211> 23 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador N63SeqR3	
	<400> 119 gaacgtgcat acagacctgc ttc	23
	<210> 120 <211> 20	
30	<212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador N63SeqR4	
	<400> 120 cggtctgaata actttgcgg	20
35	<210> 121 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador Pamy SeqF2	
	<400> 121 gcctttgatg actgatgatt tggc	24
45	<210> 122 <211> 24 <212> DNA <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	
	gaagtggtca agacctcact	20
	<210> 125	
	<211> 24	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sacB Up	
	<400> 125	
25	cgggtttgtt actgataaag cagg	24
	<210> 126	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador sacB Dn	
	<400> 126	
	cggtagcca ttgcctgct ttta	24
	<210> 127	
35	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador HT R	
40	<400> 127	
	acaagaatct ccatggacgc gt	22
	<210> 128	
	<211> 1185	
	<212> DNA	
45	<213> Escherichia coli	
	<400> 128	
	atgaaaaatt gtgtcatcgta cagtgcggta cgtactgcta tcggtagttt taacgggtca	60
	ctcgcttcca ccagcgccat cgacctgggg gcgacagtaa ttaaagccgc cattgaacgt	120
	gcaaaaatcg attcacaaca cgttgatgaa gtgattatgg gtaacgtgtt acaagccggg	180

ctggggcaaa atccggcgcg tcagggactg ttaaaaagcg ggctggcaga aacggtgtgc 240
 ggattcacgg tcaataaaagt atgtggttcg ggtcttaaaa gtgtggcgct tgccgcccag 300
 gccattcagg caggtcaggc gcagagcatt gtggcgggg gtatgaaaaa tatgagttta 360
 gccccctact tactcgatgc aaaagcacgc tctggttatc gtcttgaga cggacaggtt 420
 tatgacgtaa tcctgcgcga tggcctgatg tgccaccc atggttatca tatggggatt 480
 accgcccggaaa acgtggctaa agagtacgga attaccctgt aaatgcagga tgaactggcg 540
 ctacattcac agcgtaaagc ggcagccgca attgagtccg gtgctttac agccgaaatc 600
 gtcccggtaa atgttgcac tcgaaaagaaa accttcgtct tcagtcaaga cgaattcccg 660
 aaagcgaatt caacggctga agcgtaggt gcattgcgcg cggccttcga taaagcagga 720
 acagtcacccg ctgggaacgc gtctggatt aacgacggtg ctgcccgtct ggtgattatg 780
 gaagaatctg cggcgctggc agcaggccctt acccccctgg ctgcattaa aagttatgcc 840
 agcggtggcg tgccccccgc attgatgggt atggggccag tacctgccac gcaaaaagcg 900
 ttacaactgg cggggctgca actggcggat attgatctca ttgaggctaa tgaagcattt 960
 gctgcacagt tccttgcgt tggaaaaaac ctgggcttg attctgagaa agtgaatgtc 1020
 aacggcgggg ccatcgcgct cgggcatcct atcggtgcca gtggtgctcg tattctggtc 1080
 acactattac atgccatgca ggcacgcgat aaaacgctgg ggctggcaac actgtgcatt 1140
 ggcggcggtc agggaaattgc gatggtattt gaacgggtga 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

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
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 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	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	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 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	cggcgctcc	ctgtgctgcc	ccgctgcaaa	tagcgcaac	60
gcccagaccc	cctccccgtc	gctttaattc	ataaaacaagc	gtcatgagaa	ttctcgacc	120
gctcgcccg	atcgggtggc	cgagcgcat	cgcaccgcca	ttcacattta	cttttcaag	180
atcgaaacct	acgattttt	cacatgtcaa	aacaactgaa	gcaaaagctt	catttacttc	240
aaacaagtca	atatcttgg	cagttaaacc	attcttttc	aggagcttgt	taatagcaaa	300
ccctggcgct	gcccggcagct	cgtcgctgg	cattcccgta	gttggaaaac	caagaattgt	360
agccagaggc	cgtttggccaa	gctcagcagc	tttttcctca	gacatcagca	cgaacgcgccc	420
ggctccgtca	ttgactccag	gagcattgcc	ggctgtgata	gaaccgtcac	ttgcataaat	480
cggagcaagt	tttgcgagct	gatccagact	tgtgtcacgg	cgaatcgctt	catctttatc	540
aacaacgttt	ggttttccctt	ttcgaccgat	ccagttgacg	ggaacaattt	catcctgaaa	600
cttcccttca	tcggcgccct	tagctgccct	tgcatgactt	ctcaacgccc	attcgtcctg	660
ctctcttcgt	gagattgcat	attccctggc	agctgtat	ccgtgaacag	ccatgtgcac	720
ctcgtcaa	atgcacgtta	atccgtcata	caccattaag	tccctaagct	cggcgccccc	780
catccgtgct	ccccagcgcc	cggcgaaac	ggcatacgg	atattgctca	tgctttccat	840
cccccccgca	acaagtatgt	ccgcatcctg	cggccgaaatc	atttgatcac	ataaaagtgac	900
agcgcgaagg	ccggaagcac	agactttatt	cagttttct	gacggcacac	tccaaggcat	960
tcccgccaga	cggcagctt	gacggaaagg	tatctgccct	gagccggcct	ggacaaccat	1020
gcccatgacg	tttccttcta	catcatctcc	agagactcca	gcctgttgca	gcgcctcctt	1080
catcacaatg	cccccaagct	cagcagctt	caccttttc	aaaactccgc	cgaatttgcc	1140
aaatggagtt	cttgcagcac	ttacaatgac	tgtttccctc	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
 100 105 110

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	caattggttc	attccagggt	60
tctctatcct ccaagacagc	agtggattt	ggtgctgtt	ctttaaaagg	cgccttggct	120
aagggtccag aattggatgc	atccaaggat	tttgacgaaa	ttatTTTgg	taacgttctt	180
tctgccaatt tggccaagc	tccggccaga	caagttgc	tggctccgg	tttgagtaat	240
catatcg	tttgcatttt	caagcacagt	taacaagg	ctatgaaggc	300
gg	tttgcatttt	ccatcaa	atgttgc	ttgtgaatct	360
atgactaacg	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	420
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	480
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	540
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	600
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	660
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	720
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	780
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	840
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	900
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	960
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	1020
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	1080
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	1140
tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	tttgcatttt	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

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 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 Ala Ser Ser Ile Val Ile Glu Lys Ile
385 390 395

<210> 134

<211> 864

<212> DNA

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 134

atggaaatca aacaaatcat gtagctggc gcaggtcaga tggggagcgg aattgctaa	60
acagccgccc acgcgggctt ttatgtgcgg atgtatgtat tgaatccaga ggccgcggag	120
gcaggattga aacggctgaa gaaacagctg gcccgtatg ctgagaaagg aaaaaggacc	180
gagacggaag tgaagagcgt aatcaaccgc atttcgattt ctcaaact tgaggaggca	240
gagcatgcgg acattgtat tgaggctatc gcagaaaaca tggcggcaaa aactgagatg	300
tttaaaacac ttgatcgcat ttgcccgcct catacgattt tggccagcaa tacatcttcc	360
ttgcctatta cagaaatcgc tgctgtaca aaccggcctc aacgggttat tggcatgcat	420

tttatgaatc ccgtccctgt aatgaagctg gtagaaagtga ttgcaggctt ggctacatca	480
gaagaaaacgg ccttagatgt tatggcatta gcggaaaaga tggggaaaac agcggtagaa	540
gtcaatgatt ttccctgggtt tgtttccaac cgtgtgcttc ttccaatgat taatgaagcc	600
atctattgctg tttatgaggg agtggcgaag ccggaggcaa tagatgaagt gatgaagctg	660
ggcatgaatc atccgatggg tccgcttgc ttagcggatt ttatcggact ggatacgtgt	720
ttatcaatta tggaaagtccct tcactcaggc cttggcgatt ccaaataccg tccttgccc	780
ctgctccgca agtatgtcaa agcaggctgg cttggcaaaa agagcggacg cggttttat	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 catcggtggt gcccggcacca tgggcaacgg catcgcgtag 60
gcttgcgg tgggtggcct ggacgtggtg atgggtggata tcagcgacgc agcggtgcag 120
aagggcatcg ccaccgtcgc cggcagccctg gaccgcctga tcaagaagga caagatcagc 180
gaagccgaca agatgactgc gctcgccgc atccacggca gcaccgcgtt tgacgacctg 240
aagaaggccg atatcgtgat cgaggccgccc accgagaact ttgacctgaa ggtcaagatc 300
ctcaaggcaga tcgacagcat cgtcgccgag aacgtcatca ttgcttcgaa cacgtcgatc 360
atctcgatca ccaagctggc cggcgatcg agtcgccccg agcgcttcat cggcatgcac 420
ttcttcaacc cggcgccgt gatggcgctg gtggaaactga tccgcggcct gcagaccagc 480
gacgcggctc acgcccgtgt cgaggcgctg gccaagggaa tgggcaagta cccgatcacc 540
gtcaagaaca gccccggctt cgtcgatcg cgcattctgt gcggatgtat caacgaagcc 600
ttctcgatgc tcgggtgaagg cctggcctcg ccggaaagaga tcgacgaaagg catgaagctc 660
ggctcgatcg atcccgatcg cccccctggca ctggccgaca tggatcgatcg ggacaccatg 720
ctggcagtga tggaaatgtgt gtacacagaa ttggccgacc cgaatgtatcg tccggccatg 780
ctgatgcgcg agatgggtggc tgggggtat ctggccgaca agactggccg tggcgtgtac 840
gtctacagca agtaa 855

<210> 137

<211> 284

<212> PRT

10 <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	ctttcggtg	gtggccgggtt	gcggccccaa	ctcgccgcgc	120
cgcgaaaagt	ggctggagca	gcagaaggcc	ctgggcttcg	atttcattgc	ctcggaaaggc	180
aatgtggctg	actgggactc	gaccaagacc	gcattcgaca	aggtaagtc	cgaggtcggc	240
gagggttcatg	tgctgatcaa	caacgcgggt	atcacccgcg	acgtgggttt	ccgcaagatg	300
acccgcgcgg	actgggatgc	ggtgatcgac	accaacctga	cctcgctgtt	caacgtcacc	360
aagcaggtga	tcgacggcat	ggccgaccgt	ggctggggcc	gcatcgtaa	catctcgtcg	420
gtgaacgggc	agaagggcca	gttcggccag	accaactact	ccaccccaa	ggccggcctg	480
catggcttca	ccatggcact	ggcgcaggaa	gtggcgacca	agggcgtgac	cgtcaacacg	540
gtctctccgg	gctatatcgc	caccgacatg	gtcaaggcga	tccgcagga	cgtgctcgac	600
aagatcgtcg	cgacgatccc	ggtcaagcgc	ctgggcctgc	cggaagagat	cgcctcgatc	660
tgcgccctgg	tgtcgctgga	ggagtccgg	ttctcgaccg	gcgcggactt	ctcgctcaac	720
ggcggcctgc	atatggctg	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

5 <213> Escherichia coli

<400> 140

atgagcgaac	tgatcgtag	ccgtcagcaa	cgagtattgt	tgctgaccct	taaccgtccc	60
gccccacgta	atgcgctaaa	taatgccctg	ctgatgcaac	tggtaaatga	actggaaagct	120
gcggctaccg	ataccagcat	ttcggctgt	gtgattaccg	gtaatgcacg	ctttttgcc	180
gctggggccg	atctcaacga	aatggcagaa	aaagatctcg	cggccacctt	aaacgataca	240
cgtccgcagc	tatgggcgcg	attgcaggcc	tttaataaac	cacttatcgc	agccgtcaat	300
ggttacgcgc	ttggggcggg	ttgcgaactg	gcattgttgt	gcgatgtgg	ggttgccgga	360

gagaacgcgc gttttgggtt gccggaaatc actctcgca tcatgcctgg cgcaggcgga 420
 acgcaacgtt taatccgtag tgcgtgtaaa tcgttagcca gaaaatggt gctgagcgga 480
 gaaagtatca cgcgtcagca agcacagcag gccggctgg ttagcgtacgt ctccccagc 540
 gatccaaccc tcgaatacgc cttacagctg gcatcgaaaa tggcacgtca ctcgcccgtg 600
 gccttacaag cggcaaagca agcgtcgcgc cagtcgcagg aagtggcttt gcaagccgga 660
 cttgcccagg agcgtacgtt attcaccttgc tggcggcaa cagaagatcg tcatgaaggc 720
 atctccgctt tcttacaaaa acgcacgccc gactttaaag 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 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 ctattcttt tactgttaaa aatgaacata tggcggtat caccttaaac 60
 aggcctcagg cagcaaatgc tcttcagcg gaaatgctta gaaacctgca aatgattatc
 caggaaattt aatttaactc aaacatccgt tgcgtcatcc tcacaggcac cggtaaaaa 120
 gcgtttgtg caggggcaga cctgaaggaa cggataaaac tgaaagaaga tcaggttctg
 gaaagtgtat ctctcattca aagaacggcg gctttacttgc atgccttgcc gcagccggc 180
 atagctgcga taaatggaag cgcatttaggc ggcggactag aattggcatt ggcattgcac
 cttcgaatcg caactgaagc agctgtgctg ggacttccgg aaacagggtt agcttattatc
 ccgggcgctg gagggaccca aaggctgccc cggctgatttgc agcaggaaaa agcaaaagaa 240
 ttcatttata caggcagacg cgtgaccgca cacgaagcaa aagaaatcg 540
 catgtcacgg ctccctgtga ctttatgcca aaagcagagg aactggccgc agccatttct
 gccaacggac cgatcgctgt ccgtcaggct aaatttgcaa tcaataaagg attggagaca 600
 gatcttgcta caggccttgc gattgaacaa aaagcgtatg aacaaaccat cccgacaaaa
 gacaggagag aaggcattca ggccttcaa gaaaaaagac gggccgtata caaggaaata 660
 taa 720
 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

atgagcgac aatccctgga	agtaggccag aaggcccgtc	tcagcaagcg	gttcggggcg	60													
gcggaggtag ccgccttcgc	cgcgtctcg	gaggacttca	accccctgca	cctggacccg	120												
gccttcgccc	ccaccacggc	gttcgagcgg	cccatagtcc	acggcatgct	gctcgccagc	180											
ctttctccg	ggctgctggg	ccagcagttg	ccgggcaagg	ggagcatcta	tctgggtcaa	240											
agcctcagct	tcaagctgcc	ggtcttgc	ggggacgagg	tgacggccga	ggtggaggtg	300											
accgccttc	gcgaggacaa	gcccattgcc	accctgacca	cccgcatctt	cacccaaggc	360											
ggccctcg	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																
tttcgcccc	tgcaccacga	tgtcgccccc	cgccctcgccc	tctgctgccc	tggtgtctgc		60										

cggcgccctc	tgccctgtgcg	tggcaacggt	attgttggcg	actggatcca	accccaccgc	120
cctgtccact	gcttccactc	gctctccgac	ctcaactggtc	cgtggggtgg	acaggggctt	180
gatgaggcca	accactgcag	cggctctgac	gacaatgaga	gaggtgcccc	agatggjctga	240
gggattttca	ggcgaagcca	cgtctgcatg	ggccgcccgcg	gggcccgcagt	gggcggcgcc	300
gctcgtggcc	gcggcctcct	ccgcaactggc	gctgtggtgg	tgggcccccc	ggcgcagcgt	360
gcggcggccg	ctggcagcgc	tggcggagct	gcccaccgcg	gtcaccacc	tggccccc	420
gatggcgatg	ttcaccacca	cagcgaaggt	catccagccc	aagattcgtg	gcttcatctg	480
cacgaccacc	cacccgatcg	gctgtgagaa	gcgggtccag	gaggagatcg	cgtacgccecg	540
tgcccacccg	cccaccagcc	ctggcccgaa	gagggtgctg	gtcatcgct	gcagtaccgg	600
ctacgggctc	tccacccgca	tcaccgctgc	cttcggctac	caggccgcca	cgtgggcgt	660
gttcctggcg	ggccccccga	cgaaggccg	ccccgcccgcg	gcgggctgg	acaacaccgt	720
ggcgttcag	aaggccccc	tggaggccgg	gctgtacgcc	cggagcctta	atggcgacgc	780
cttcgactcc	acaacgaagg	cgccggacggt	cgaggcgatc	aagcgggacc	tcggcacggt	840
ggacccctgt	gtgtacagca	tcggccccc	gaagcggacg	gaccctgcca	ccggcgtcct	900
ccacaaggcc	tgcctgaagc	ccatcgccgc	cacgtacacc	aaccgcactg	tgaacaccga	960
caaggcggag	gtgaccgacg	ttagcattga	gccggcctcc	cccgaagaga	tcgcggacac	1020
ggtgaaggtg	atgggggggg	aggactggga	gctctggatc	caggcgtgt	cggaggccgg	1080
cgtgctggcg	gagggggcca	agacggtgcc	gtactcctac	atcgcccc	agatgacgtg	1140
gcctgtctac	tggtccggca	ccatcgggga	ggccaagaag	gacgtggaga	aggctgccaa	1200
gcgcatcacg	cagcgtacg	gctgcccggc	gtacccggtg	gtggccaagg	ccttggtcac	1260
ccaggccagc	tccgccatcc	cggtggtgcc	gctctacatc	tgcctgtgt	accgcgttat	1320
gaaggagaag	ggcacccacg	agggctgcat	cgagcagatg	gtgcggctgc	tcaccacgaa	1380
gctgtacccc	gagaacgggg	cccccatcgt	cgatgaggcc	ggacgtgtgc	gggtggatga	1440
ctgggagatg	gcggaggatg	tgcagcaggc	tgttaaggac	ctctggagcc	aggtgagcac	1500
tgccaacctc	aaggacatct	ccgacttcgc	tgggtatcaa	actgagttcc	tgcggtgtt	1560
cgggttcggc	attgacggcg	tggactacga	ccagcccg	gacgtggagg	cggacccc	1620
cagtgtgtcc	cagcgttagg	tgcgtggacgc	cgccctctc	cgggggtct	gccaatgg	1680
tcgctccccc	aacccaaccc	cctgcccacc	atcggggtcc	cgcgggtgaa	tgcggcccc	1740
acccaaaggc	aaaggtcaag	gccggggccc	caccgccaaa	ggtaacaca	tatgtatccg	1800
tcgggggctg	atcccgctgc	gacacgggccc	ataattgtgc	cccacggat	gtccatgcgc	1860
ctaagacaac	tgcggcc	gacagtcgt	accgccttga	gttcccagg	ca	1912

<210> 147

<211> 539

<212> PRT

5 <213> Euglena gracilis

<400> 147

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 Ala Lys Val
 130 135 140

Ile Gln Pro Lys Ile Arg Gly Phe Ile Cys 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

5 <212> DNA

<213> *Sreptomyces collinus*

<400> 148

gtgaccgtga	aggacatcct	ggacgcgatc	cagtcgaagg	acgccacgtc	cgccgacttc	60
gccgcctgc	agctccccga	gtcgtaccgt	gcgatcaccg	tgcacaagga	cgagacggag	120
atgttcgcgg	gtctggagac	ccgacacaag	gacccgcgca	agtcgatcca	cctcgacgag	180
gtgcccgtgc	ccgaactggg	cccggcgaa	gccctggtgg	ccgtcatggc	ctccctcggtc	240
aactacaact	cggtgtggac	ctcgatcttc	gagccggtgt	cgacgttcgc	cttcctggag	300
cgctacggca	agctgtcgcc	gctgaccaag	cgccacgacc	tgccgtacca	catcatcgcc	360
tccgacctcg	cgggcgtcgt	cctgcgcacc	ggccccggcg	tcaacgcctg	gcagcccggt	420
gacgaggtcg	tcgcgcactg	cctgagcgtc	gagctggagt	cgcccgacgg	ccacgacgac	480
accatgctcg	accccgagca	gcgcatctgg	ggcttcgaga	ccaacttcgg	cggcctcgcg	540
gagatcgccg	tggtaagac	gaaccagctg	atgccaagc	cgaagcacct	cacctggag	600
gaggccgcgg	ccccgggcct	ggtgaactcc	accgcctacc	gccagctgg	ctcccgcaac	660
ggcgccgcca	tgaagcaggg	cgacaacgtc	ctgatctggg	gcmcagcgg	cgggctcgcc	720
tcgtacgcca	cgcagttcgc	gctcgcgggc	ggtgcacacc	cgatctgtgt	cgtctccctcg	780
ccccagaagg	cggagatctg	ccgctcgatg	ggcgccgagg	cgatcatcga	ccgcaacgccc	840
gagggctaca	agttctggaa	ggacgagcac	acccaggacc	ccaaggagtg	gaagcgcttc	900
ggcaagcgca	tccgcgagct	gaccggcggc	gaggacatcg	acatcgctt	cgagcacccc	960
ggccgcgaga	ccttcggcgc	ctccgtctac	gtcacccgca	agggcggcac	catcaccacc	1020
tgcgcctcga	cctcgggcta	catgcacgag	tacgacaacc	ggtacctgtg	gatgtccctg	1080
aagcggatca	tcggctcgca	cttcgcacac	taccgcgagg	cgtacgaggc	caaccgcctg	1140
atcgccaagg	gcaagatcca	ccgcacgctg	tcgaagacgt	actccctgga	ggagaccggc	1200
caggcggcgt	acgacgtcca	ccgcaacctg	caccaggca	aggtcggcgt	cctgtgcctc	1260
gcgcggagg	aaggcctcgg	cgtgcgcgac	gcggagatgc	gcgcccagca	catcgacgccc	1320
atcaaccgct	tccgcaacgt	ctga				1344

<210> 149

<211> 447

5 <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				
5 <213> Streptomyces coelicolor				
<400> 150				
gtgaccgtga aggacatcct ggacgcgatc cagtcgcccc actccacgcc ggccgacatc	60			
gccgcactgc cgctccccga gtcgtaccgc gcgatcaccg tgcacaagga cgagaccgag	120			
atgttcgcgg gcctcgagac ccgcgacaag gaccccccga agtcgatcca cctggacgac	180			
gtgcccgtgc ccgagctggg cccggcgag gcccctggtgg ccgtcatggc ctcctcggtc	240			
aactacaact cgggtgtggac ctcgatcttc gagccgctgt ccacccctcgg gttcctggag	300			
cgtacggcc gggtcagcga cctcgccaag cggcacgacc tgccgtacca cgtcatcgac	360			
tccgacctcg ccgggtgtcgt cctgcgcacc ggtccggcg tcaacgcctg gcaggcgggc	420			
gacgagggtcg tcgcccactg cctctccgtc gagctggagt cctccgacgg ccacaacgac	480			
acgatgctcg accccgagca gcgcacatctgg ggcttcgaga ccaacttcgg cggcctcg	540			

gagatcgcbc tggtaagtc caaccagctg atgccgaagc cggaccacct gagctggag 600
 gaggccgccc ctccccgct ggtcaactcc accgcgtacc gccagctcg ctccccgcaac 660
 ggccgcccggca tgaagcaggg cgacaacgtg ctcatctggg gcgcgagcgg cggactcg 720
 tcgtacgcca cccagttcgc cctcgccggc ggcgccaacc cgatctcg cgtctccctg 780
 ccgcagaagg cggagatctg ccgcgcgtat ggcgcccagg cgatcatcga ccgcaacg 840
 gagggctacc gtttctggaa ggacgagaac acccaggacc cgaaggagtg gaagcgctt 900
 ggcaagcgca tccgcgaact gaccggcgcc gaggacatcg acatgtctt cgagcacccc 960
 ggccgcgaga cttcggcgc ctccgtcttc gtcacccgca agggcggcac catcaccacc 1020
 tgccgcctcga cctcgggcta catgcacgag tacgacaacc gctacctgtg gatgtccctg 1080
 aagcgcatca tcggctcgca cttcgccaac taccgcgagg cctgggaggc caaccgcctc 1140
 atcgccaagg gcaggatcca cccacgctc tccaaagggtg actccctcga ggacacccggc 1200
 caggccgcct acgacgtcca ccgcacaccc caccaggca aggtcggcgt gctgtgcctg 1260
 gcccgcgagg agggcctggg cgtgcgcac cgggagaagc ggcgcagca cctcgacgccc 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

atgaaaagtca caacagtaaa ggaatttagat gaaaaactca aggttaattaa agaagctcaa 60
 aaaaaattctt cttgttactc gcaagaaaatg gttgtgaaa tcttttagaaa tgcagcaatg 120
 gcagcaatcg acgcaaggat agagctagca aaagcagctg ttttggaaac cgttatgggc 180
 ttagttgaag acaaggttat aaaaaatcat tttgcaggcg aatacatcta taacaaatat 240
 aaggatgaaa aaacctgcgg tataattgaa cgaaaatgaac cctacggaat tacaaaaata 300
 gcagaaccta taggagttgt agctgctata atcccgttaa caaaccccac atcaacaaca 360
 atatttaaat ccttaatatac ccttaaaact agaaaatggaa ttttcttttc gcctcaccca 420
 agggcaaaaa aatccacaat actagcagct aaaacaatac ttgtatgcgc cgttaagagt 480
 ggtgccccgg aaaatataat aggttggata gatgaacctt caattgaact aactcaatat 540
 ttaatgc当地 aagcagatata aacccttgca actggggc cctcactagt taaatctgct 600
 tattcttccg gaaaaccagc aatagggttt ggtccggta acacccagt aataattgat 660
 gaatctgctc atataaaaaat ggcagtaagt tcaatttat tatccaaaac ctatgataat 720
 ggtgttatata gtcctctga acaatctgta atagtcttaa aatccatata taacaaggta 780
 aaagatgagt tccaagaaag aggagcttat ataataaaga aaaacgaatt ggataaagtc 840
 cgtgaagtga tttttaaga tggatccgta aaccctaaaa tagtggaca gtcagcttat 900
 actatagcag ctatggctgg cataaaagta cctaaaacca caagaatatt aataggagaa 960
 gttacctcct taggtgaaga agaacctttt gcccacgaaa aactatctcc tggtttggct 1020
 atgtatgagg ctgacaattt tgatgtgct taaaaaaaaag cagtaactct aataaactta 1080
 ggaggcctcg gccataccctc aggaatataat gcagatgaaa taaaagcagc agataaaaata 1140
 gatagattta gtagtgc当地 gaaaaccgta agaacctttg taaatatccc aacctcacaa 1200
 ggtgcaagtg gagatctata taattttaga ataccacctt ctttcacgct tggctgc当地 1260
 ttttggggag gaaattctgt ttccgagaat gttggtccaa aacatctttt gaatattaaa 1320
 acccttagctg aaaggagaga aaacatgctt tggtttagag ttccacataa agtatatttt 1380
 aagttcgggtt gtcttcaatt tgctttaaaa gattnaaaag atctaaagaa aaaaagagcc 1440

tttatatgtta ctgatagtga cccctataat ttaaactatg ttgattcaat aataaaaata	1500
cttggcacc tagatattga ttttaaagta ttaataagg ttggaaagaga agctgatctt	1560
aaaaccataa aaaaagcaac tgaagaaaatg tcctccctta tgccagacac tataatagct	1620
tttaggtggta cccctgaaat gagctctgca aagctaattgt gggtaactata tgaacatcca	1680
gaagtaaaaat ttgaagatct tgcaataaaaaa tttatggaca taagaaagag aataatatact	1740
ttcccaaaac tcggtaaaaa ggctatgtta gttgcaatta caacttctgc tggttccggt	1800
tctgaggta ctcccttgc ttttagtaact gacaataaca ctggaaataa gtacatgtta	1860
gcagattatg aaatgacacc aaatatggca attgttagatg cagaacttat gatgaaaatg	1920
ccaaaggat taaccgctta ttcaggtata gatgcactag taaaatgtat agaagcatac	1980
acatccgtat atgcttcaga atacacaaaac ggacttagcac tagaggcaat acgattaata	2040
tttaaatatt tgcctgaggc ttacaaaaac ggaagaacca atgaaaaagc aagagagaaa	2100
atggctcacg cttcaactat ggcaggtatg gcacatccgta atgcatttct aggtctatgt	2160
cattccatgg caataaaaatt aagttcagaa cacaatattc ctagtggcat tgccaatgca	2220
ttactaatag aagaagtaat aaaatttaac gcagttgata atcctgtaaa acaagccccct	2280
tgccccacaat ataagtatcc aaacaccata ttttagatatg ctgcatttgc agattatata	2340
aagcttggag gaaatactga tgaggaaaag gtagatctct taattaacaa aatacatgaa	2400
ctaaaaaaaaag ctttaaatat accaacttca ataaaaggatg caggtttt ggaggaaaaac	2460
ttctattcct cccttgatag aatatctgaa cttgcactag atgatcaatg cacaggcgct	2520
aatccttagat ttcctttac aagtgagata aaagaaaatgt atataaatttgg tttaaaaaaa	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 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 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
 385 390 395 400

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
 465 470 475 480

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
 545 550 555 560

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

5 <213> Escherichia coli

<400> 154

atgaacaact	ttaatctgca	caccccaacc	cgcattctgt	ttggtaaagg	cgcaatcgct	60
ggtttacg	cg aacaattcc	tcacgatgct	cgcgtattga	ttacctacgg	cggcggcagc	120
gtgaaaaaaa	ccggcgttct	cgatcaagtt	ctggatgccc	tgaaaggcat	ggacgtgctg	180
gaatttggcg	gtattgagcc	aaacccggct	tatgaaacgc	tgatgaacgc	cgtgaaactg	240
gttcgcgaac	agaaagtgc	tttcctgctg	gcgggtggcg	gcggttctgt	actggacggc	300
accaaattta	tcgcccgcagc	ggctaactat	ccggaaaata	tcgatccgtg	gcacattctg	360
caaacggg	cg	gtaaagagat	taaaagcgcc	atcccgtgg	gctgtgtgct	420
gcaaccgg	tt	cagaatccaa	cgcaggcgcg	gtgatctccc	gtaaaaccac	480
caggcgttcc	attctgccc	tgttcagccg	gtatggccg	tgctcgatcc	ggtttatacc	540
tacaccctgc	cgccgcgtca	ggtggctaac	ggcgttagtgg	acgcctttgt	acacaccgtg	600
gaacagtatg	ttaccaaacc	ggttgatgcc	aaaattcagg	accgtttcgc	agaaggcatt	660
ttgctgacgc	taatcgaaga	tggtccgaaa	gccctgaaag	agccagaaaa	ctacgatgtg	720
cgcgc	caac	tcatgtgggc	ggcgactcag	gctgtaac	gtttgattgg	780
cgcaggact	gggcaacgca	tatgctggc	cacgaactga	ctgcgatgca	cggctctggat	840
cacgcgcaaa	cactggctat	cgtcc	gcactgtgg	atgaaaaacg	cgataccaag	900
cgcgcta	acg	tgctgcaata	tgctgaaac	tcactgaaagg	ttccgatgat	960
gagcgtattg	acgcccgc	tgccgcaacc	cgcaatttct	ttgagcaatt	aggcgtgccc	1020
acccac	cctct	ccgactacgg	tctggacggc	agctccatcc	cggctttct	1080
gaagagc	acg	gcatgaccca	actggcgaa	aatcatgaca	ttacgttgg	1140
cgtatatac	g	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	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
	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 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

5 <210> 156
 <211> 3883
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<400> 156

ctatattgct gaaggtacag gcgtttccat aactattgc tcgcgtttt tactcaagaa 60
 gaaaatgcca aatagcaaca tcagggagac aatacccgaa attgcgaaga aaactgtctg 120
 gtagcctgcg tggtaaaga gtatcccagt cggcggtgaa agcagcacaa tcccaagcga 180
 actggcaatt tggaaaccaa tcagaaagat cgtcgacgac aggcgcctat caaagttgc 240
 cacgctgtat ttgaagacgg atatgacaca aagtggAACc tcaatggcat gtaacaactt 300
 cactaatgaa ataatccagg ggttaacgaa cagcgcccgaa gaaaggatac gcaacgccc 360
 aatcacaact ccgataagta atgcattttt tggccctacc cgattcacaa agaaaggaat 420
 aatcgccatg cacagcgctt cgagtaccac ctggaaatgag ttgagataac catabaggcg 480
 cgttcctaca tcgtgtgatt cgaataaaacc tgaataaaag acaggaaaaa gttgttgatc 540
 aaaaatgtta tagaaagacc acgtccccac aataaatatg acgaaaaacc agaagttcg 600
 atccttggaa actgcgataa aatccctttt ttttacccct cccgcattcg ccgctacgca 660
 ctggtgatcc ttatcttaa aacgcattttt gatcatcata aatacagcgc caaatagcga 720
 gaccaaccag aagttgatgat ggggactgat actaaaaat atgcggcaa agaacgcgc 780
 aatagcatag cccaaaagatc cccaggcgcc cgctgttcca tattcgaaat gaaaatttcg 840
 cgcattttt tcggtaagc tatcaagcaa accgcattcc gccagatacc ccaagccaa 900
 aatacagcgc cccagaattt gacctacaga aaaattgctt tgcagtaacg gttcataaac 960
 gtaaatcata aacggtccgg tcaagaccag gatgaaactc atacaccaga tgagcggtt 1020
 cttcagaccg agtttatcct gaacgatgcc gtagaacatc ataaatagaa tgctggtaaa 1080
 ctggttgacc gaataaaatgc tacctaattc cgtccctgtc aacccttagat gtcctttcag 1140
 cccaaatagcg tataacgacc accacagcga ccaggaaata aaaaagagaa atgagtaact 1200
 ggatgaaaaa cgatagtagc cattctgaa tggaaatattc agtgcataa ttacctgcct 1260
 gtcgttaaaa aattcacgtc ctatctttagag ataagagcga cttcgccgtt tacttctcac 1320

tattccagtt	cttgcgaca	tggcagcgct	gtcattgcc	cttcgcgt	tactgcaagc	1380
gctccgcaac	gttgcgag	atcgataatt	cgtcgcat	ctctctcatc	tgtagataat	1440
cccgtagagg	acagac	ctgt	gagtaacccg	gcaacgaacg	catctccgc	1500
tcgacacaat	tcacagacat	tccagcaaaa	tggtgaactt	gtcctcgata	acagaccacc	1560
accccttctg	cac	tttagt	accaacagc	atggcgatct	catactctt	1620
catatatcct	gatcg	ttctg	tg	ttttcca	ctgataagtc	1680
ttgacgacat	ccg	ccagtt	tag	cc	cgcaaacaca	1740
tgccatagat	cttc	cacgaat	at	aggatcg	aagctgacaa	1800
gccgtcatcg	cag	taatgc	gct	ggta	acgc	1860
agatgt	taacc	attcgccat	tcg	ccagc	ggca	1920
gcactggggc	ggaccataaa	cgt	aaatgaa	cg	ttccctt	1980
accgtggatg	tcc	gggtgcca	ttc	atcttgc	tc	2040
agcagcg	tttgcattaa	cgc	accaaaa	g	gatccc	2100
cttgc	taatctggc	gat	cccacc	gca	acgttag	2160
ggcagtaggc	gccc	gtctga	ttctgg	caag	agatctacg	2220
actttggctg	acat	ttttttt	cc	ttaaatt	catctg	2280
tttgc	aaa	atcg	catgg	at	ttactaaa	2340
ttaacgt	taa	cattgt	at	tc	atcgat	2400
aaagttaacg	tta	acaattc	acc	aaat	ttg	2460
tcgattgcat	gcgg	cgcaaa	acg	ccct	tagc	2520
ctat	ccccat	ttt	cac	ctcg	aaaacttcat	2580
ctgg	tttaac	gat	cg	tttta	gac	2640
gccaatgcac	tgg	ggacatg	cc	acc	gac	2700
tg	cg	ctag	cc	agg	gac	2760
tg	acaat	gt	tc	tc	ttt	2820
tg	acgat	at	tc	tc	ttt	2880
gaa	acagg	gt	at	tc	ttt	2940
gt	ggcgt	aa	cc	acc	ttt	3000
gc	agatc	ctt	atc	cg	ttt	3060
cc	acg	ct	gt	gt	ttt	3120
tc	agc	att	at	gt	ttt	3180
tc	gat	ttt	cc	cc	ttt	3240
cgg	gcattt	act	gaa	ttt	ttt	3300
gaaggat	gggt	actt	ttt	ttt	ttt	3360
cg	gcgtattt	ttat	cg	gt	ggat	
gt	ggat	cg	tc	at	tc	
tt	at	cg	cc	tc	tc	

aaaacgtgaa	ggatggcag	gctgcgtac	gctggcgcc	gagctatcg	agagcaatgg	3420
caaacttcta	caacgccccg	tacacgaagc	tgagtcgtta	cgccagcagc	atcaatctgt	3480
ctctccccgc	acaatcagca	ataaaatatgt	tttgcaggaa	aacgcgcaag	cagttgagat	3540
tcagttgcag	tggcgctga	agaacagtga	tgccgaacat	tacggattac	agctcggcac	3600
tggaatgcgg	ctgtatattg	ataaccaatc	tgagcgactt	gttttgcggc	ggtattaccc	3660
acacgagaat	ttagacggct	accgttagtat	tccctccccg	cagcgtgaca	cgctcgccct	3720
aaggatattt	atcgatacat	catccgtgga	agtattttat	aacgacgggg	aagcggtgat	3780
gagtagtcga	atctatccgc	agccagaaga	acggaaactg	tcgctttatg	cctccacgg	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									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 Glu 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	
		ccttcttg tgaatcg	18
5	<210>	161	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
10	<223>	Cebador Scr2	
	<400>	161	
		agaaaacaggg tgtgtatcc	18
	<210>	162	
	<211>	20	
15	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador Scr3	
	<400>	162	
20		agtgtatcatc acctgttgcc	20
	<210>	163	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	Cebador Scr4	
	<400>	163	
		agcacggcga gagtcgacgg	20
	<210>	164	
30	<211>	74	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador OT731	
35	<400>	164	
		aaagctggag ctccaccgcg gtggcggccg ctctagaagt tttcaaagca gagtttcgtt	60
		tgaatatttt acca	74
	<210>	165	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
40	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador OT732	
	<400>	165	
		ttcaaatatgc atgcctcaga acgtttacat tgcgtcgact gccagaaccc	50
45	<210>	166	
	<211>	79	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	

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

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

10 <220>
 <223> Cebador OT734
 <400> 167
 acctgcacct ataacacata cttttccat ggtattttt tctccttgac gttaaagtat 60
 agaggtatata ta 72

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

<220>
 <223> Cebador OT735
 <400> 168
 aaaaaactacc atggaaaagg tatgtttt aggtgcagg actatgggtt caggaattgc 60

20 <210> 169
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

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

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

<220>
 <223> Cebador OT737
 <400> 170
 acgattattc aaaataaggc ctatacggcc ttcttttttt tactttgttc agaacaactt 60
 ctcatttttt tctactcata a 81

35 <210> 171
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador OT738

<400> 171	
gaattggta ccggggccccc cctcgaggc gaccgatgcc tcataaaactt 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	
aaaaaaagatc atgagaaaaat cgcagaacgt aaggcgccgc tcagcacttt tctagcaata	60
ttgctgttcc ttg	73
20 <210> 174	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador OT806	
25 <400> 174	
ctcgaaaata gggcgccccc cattaccga cattttggcg c	41
<210> 175	
<211> 55	
<212> DNA	
30 <213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador OT807	
<400> 175	
actgcactag ctattacaac ttctgcattatcg cgtatgattt gatttattttt ttgtat	55
35 <210> 176	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
40 <223> Cebador OT808	
<400> 176	
actgcactag ctattacaac ttctgcattatcg cgtatgattt gatttattttt ttgtat	55
<210> 177	
<211> 60	
45 <212> DNA	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador OT809	
5	<400> 177	
	tttcaataa acacacataa acaaacaccc catggaaaag gtatgttta taggtcagg	60
	<210> 178	
	<211> 62	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador OT799	
	<400> 178	
	taccggggccc cccctcgagg tcgacggcgc gccactggta gagagcgact ttgttatgccc	60
	ca	62
15	<210> 179	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador OT761	
20	<400> 179	
	cttggcccttc actagcatgc tgaatatgtt ttacttggtt atggttatat atgacaaaag	60
	<210> 180	
	<211> 68	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador OT803	
	<400> 180	
	ccctcactaa aggaaacaaa agctggagct cgatatcggc ggcacat gcagtgtatgc	60
	acgcgcga	68
30	<210> 181	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador OT804	
	<400> 181	
	aaggatgaca ttgttagtt ccatggttgt aatatgttg ttgtttgg	49
	<210> 182	
	<211> 51	
40	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador OT785	
	<400> 182	
45	cacacatatt acaaccatgg aactaaacaa tgtcatcctt gaaaaggaag g	51

<210>	183	
<211>	63	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador OT786	
	<400> 183	
	atcattcatt ggccattcag gccttatcta ttttgaagc cttcaatttt tctttctct	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
	<210>	185
	<211>	77
	<212>	DNA
20	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223> Cebador PT805	
	<400> 185	
	gaattggta ccgggcccc cctcgaggc gacttatagt attatatttt ctgatttggt	60
	tatagcaagc agcgaaa	77
25	<210>	186
	<211>	1269
	<212>	DNA
	<213>	Secuencia artificial
30	<220>	
	<223> Gen TER optimizado en cuanto a codones	
	<400> 186	

actagtacca	taaccaagta	atacatattc	agcatgctag	tgaaggccaa	gttcgtcaag	60
ggctttatta	gagatgttca	tccgtatggg	tgttaggagag	aagtgttaaa	ccagattgac	120
tactgcaaga	aagcaattgg	ctttaggggc	cctaaaaagg	ttcttattgt	aggtgcttct	180
tcaggcttcg	gactagctac	tagaatatct	gttgcattcg	gagggcctga	agcccataca	240
atcgggttt	catacgagac	tggagctaca	gacagaagga	taggtacggc	tgggtggtac	300
aataatatct	tctttaaaga	attcgctaag	aagaaaggtt	tggtggcaaa	gaatttcata	360
gaagatgcat	tttcgaatga	aaccaaggat	aaagtgataa	agtatataaa	ggacgaattt	420
ggtaaaattg	atttattcgt	atattctta	gctgctccta	gaagaaagga	ctacaaaacc	480
gtaatgttt	atacctcaag	aattaaaaca	attctaggtg	actttgaagg	gcctactatt	540
gacgtagaaa	gagatgaaat	aactttaaag	aaggtatctt	ctgctagtat	cgaggaaatc	600
gaagaaacac	gtaaaagtaat	ggcgaggaa	gactggcagg	agtgggtgtga	ggagtttatta	660
tacgaagatt	gttttctga	taaagctaca	accatcgctt	attcctatat	tggcagtct	720
agaacttata	aaatataatcg	tgaaggaacc	attgggatttgc	ctaagaagga	tttagaagac	780
aaagccaagt	tgtcaacga	aaagcttaat	agagtcatag	gaggtagggc	atttgtgtct	840
gttaacaaag	ctttagtaac	caaggcatct	gcttatattc	caaccttccc	tctatacgct	900
ccatattat	ataaaagtaat	gaaagaaaag	aacattcacg	aaaattgtat	tatgcaaatt	960
gagcgtatgt	tctcagagaa	aatatactcc	aacgaaaaga	ttcagttcga	tgataaggc	1020
cgtcttagaa	tggacgattt	agaactaaga	aaggatgttc	aggatgaagt	tgacagaatt	1080
tggctcaaca	taacaccaga	aaacttcaag	gagcttagtgc	actacaaggg	gtataagaaa	1140
gagtttatga	atctaaatgg	ttttgatttgc	gatggagtttgc	attattccaa	ggatcttgcatt	1200
attgaattac	ttagaaaact	agagccttaa	gcggccgcgt	taattcaaatt	taattgatata	1260
	agtactagt					1269

<210> 187

<211> 398

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína Ter modificada

<400> 187

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 tgaaagtcaa gactaatgggt gaaaacatca acttaaagaa ttacaaagat	120
aactcttcat gttttggagt atttggaaat gttgagaatg ccatttcttc tgcagttacat	180
gcacaaaaga ttctttccct acactacaca aaggaacaaa gagagaaaat aatcaccgaa	240
ataagaaaag ccgcatttaca gaataaagag gtcttagcca caatgatcct ggaggaaacc	300
cacatggaa ggtatgagga taaaatcttggaa aacatgaat tagtggccaa gtataccca	360
ggcactgaag atctgacaac aacagcatgg tccggcgtata atggactaac agtggttgaa	420
atgagtccat acggagttat cggcgctata actccaagca cgaatccaac agaaaaccgtt	480
atctgcaatt ctataggat gatagctgcg gggaatgcag ttgtatcaa tggtcacccaa	540
tgcgcacaaa aatgtgtcgc ttgcagta gaaatgataa acaaagccat aatggctgt	600

ggtggacctg aaaaccttgt cactactata aagaacccaa ctatggaaag ttttagacgct 660
 attatcaaac atccatccat aaaattgttg tgccgtacgg gtggcccggg tatggtaaaa 720
 acccttctta attctggtaa aaaggccatc ggagctggcg cgggtaatcc tccggttatt 780
 gtagacgata cagcagatat cgagaaggcc ggcagaagca ttattgaagg ttgttcgttt 840
 gacaacaatc ttccctgtat cgccggaaaaa gaagtgttcg tggttggaaaa cgttgcagat 900
 gatctgatct ctaacatgtt gaaaaacaac gccgtcattt tcaatgaaga ccaagtatcc 960
 aagctgatag accttggttct tcaaaaagaac aatgaaactc aagaatattt cattaataag 1020
 aagtgggttg gtaaggacgc taaaactgttt ttggatgaaa tagatgtaga gtcaccaagt 1080
 aatgtaaagt gtattattt tgaagtcaac gcaaaccatc cgttcggtt gacggagttg 1140
 atgatgccaa ttttgcctat agtagatg aaggacattt atgaagccat taaatacgcc 1200
 aagatagctg agcagaatag aaaacattcc gcctacattt attctaagaa catcgataac 1260
 ctaatagat tcgaacgtga aattgataca actatcttt ttaagaatgc aaagtcttt 1320
 gcaggtgtcg gttatgaagc tgagggtttc acaacctttt caattgccgg atccacaggt 1380
 gaaggaatca cgtcagctag aaactttacc aggcaaagac gttgtgcctt agcaggttag 1440
 ggcctgcagg gccgtgaatt tactttaaat cttgcattac tagt 1484

<210> 189

<211> 468

<212> PRT

5 <213> Artificial

<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 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
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
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
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

ggaaacaaaa gctggagctc caccgcggtg gggcgcgccc tattttcgag gaccttgtca 60
 ccttgagcc 69

10 <210> 191

<211> 50

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador OT758

<400> 191

ttaaggatc ttatccatg gtgttgittt atgtgtgtt attcgaaact 50

<210> 192

<211> 52

20 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador OT754

<400> 192

25 ttgggtaccc ggccccccct cgaggctgac tggccattaa tccttcccat at

52

<210> 193

<211> 52

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

30 <220>

	<223> Cebador OT755	
	<400> 193	
	tgtgcctag caggttaggg cctgcaggc cgtgaattta cttaaatct tg	52
5	<210> 194	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador OT760	
10	<400> 194	
	cggaaaatagg ggcgcgcact ggttagagagc gactttgtat gccccaaatg	50
	<210> 195	
	<211> 71	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador OT792	
	<400> 195	
	cccttgacga acttggcctt cactagcatg ctgaatatgt attacttggt tatggttata	60
	tatgacaaaaa 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
	tatgacaaaaa g	71
	<210> 197	
	<211> 73	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador OT765	
	<400> 197	
	ggaacacaaaag ctggagctcc accgcggtgg tttaacgtat agacttctaa tatatttctc	60
35	cataacttggt att	73
	<210> 198	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador LDHEcoRV F	
	<400> 198	
	gacgtcatga ccacccggcg atcccttt	29
	<210> 199	

	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador LDH AatIR	
	<400> 199	
	gatatccaac accagcgacc gacgttac	30
10	<210> 200	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Cm F	
15	<400> 200	
	atttaaatct cgagtagagg atcccaacaa acgaaaattg gataaag	47
	<210> 201	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador Cm R	
	<400> 201	
	acgcgttatt ataaaagcca gtcattagg	29
25	<210> 202	
	<211> 62	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P11 F	
30	<400> 202	
	tcgagagcgc tatagttgtt gacagaatgg acatactatg atatattgtt gctatagcgc	60
	cc	62
	<210> 203	
	<211> 58	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador P11 R	
	<400> 203	
	gggcgtata gcaacaatat atcatagtagt gtccattctg tcaacaacta tagcgctc	58
40	<210> 204	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador PldhL F	
	<400> 204	
	gagctcgctg acaaaccaac attatgacgt gtctggc	38
	<210> 205	

	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador PldhL R	
	<400> 205	
	ggatcctacc atgttgtgc aaaataagtg	30
	<210> 206	
	<211> 34	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador F-PnisA (EcoRV)	
	<400> 206	
15	ttcagtata tcgacatact tgaatgacct agtc	34
	<210> 207	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador R-PnisA(Pmel BamHI)	
	<400> 207	
	ttgattagtt taaactgttag gatccttga gtgcctcctt ataattta	48
	<210> 208	
25	<211> 2460	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DNA molde	
30	<400> 208	
	tgatccaaag gagggtgagg aatggcgat gtttacgacc accgcaaaag ttattcagcc	60
	gaaaattcgt gttttatccgcaccac ccacccgatt gtttgcggaaa aacgtgttca	120
	ggaagaaatc gcatacgcac gcgcgaccc gcccggaccgc ccgggtccga aacgtgtgct	180

gtttattggc tgcagtacgg gctatggcct gagcaccgt atcaccgcgg cctttggta 240
 tcaggccgca accctggcgc tgtttctggc aggccgcgc accaaaggcc gtccggccgc 300
 ggcgggttgg tataatacgg ttgcgttcga aaaagccgcc ctggaaagcag gtctgtatgc 360
 acgttctctg aatggtgatg cgttcgattc taccacgaaa gcccgcaccg tggaaagcaat 420
 taaacgtatg ctgggttaccg ttgtatctggt ggtgtatagc attgcagcgc cggaaacgtac 480
 cgatccggcc accggcgtgc tgcataaaagc gtgcctgaaa ccgatgggtg caacctacac 540
 caatcgatcg gtgaacacccg ataaaggcaga agttaccgtatg gtgagtttgc aaccggccag 600
 tccggaaagaa atcgagata ccgtgaaaatg tatgggtggc gaagattggg aactgtggat 660
 tcaggcactg agcgaagccg gcgtgctggc cgaaggcgc aaaaaccgttgcgttattctta 720
 tattggcccg gaaatgacgt ggccgggtgtta ttggagtggc accattggcg aagccaaaaaa 780
 agatgttggaa aaagcggcga aacgcatcac ccagcgtac ggctgtccgg cgtatccgg 840
 ttttgccttgc ggcgttgcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 900
 ttgcctgcgtg tattgttgcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 960
 ggtgcgtctg ctgacgacga aactgtatcc ggaaaatggt gcgcgcgtatcg tggatgaagc 1020
 gggccgtgtg cgttgcgtatg attggggaaat ggcagaagat gttcagcagg cagttaaaga 1080
 tctgtggagc caggtgagta cggccaatct gaaagatatt agcgattttgc caggttata 1140
 gaccgaattt ctgcgtctgt ttggctttgg tattgttgcgatcccccaggccatccgggttgc 1200
 tgatgttggaa ggcgttgcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 1260
 aatgggttgcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 1320
 tgtacttggaa agagagctta aaaaatatgg ttctaaatgtt cttatagttt atgggtggagg 1380
 aagtataaaatggaa tatatgataa agctgtaaatg atacttgcgatcccccaggccatccgggttgc 1440
 taaaatggat ttgcgtat 1500
 gaaatggcgtatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 1560
 aatagattgc gcaaaagggttgcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 1620
 tgtgttagat ggctcaaaaaaa taaaatgggttgcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 1680
 tgcaacagga tcagaaatgg atacgtgggcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 1740
 actaattgcg gcacatcccgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 1800
 gtataccgttgcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 1860
 tgaggtgtat tttagtataa caaaaacagc atatggcgtatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 1920
 attaagaact tgtattaaat atggggaaat agctttgcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 1980
 aagagccat ctaatgtggg ttctcaatgttgcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 2040
 agacactaat tggagtgtac acttaatggcgtatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 2100
 acacggcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 2160
 tacagtgtac aagtttgcgatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 2220
 tcactatgtac atagcacatc aagcaataca aaaaacaaga gattactttgcgtatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 2280
 aggtttacca tcttagactga gagatgttgg aattggaaatgg acataatggcgtatcccccaggccatccgggttgc cgttgcgtat 2340
 aaaggaatca gtaaaaggctta caggaggaac cataggaaac ctaagaccag taaacgcctc 2400
 cgaagtccttca caaatattca aaaaatctgt gtaaaacctac gttttaactt 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-hidroxibutiril-CoA,
 - c) 3-hidroxibutiril-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-hidroxibutiril-CoA es la 3-hidroxibutiril-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-hidroxibutiril-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.
- 25 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.
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 gallinarium*, *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-hidroxibutiril-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.

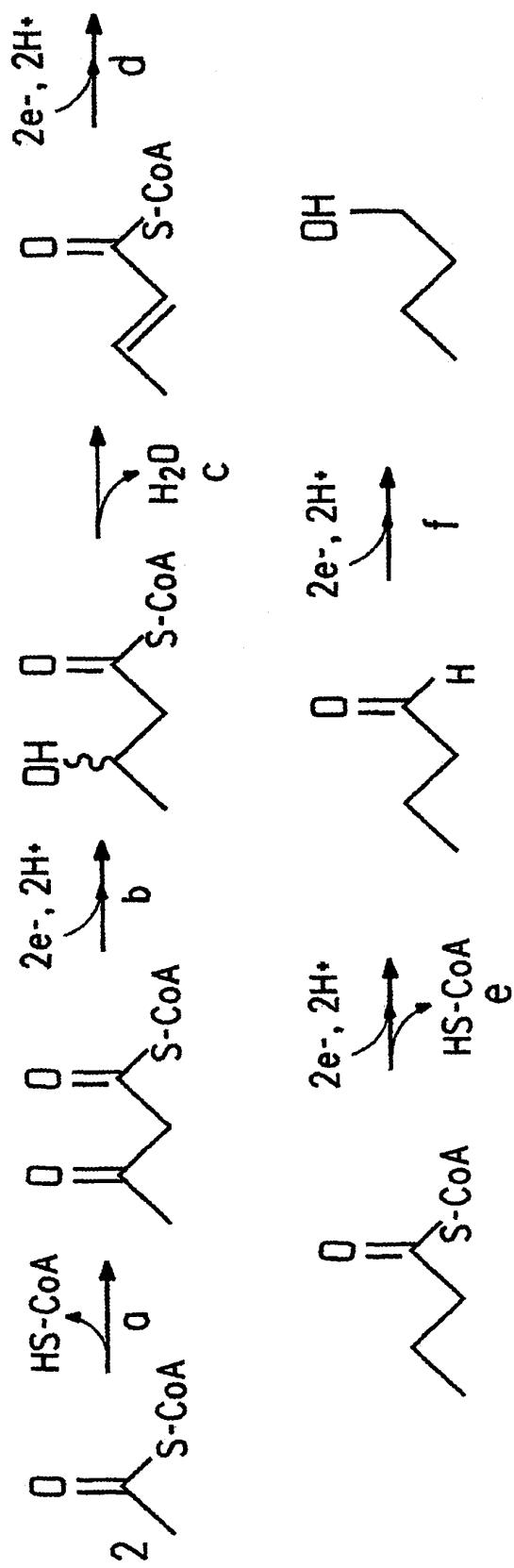


FIG. 1