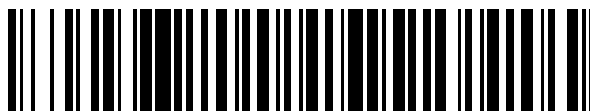


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 150**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/70** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 9/88** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2010 E 10803687 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 2516650**

54 Título: **Ácidos grasos de cadena ramificada y producción biológica de los mismos**

30 Prioridad:

**20.12.2010 US 972822**

**22.12.2009 US 289039 P**

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

**18.12.2014**

73 Titular/es:

**THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (100.0%)**  
**One Procter & Gamble Plaza**  
**Cincinnati, OH 45202, US**

72 Inventor/es:

**SAUNDERS, CHARLES, WINSTON;**  
**XU, JUN;**  
**GREEN, PHILLIP, RICHARD;**  
**CODY, DAVID, BLAIR y**  
**KHAMBATTA, ZUBIN, SAROSH**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 525 150 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).

## DESCRIPCION

Ácidos grasos de cadena ramificada y producción biológica de los mismos

**Campo de la invención**

- 5 La invención se refiere a células y a métodos para producir ácidos grasos, y más especialmente se refiere a células y a métodos para producir ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso.

**Antecedentes de la invención**

10 Los ácidos grasos de cadena ramificada anteiso e iso son ácidos carboxílicos con una ramificación metilo en el carbono n-2 y n-1, respectivamente. Análogamente a otros ácidos grasos, los ácidos grasos de cadena ramificada anteiso e iso son útiles en fabricación, tales como p. ej. de productos alimentarios, detergentes, pesticidas y productos de higiene personal tales como champús, jabones y cosméticos.

15 Los ácidos grasos de cadena ramificada anteiso e iso se pueden sintetizar químicamente o se pueden aislar a partir de determinados animales y bacterias. Aunque algunas bacterias, tales como *Escherichia coli*, no producen de manera natural ácidos grasos de cadena ramificada anteiso o iso, algunas bacterias, tales como los miembros del género *Bacillus* y *Streptomyces*, producen de manera natural ácidos grasos de cadena ramificada anteiso e iso. Por ejemplo, tanto *Streptomyces avermitilis* como *Bacillus subtilis* producen ácidos grasos anteiso con un total de 15 a 17 átomos de carbono, y ácidos grasos ramificados en iso con un total de 15, 16 y 17 átomos de carbono (Cropp y col., *Can. J. Microbiology* 46: 506-14 (2000); De Mendoza y col., Biosynthesis and Function of Membrane Lipids, en *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, Sonenshein and Losick, eds., American Society for  
20 Microbiology, (1993)). En FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, Vol. 301, N.º 2, con fecha 26 de octubre de 2019, páginas 188-192, se describe un método para producir ácidos grasos anteiso en *E. coli* usando FabH de *Listeria*. Sin embargo, estos organismos no producen ácidos grasos de cadena ramificada iso y/o anteiso en cantidades que sean comercialmente útiles. Otra limitación de estos organismos naturales es que, aparentemente no producen ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso de cadena media, tales como los que tienen 11 o 13  
25 átomos de carbono.

De esta forma, sigue existiendo necesidad de un producto producido de forma biosintética comercialmente útil de ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso. Además, existe necesidad de un método de producción de dichos ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso.

**Sumario de la invención**

30 Se proporcionan métodos para producir ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso (que también se denominan en la presente memoria como ácidos grasos anteiso y/o iso). El polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que cataliza una reacción asociada con la producción de ácido graso de cadena ramificada en la célula.

35 En un aspecto, la invención proporciona un método para producir un ácido graso anteiso. El método comprende cultivar una célula que comprende al menos un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que cataliza al menos una de las siguientes reacciones: (aa) conversión de piruvato en citramalato; (bb) conversión de citramalato en citraconato; (cc) conversión de citraconato en β-metil-D-malato; (dd) conversión de β-metil-D-malato en 2-oxobutanoato; o (ee) conversión de treonina en 2-oxobutanoato, en condiciones que permitan la expresión del polinucleótido o polinucleótidos, y la producción del ácido graso anteiso. La célula produce más ácidos grasos anteiso de lo que haría una célula similar que no comprendiera el polinucleótido o polinucleótidos. En algunas realizaciones, la célula comprende al menos un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que cataliza al menos una de las siguientes reacciones: (ff) conversión de 2-oxobutanoato a 2-aceto-2-hidroxi-butirato, (gg) conversión de 2-aceto-2-hidroxi-butirato a 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato, o (hh) conversión de 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato a 2-ceto-3-metilvalerato. Opcionalmente, el método además comprende extraer el ácido graso anteiso del cultivo, o extraer del cultivo un producto derivado del ácido graso anteiso.  
45

La invención también proporciona una célula que comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una treonina desaminasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, y un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa, en donde los polinucleótidos se expresan en la célula. Adicionalmente, la invención también proporciona una célula que comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una citramalato desacetilasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, y un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa, en donde los polinucleótidos se expresan en la célula. De manera opcional, la  
55

célula comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una acetohidroxiácido sintetasa y/o un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una tioesterasa. También se proporciona un método para producir ácido graso anteiso cultivando la célula.

- 5 Se ha descrito en la presente memoria una célula que tiene al menos un polinucleótido exógeno. De forma alternativa o adicional, la célula comprende un polinucleótido que se expresa en exceso. El polinucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico que cataliza una de las siguientes reacciones: conversión de isoleucina en 2-ceto, 3-metilvalerato; conversión de 2-ceto, 3-metilvalerato en 2-metilbutiril-CoA; conversión de 2-metilbutiril-CoA en 2-metilbutiril-ACP; conversión de 2-metilbutiril-ACP en 4-metil 3-cetohexanoil-ACP; conversión de 2-metilbutiril-CoA en 4-metil 3-cetohexanoil-ACP; o conversión de acil-ACP en ácidos grasos anteiso. La célula que comprende el polinucleótido exógeno produce más ácidos grasos anteiso de lo que haría una célula similar que no comprendiera el polinucleótido exógeno.

- 15 También se ha descrito un método para aumentar los ácidos grasos anteiso en una célula bacteriana. El método incluye expresar en una célula bacteriana un polinucleótido que codifica un polipéptido que cataliza una de las siguientes reacciones: conversión de 2-ceto, 3-metilvalerato en 2-metilbutiril-CoA; conversión de 2-metilbutiril-CoA en 2-metilbutiril-ACP; conversión de 2-metilbutiril-ACP en 4-metil 3-cetohexanoil-ACP; conversión de 2-metilbutiril-CoA en 4-metil 3-cetohexanoil-ACP; o conversión de acil-ACP en ácidos grasos anteiso, y cultivar las células bacterianas en condiciones que permitan a la célula producir el polipéptido de forma que se produzcan ácidos grasos anteiso.

- 20 Se describe adicionalmente una célula de *Escherichia coli* que produce ácidos grasos anteiso.

También se ha descrito un método para aumentar los ácidos grasos anteiso en una célula. El método incluye expresar en una célula un polinucleótido que codifica una aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa exógena, una  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (BCDH) exógena, y una 3-cetoacil-ACP sintetasa exógena; y cultivar la célula en condiciones tales que se producen ácidos grasos anteiso.

- 25 También se ha descrito un método para preparar ácidos grasos anteiso. El método incluye cultivar al menos una célula que comprende al menos un polinucleótido exógeno que codifica al menos un polipéptido que puede producir ácidos grasos anteiso a partir de isoleucina en condiciones en las que se producen dichos ácidos grasos anteiso.

- 30 Además, también se describe una célula que comprende al menos dos polinucleótidos exógenos. Los polinucleótidos exógenos comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos que catalizan al menos dos de las siguientes reacciones: conversión de leucina en 2-ceto, 4-metilvalerato; conversión de valina en 2-ceto 3-metilbutirato; conversión de 2-ceto, 4-metilvalerato en 3-metilbutiril-CoA; conversión de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiril-ACP; conversión de 3-metilbutiril-ACP en 5-metil 3-cetohexanoil-ACP; conversión de 2-ceto 3-metilbutirato en 2-metilpropionil-CoA; conversión de 2-metilpropionil-CoA en 2-metilpropionil-ACP; conversión de 2-metilpropionil-ACP en 4-metilvaleroil-ACP; conversión de 3-metilbutiril-CoA en 5-metil 3-cetohexanoil-ACP; conversión de 2-metilpropionil-CoA en 4-metil 3-cetovaleroil-ACP; o la conversión de acil-ACP en ácidos grasos iso, en donde la célula que comprende los polinucleótidos exógenos produce más ácidos grasos iso que otra célula por otra parte similar a la célula que no comprende los polinucleótidos exógenos.

- 40 También se ha descrito un método para aumentar los ácidos grasos iso en una célula bacteriana. El método incluye expresar en una célula bacteriana polinucleótidos que codifican al menos dos polipéptidos, catalizando los polipéptidos al menos dos de las siguientes reacciones: conversión de leucina en 2-ceto, 4-metilvalerato; conversión de valina en 2-ceto 3-metilbutirato; conversión de 2-ceto, 4-metilvalerato en 3-metilbutiril-CoA; conversión de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiril-ACP; conversión de 3-metilbutiril-ACP en 5-metil 3-cetohexanoil-ACP; conversión de 2-ceto 3-metilbutirato en 2-metilpropionil-CoA; conversión de 2-metilpropionil-CoA en 2-metilpropionil-ACP; conversión de 2-metilpropionil-ACP en 4-metilvaleroil-ACP; conversión de 3-metilbutiril-CoA en 5-metil 3-cetohexanoil-ACP; conversión de 2-metilpropionil-CoA en 4-metil 3-cetovaleroil-ACP; o conversión de acil-ACP en ácidos grasos iso, y cultivar las células bacterianas en condiciones que permitan a la célula producir los polipéptidos de tal forma que se produzcan ácidos grasos iso.

- 50 Cada uno de los siguientes párrafos numerados define sucintamente una o más variaciones ilustrativas de la descripción:

1. Un método para producir ácido graso anteiso, comprendiendo el método cultivar una célula que comprende al menos un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que cataliza al menos una de las siguientes reacciones: (aa) conversión de piruvato en citramalato; (bb) conversión de citramalato en citraconato; (cc) conversión de citraconato en  $\beta$ -metil-D-malato; (dd) conversión de  $\beta$ -metil-D-malato en 2-oxobutanoato; o (ee) conversión de treonina en 2-oxobutanoato en condiciones que permitan la expresión del polinucleótido o polinucleótidos y la producción de ácido graso anteiso, en donde la célula produce más ácidos grasos anteiso que una célula por otra parte similar que no comprende el polinucleótido o polinucleótidos.

2. El método del párrafo 1, que comprende además exponer la célula a tiamina.
3. El método del párrafo 1, que comprende además extraer el ácido graso anteiso del cultivo.
4. El método del párrafo 1, que comprende además extraer del cultivo un producto derivado de ácido graso anteiso.
- 5 5. El método del párrafo 1, en donde la célula comprende al menos un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que cataliza al menos una de las siguientes reacciones: (ff) conversión de 2-oxobutanoato a 2-aceto-2-hidroxi-butirato, (gg) conversión de 2-aceto-2-hidroxi-butirato a 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato, o (hh) conversión de 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato a 2-ceto-3-metilvalerato.
- 10 6. El método del párrafo 5, en donde la célula comprende polinucleótidos exógenos o expresados en exceso que codifican polipéptidos que catalizan 3, 4, 5, 6, 7, o todas las reacciones.
7. El método del párrafo 5, en donde la célula comprende polinucleótidos exógenos o expresados en exceso que codifican polipéptidos que catalizan las reacciones (aa), (bb), (cc), y (ff).
- 15 8. El método del párrafo 5, en donde la célula comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una citramato sintetasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una acetohidroxiácido sintetasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una isopropilmalato isomerasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una isopropilmalato deshidrogenasa, o una de sus combinaciones.
- 20 9. El método del párrafo 8, en donde la célula comprende un polinucleótido exógeno que codifica una citramato sintetasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una acetohidroxiácido sintetasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una isopropilmalato isomerasa, y un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una isopropilmalato deshidrogenasa.
10. El método del párrafo 8, en donde la citramalato sintetasa es CimA derivada de *M. jannaschii*.
- 25 11. El método del párrafo 8, en donde la isopropilmalato isomerasa es *E. coli* LeuCD.
12. El método del párrafo 8, en donde la isopropilmalato deshidrogenasa es *E. coli* LeuB.
13. El método del párrafo 8, en donde la acetohidroxiácido sintetasa es *E. coli* llvIH, *E. coli* llvIH (G14D), *E. coli* llvGM, o *B. subtilis* llvBH.
- 30 14. El método del párrafo 5, en donde la célula comprende polinucleótidos exógenos o expresados en exceso que codifican polipéptidos que catalizan las reacciones (ee) y (ff).
15. El método del párrafo 5, en donde la célula comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una treonina desaminasa y un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una acetohidroxiácido sintetasa.
16. El método del párrafo 15, en donde la treonina desaminasa es *E. coli* TdcB.
- 35 17. El método del párrafo 15, en donde la acetohidroxiácido sintetasa es *E. coli* llvIH, *E. coli* llvIH (G14D), *E. coli* llvGM, o *B. subtilis* llvBH.
18. El método del párrafo 5, en donde el uno o más polinucleótidos exógenos o expresados en exceso (i) comprenden una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 90 por ciento de identidad con la secuencia de ácido nucleico definida en la SEC ID N.º: 32, 36, 42, 43, 46, 51, 57, 62, 68, u 83, o (ii) que codifica una polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 por ciento de identidad con la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID N.º: 33, 39, 40, 41, 47, 48, 52, 53, 58, 40 65, 66, 67, 84, u 85.
19. El método del párrafo 5, en donde la célula se modifica para atenuar la actividad aminotransferasa de aminoácido de cadena ramificada.
- 45 20. El método del párrafo 5, en donde la célula además comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una acil transferasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que
- 50

comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una enoil-ACP reductasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una tioesterasa, o una de sus combinaciones.

- 5 21. El método del párrafo 20, en donde uno o más polinucleótidos exógenos o expresados en exceso comprenden una secuencia de ácido nucleico (i) que tiene al menos 90 por ciento de identidad con la secuencia de ácido nucleico definida en la SEC ID N.º: 1, 4, 7, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 68, 77, ó 78 o (ii) que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 por ciento de identidad con la secuencia de ácido nucleico definida en la SEC ID N.º: 10, 16, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ó 73.
- 10 22. El método del párrafo 20, en donde la célula comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa y un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa.
23. El método del párrafo 22, en donde la célula es una célula de *Escherichia*.
- 15 24. El método del párrafo 22, en donde la  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa es *B. subtilis* Bkd.
25. El método del párrafo 22, en donde la 3-cetoacil-ACP sintetasa es *B. subtilis* FabH.
26. El método del párrafo 22, en donde la célula además comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una tioesterasa.
- 20 27. Una célula que comprende: un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica a treonina desaminasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica a  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, y un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa, en donde los polinucleótidos se expresan y la célula produce más ácido graso que otra célula por otra parte similar que no comprende el polinucleótido o polinucleótidos.
- 25 28. La célula del párrafo 27, en donde la  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa es *B. subtilis* Bkd y la 3-cetoacil-ACP sintetasa es *B. subtilis* FabH.
29. La célula del párrafo 27 que comprende además un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una tioesterasa.
- 30 30. La célula del párrafo 27 que comprende además un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una acetohidroxiácido sintetasa.
31. La célula del párrafo 30, en donde la acetohidroxiácido sintetasa es *E. coli* llvIH, *E. coli* llvIH (G14D), *E. coli* llvGM, o *B. subtilis* llvBH.
- 35 32. La célula del párrafo 27, en donde la célula es una célula bacteriana que no produce ácidos grasos anteiso de manera natural.
33. La célula del párrafo 32, en donde la célula es una célula de *Escherichia*.
34. Un método para producir ácido graso anteiso, comprendiendo el método cultivar la célula bacteriana del párrafo 32 en condiciones que permitan la expresión de los polinucleótidos y la producción del ácido graso anteiso.
- 40 35. Una célula que comprende: un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una citramalato sintetasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, y un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa, en donde los polinucleótidos se expresan y la célula produce más ácido graso anteiso que otra célula por otra parte similar que no comprende el polinucleótido o polinucleótidos.
- 45 36. La célula del párrafo 35, en donde la citramalato sintetasa es CimA derivada de *M. jannaschii*, la  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa es Bkd de *B. subtilis*, y la 3-cetoacil-ACP sintetasa es FabH de *B. subtilis*.
- 50 37. La célula del párrafo 35 que comprende además un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una isopropilmalato isomerasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una

- isopropilmalato deshidrogenasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una acetohidroxiácido sintetasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una enoil-ACP sintetasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una tioesterasa, o una de sus combinaciones.
- 5
38. El método del párrafo 37, en donde la isopropilmalato isomerasa es *E. coli* LeuCD.
39. El método del párrafo 37, en donde la isopropilmalato deshidrogenasa es *E. coli* LeuB.
40. La célula del párrafo 37, en donde la acetohidroxiácido sintetasa es *E. coli* llvIH, *E. coli* llvIH (G14D), *E. coli* llvGM, o *B. subtilis* llvBH.
- 10 41. La célula del párrafo 35, en donde la célula es una célula bacteriana que no produce ácidos grasos anteiso de manera natural.
42. La célula del párrafo 41, en donde la célula es una célula de *Escherichia*.
43. Un método para producir ácido graso anteiso, comprendiendo el método cultivar la célula bacteriana del párrafo 41 en condiciones que permitan la expresión de los polinucleótidos y la producción del ácido graso anteiso.
- 15
44. Una célula que comprende al menos un polinucleótido exógeno, en donde el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que cataliza una de las siguientes reacciones: a. conversión de isoleucina en 2-ceto, 3-metilvalerato; b. conversión de 2-ceto, 3-metilvalerato en 2-metilbutiril-CoA; c. conversión de 2-metilbutiril-CoA en 2-metilbutiril-ACP; d. conversión de 2-metilbutiril-ACP en 4-metil 3-cetohexanoil-ACP; e. conversión de 2-metilbutiril-CoA en 4-metil 3-cetohexanoil-ACP; o f. conversión de acil-ACP en ácidos grasos anteiso, y en donde la célula que comprende el polipéptido exógeno produce más ácidos grasos anteiso que otra célula por otra parte similar que no comprende el polinucleótido exógeno.
- 20
45. La célula del párrafo 44, en donde el polinucleótido codifica una aminoácido aminotransferasa de cadena ramificada, una  $\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCDH), una acil transferasa, una 3-cetoacil-ACP sintetasa, o una tioesterasa.
- 25
46. La célula del párrafo 44, en donde la célula es una célula de *Escherichia*.
47. La célula del párrafo 44, en donde la célula comprende polinucleótidos que codifican polipéptidos que catalizan 2, 3, 4, 5, o todas las reacciones.
48. La célula del párrafo 44, en donde el polinucleótido tiene al menos 30 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 1, 4, 7, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ó 23.
- 30
49. La célula del párrafo 44, en donde el polipéptido tiene al menos 40 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 10, 16, 24, 25, 26, 27, 28, ó 29.
50. La célula del párrafo 44, en donde la célula es una célula de *Escherichia coli* y el polinucleótido tiene al menos 65 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 1, 4, 7, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ó 23.
- 35
51. La célula del párrafo 44, en donde el polipéptido es sustancialmente idéntico a un polipéptido que tiene la secuencia definida en la SEC ID N.º: 10, 16, 24, 25, 26, 27, 28, ó 29.
52. La célula del párrafo 44, en donde los ácidos grasos anteiso son ácidos grasos anteiso de cadena media.
53. La célula del párrafo 44, en donde los ácidos grasos anteiso no se producen de manera natural en la célula.
- 40 54. Ácidos grasos anteiso producidos en la célula del párrafo 44.
55. La célula del párrafo 44, en donde el polinucleótido codifica un gen de la ácido graso sintetasa procedente de un *Bacillus*, *Streptomyces*, o *Listeria*.
56. La célula del párrafo 44, en donde el polinucleótido codifica un gen ácido graso sintetasa procedente de un organismo que produce ácidos grasos ramificados de manera natural.
- 45 57. Un método para aumentar los ácidos grasos anteiso en una célula bacteriana, que comprende:
- a. expresar en una célula bacteriana un polinucleótido que codifica un polipéptido que cataliza una de las siguientes reacciones: i. conversión de 2-ceto, 3-metilvalerato en 2-metilbutiril-CoA; ii. conversión de 2-metilbutiril-CoA en 2-metilbutiril-ACP; iii. conversión de 2-metilbutiril-ACP en 4-metil 3-cetohexanoil-ACP; iv.

- conversión de 2-metilbutiril-CoA en 4-metil 3-cetohexanoil-ACP; o v. conversión de acil-ACP en ácidos grasos anteiso, y
- b. cultivar las células bacterianas en condiciones que permitan a la célula producir el polipéptido de forma que se produzcan ácidos grasos anteiso.
- 5 58. El método del párrafo 57, en donde la célula produce niveles mayores de ácidos grasos anteiso tras la expresión del polinucleótido de los que tenía antes de la expresión del polinucleótido.
59. El método del párrafo 57, en donde el polipéptido es una aminoácido aminotransferasa de cadena ramificada, una  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (BCDH), una 3-cetoacil-ACP sintetasa, o una tioesterasa.
- 10 60. El método del párrafo 57, en donde la célula es una célula de *Escherichia*.
61. El método del párrafo 57, en donde el método incluye expresar los polinucleótidos de la célula bacteriana que codifican polipéptidos que catalizan 2, 3, 4, 5 o todas las reacciones.
62. El método del párrafo 57, en donde el polinucleótido tiene al menos 30 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 1, 4, 7, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ó 23.
- 15 63. El método del párrafo 57, en donde el polipéptido tiene al menos 40 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 10, 16, 24, 25, 26, 27, 28, ó 29.
64. El método del párrafo 57, en donde la célula es una célula de *Escherichia coli* y el polinucleótido tiene al menos 65 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 1, 4, 7, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ó 23.
- 20 65. El método del párrafo 57, en donde el polipéptido es sustancialmente idéntico a un polipéptido que tiene la secuencia definida en la SEC ID N.º: 10, 16, 24, 25, 26, 27, 28, ó 29.
66. El método del párrafo 57, en donde los ácidos grasos anteiso son ácidos grasos anteiso de cadena media.
67. El método del párrafo 57, en donde los ácidos grasos anteiso no se producen de manera natural en la célula.
68. Ácidos grasos anteiso producidos según el método del párrafo 57.
- 25 69. Una célula de *Escherichia coli* que produce ácidos grasos anteiso.
70. La célula del párrafo 69, en donde los ácidos grasos anteiso son ácidos grasos anteiso de cadena media.
71. La célula del párrafo 69, en donde el polinucleótido comprende un polinucleótido con al menos 30 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 1, 4, 7, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ó 23.
- 30 72. Ácidos grasos anteiso producidos en la célula del párrafo 69.
73. Un método para aumentar los ácidos grasos anteiso en una célula, que comprende:
- a. expresar en una célula uno o más polinucleótidos que codifican una aminoácido aminotransferasa de cadena ramificada exógena, una  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (BCDH) exógena, y una 3-cetoacil-ACP sintetasa exógena;
- 35 b. cultivar la célula en condiciones tales que se producen ácidos grasos anteiso.
74. El método del párrafo 73, en donde el método incluye además expresar en la célula un polinucleótido que codifica una tioesterasa exógena.
75. La método del párrafo 73, en donde el polinucleótido tiene al menos 30 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 1, 4, 7, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ó 23.
- 40 76. El método del párrafo 73, en donde el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene al menos 40 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 10, 16, 24, 25, 26, 27, 28, ó 29.
77. El método del párrafo 73, en donde la célula es una célula de *Escherichia coli* y el polinucleótido tiene al menos 65 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 1, 4, 7, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ó 23.
- 45 78. El método del párrafo 76, en donde el polipéptido es sustancialmente idéntico a un polipéptido que tiene la secuencia definida en la SEC ID N.º: 10, 16, 24, 25, 26, 27, 28, ó 29.

79. El método del párrafo 73, en donde los ácidos grasos anteiso son ácidos grasos anteiso de cadena media.
80. El método del párrafo 73, en donde los ácidos grasos anteiso no se producen de manera natural en la célula.
81. Ácidos grasos anteiso producidos según el método del párrafo 73
- 5 82. Un método para preparar ácidos grasos anteiso, comprendiendo el método cultivar al menos una célula que comprende al menos un polinucleótido exógeno que codifica al menos un polipéptido que puede producir ácidos grasos anteiso a partir de isoleucina en condiciones en las que se producen dichos ácidos grasos anteiso.
83. El método del párrafo 82, en donde la célula es una célula de *Escherichia coli*.
84. El método del párrafo 82, en donde los ácidos grasos anteiso no se producen de manera natural en la célula.
- 10 85. Ácidos grasos anteiso producidos según el método del párrafo 82.
86. Una célula que comprende al menos dos polinucleótidos exógenos, en donde los polinucleótidos exógenos comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos que catalizan al menos dos de las siguientes reacciones: a. conversión de leucina en 2-ceto, 4-metilvalerato; b. conversión de valina en 2-ceto 3-metilbutirato; c. conversión de 2-ceto, 4-metilvalerato en 3-metilbutiril-CoA; d. conversión de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiril-ACP; e. conversión de 3-metilbutiril-ACP en 5-metil 3-cetohexanoil-ACP; f. conversión de 2-ceto 3-metilbutirato en 2-metilpropionil-CoA; g. conversión de 2-metilpropionil-CoA en 2-metilpropionil-ACP; h. conversión de 2-metilpropionil-ACP en 4-metilvaleroil-ACP; i. conversión de 3-metilbutiril-CoA en 5-metil 3-cetohexanoil-ACP; j. conversión de 2-metilpropionil-CoA en 4-metil 3-cetovaleroil-ACP; o k. la conversión de acil-ACP en ácidos grasos iso, y en donde la célula que comprende los polinucleótidos exógenos produce más ácidos grasos iso que otra célula por otra parte similar a la célula que no comprende los polinucleótidos exógenos.
- 15 87. La célula del párrafo 86, en donde los polinucleótidos codifican una aminoácido aminotransferasa de cadena ramificada, una  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (BCDH), una acil transferasa, una 3-cetoacil-ACP sintetasa, o una tioesterasa.
- 20 88. La célula del párrafo 86, en donde la célula es una célula de *Escherichia*.
89. La célula del párrafo 86, en donde los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica polipéptidos que catalizan 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o todas las reacciones.
90. La célula del párrafo 86, en donde el polinucleótido tiene al menos 30 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 1, 4, 7, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ó 23.
- 30 91. La célula del párrafo 86, en donde el polipéptido tiene al menos 40 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 10, 16, 24, 25, 26, 27, 28, ó 29.
92. La célula del párrafo 86, en donde la célula es una célula de *Escherichia coli* y el polinucleótido tiene al menos un 65 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia definida en la SEC ID N.º: 1, 4, 7, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ó 23.
- 35 93. La célula del párrafo 86, en donde el polipéptido es sustancialmente idéntico a un polipéptido que tiene la secuencia definida en la SEC ID N.º: 10, 16, 24, 25, 26, 27, 28, ó 29.
94. La célula del párrafo 86, en donde los ácidos grasos iso son ácidos grasos iso de cadena media.
95. La célula del párrafo 86, en donde los ácidos grasos iso no se producen de manera natural en la célula.
96. Ácidos grasos iso producidos en la célula del párrafo 86.
- 40 97. La célula del párrafo 86, en donde el polinucleótido codifica un gen de la ácido graso sintetasa procedente de un *Bacillus*, *Streptomyces*, o *Listeria*.
98. La célula del párrafo 86, en donde el polinucleótido codifica un gen de la ácido graso sintetasa procedente de un organismo que produce ácidos grasos ramificados de manera natural.
99. Un método para aumentar los ácidos grasos iso en una célula bacteriana, que comprende:
- 45 a. expresar en una célula bacteriana polinucleótidos que codifican al menos dos polipéptidos, catalizando los polipéptidos al menos dos de las siguientes reacciones: i. conversión de leucina en 2-ceto, 4-metilvalerato; ii. conversión de valina en 2-ceto 3-metilbutirato; iii. conversión de 2-ceto, 4-metilvalerato en 3-metilbutiril-CoA; iv. conversión de 3-metilbutiril-CoA en 3-metilbutiril-ACP; v. conversión de 3-metilbutiril-ACP en 5-metil 3-cetohexanoil-ACP; vi. conversión de 2-ceto 3-metilbutirato en 2-metilpropionil-CoA; vii. conversión de 2-



metilpropionil-CoA en 2-metilpropionil-ACP; viii. conversión de 2-metilpropionil-ACP en 4-metilvaleroil-ACP; ix. conversión de 3-metilbutiril-CoA en 5-metil 3-cetoheptanoil-ACP; x. conversión de 2-metilpropionil-CoA en 4-metil 3-cetovaleroil-ACP; y xi. conversión de acil-ACP en ácidos grasos iso, y

- 5 b. cultivar la célula bacteriana en condiciones que permitan a la célula producir los polipéptidos de forma que se produzcan ácidos grasos iso.
100. Un método para aumentar la acumulación de ácidos grasos anteiso en el medio de cultivo utilizando una cepa hospedadora que no pueda degradar ácidos grasos.
101. La cepa hospedadora del párrafo 100, en donde el organismo es *E. coli*.
102. La cepa hospedadora del párrafo 100, en donde el organismo es un mutante *fadD* de *E. coli*.
- 10 103. Un método para aumentar la producción de los ácidos grasos anteiso en una célula, que comprende: a. expresar en una célula un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una de las siguientes actividades: citramalato sintetasa, isopropilmalato isomerasa, y/o isopropilmalato deshidrogenasa, y b. cultivar la célula en condiciones que permitan a la célula producir los polipéptidos, de forma que se produzcan los ácidos grasos anteiso.
- 15 104. El método del párrafo 103, en donde el método incluye expresar los polinucleótidos en la célula bacteriana que codifican polipéptidos que tienen 2 o 3 de las actividades.
105. Un método de aumentar los ácidos grasos anteiso en una célula, que comprende: a. expresar en una célula un polinucleótido que codifica al menos uno de *ilvA*, *tdcB*, *ilvI*, *ilvH*, *ilvC*, y/o *ilvD*, y b. cultivar la célula en condiciones que permitan a la célula producir los polipéptidos codificados por el polinucleótido, de forma que se produzcan los ácidos grasos anteiso.
- 20 106. Un método para aumentar la producción de ácido graso iso y/o anteiso en una célula, que comprende: a. expresar en la célula un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una actividad acetil-CoA carboxilasa, y b. cultivar la célula en condiciones que permitan a la célula producir los polipéptidos de forma que se produzcan los ácidos grasos iso y/o anteiso.

## 25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos anteiso e iso de cadena ramificada.

La Figura 2 es un diagrama de la ruta de biosíntesis de ácidos graso anteiso dependiente de treonina.

La Figura 3 es la secuencia de ADN del operón *bkd* amplificado (SEC ID N.º: 1).

La Figura 4 muestra las secuencias de los cebadores *bkd* (SEC ID N.º: 2, 3).

30 La Figura 5 es la secuencia de ADN del gen *lpdV* del operón *bkd* (SEC ID N.º: 4).

La Figura 6 muestra las secuencias de los cebadores *fabHA* (SEC ID N.º: 5, 6, 8, 9).

La Figura 7 es la secuencia de ADN de *Bacillus subtilis fabHA* (SEC ID N.º: 7).

La Figura 8 es la secuencia de aminoácidos de *FabHA* de *Bacillus subtilis* (SEC ID N.º: 10).

La Figura 9 muestra las secuencias de los cebadores *fabHB* (SEC ID N.º: 11, 12, 14, y 15).

35 La Figura 10 es la secuencia del ADN de *fabHB* de *Bacillus subtilis* (SEC ID N.º: 13).

La Figura 11 es la secuencia de aminoácidos de *FabHA* de *Bacillus subtilis* (SEC ID N.º: 16).

La Figura 12 es la secuencia de ADN del gen de la ácido graso de cadena media tioesterasa en medio de Mallard optimizada para el codón (SEC ID N.º: 17).

40 La Figura 13 es una alineación del marco de lectura abierto (ORF) optimizado (SEC ID N.º: 17) con la secuencia original de la ácido graso tioesterasa de cadena media en medio de Mallard (SEC ID N.º: 18).

La Figura 14 es la secuencia de ADN de un gen de la ácido graso tioesterasa de cadena media en medio de mama de rata optimizado para el codón (SEC ID N.º: 19).

La Figura 15 es una alineación del ORF optimizado (SEC ID N.º: 19) con la ácido graso tioesterasa de cadena media en medio de mama de rata original (SEC ID N.º: 20).

La Figura 16 es un gráfico que representa el efecto del suplemento de isoleucina sobre la producción de ácido graso anteiso.

La Figura 17 es un diagrama de la ruta de síntesis de ácidos grasos anteiso independiente de treonina.

La Figura 18 es la secuencia de ADN del gen *bkdAA* del operón *bkd* (SEC ID N.º: 21)

5 La Figura 21 es la secuencia de la proteína *lpdV* del operón *bkd* (SEC ID N.º: 24)

La Figura 22 es la secuencia de la proteína *bkdAA* del operón *bkd* (SEC ID N.º: 25)

La Figura 23 es la secuencia de la proteína *bkdAB* del operón *bkd* (SEC ID N.º: 26)

La Figura 24 es la secuencia de la proteína *bkdB* del operón *bkd* (SEC ID N.º: 27)

10 La Figura 25 es la secuencia de la proteína de la ácido graso tioesterasa de cadena media en medio de Mallard (SEC ID N.º: 28)

La Figura 26 es la secuencia de la proteína de la ácido graso tioesterasa de cadena media en medio de mama de rata (SEC ID N.º: 29)

15 La Figura 27 es un gráfico de barras que ilustra la producción del ácido graso anteiso C15 (fracción de ácidos grasos anteiso C-15 de grupo total de ácidos grasos sintetizados; eje y) en cepas de *E. coli* K27-Z1 (cepas progenitoras), K27-Z1 (*Bs bkd Bs fabH*), K27-Z1 (*Bs bkd Bs fabH Ec tdcB*), y K27-Z1 (*Bs bkd Bs fabH Ec tdcB Ec ilvIH(G14D)*) (eje x). Los cultivos se prepararon por triplicado, con una desviación estándar de las medidas de ácidos graso indicada por las barras de error.

20 La Figura 28 es un gráfico de barras que ilustra la producción de ácido graso anteiso C15 y C17 en las cepas K27-Z1 derivadas de *E. coli* que expresan diferentes genes AHAS. Las cepas derivadas K27-Z1 (eje x) comprenden los siguientes plásmidos y genes: (i) pTrcHisA y pZA31MCS (vector control); (ii) *Bs bkd Bs fabHA* pTrcHisA; (iii) *Bs bkd fabHA Ec tdcB*; (iv) *Bs bkd fabHA Ec tdcB Ec ilvIH*; (v) *Bs bkd fabHA Ec tdcB Ec ilvIH(G14D)*; y (vi) *Bs bkd Bs fabHA Ec tdcB Bs ilvBH*. El área del pico de análisis mediante cromatografía de gases se representa en el eje y. Una réplica biológica se representa mediante el análisis por duplicado de los ácidos grasos.

25 La Figura 29 es un gráfico de barras que ilustra la producción de ácido graso anteiso C15 en derivados BL21 Star (DE3) de *E. coli*.

30 La Figura 30 es un gráfico de barras que ilustra la producción de ácido graso anteiso C15 y C17 en las siguientes cepas derivadas de *E. coli*: K27-Z1 (pTrcHisA pZA31 MCS (vector control)), K27-Z1 (*Bs bkd Bs fabHA*), K27-Z1 (*Bs bkd Bs fabHA Ec tdcB*), y K27-Z1 (*Bs bkd Bs fabHA Ec tdcB Ec ilvGM*). Una réplica biológica se ensaya mediante el análisis por duplicado de los ácidos grasos; las desviaciones estándar se indican mediante las barras de error.

35 La Figura 31 es un gráfico de barras que ilustra la producción de ácido graso anteiso C15 y C17 en los derivados K27-Z1 de *E. coli* diseñados para producir las proteínas recombinantes indicadas: Bkd-FabHA, Bkd-FabHA-CimA-LeuBCD, Bkd-FabHA-CimA-LeuBCD-IlvIH, Bkd-FabHA-CimA-LeuBCD-IlvIH(G14D), Bkd-FabHA-CimA-LeuBCD-IlvBH, y Bkd-FabHA-CimA-LeuBCD-IlvGM.

La Figura 32 es un gráfico de barras que ilustra la producción de ácido graso anteiso C13, C15 y C17 en *E. coli* K27-Z1 (*Bs bkd Bs fabH*) y *E. coli* K27-Z1 (*Bs bkd Bs fabHA Ec tesA*).

La Figura 33 es un gráfico de barras que ilustra la producción de ácido graso anteiso C13, C15 y C17 en *E. coli* BL21 Star (DE3) (*Bs bkd Bs fabHA*) y BL21 Star (DE3) (*Bs bkd Bs fabHA Ec tesA*).

40 La Figura 34 es un gráfico de barras que ilustra la producción de ácido graso anteiso C15 y C17 en *E. coli* cultivada en presencia y ausencia de tiamina. Los derivados de *E. coli* se diseñaron para producir las proteínas recombinantes indicadas. Las muestras duplicadas se indican por "n.º 2." La presencia de tiamina en el medio de cultivo mejora la producción de ácido graso anteiso.

45 La Figura 35 es un gráfico de barras que ilustra la producción de ácido graso anteiso C15 y C17 en una cepa de delección *ilvE* de *E. coli* (*Bs bkd Bs fabHA Ec tdcB Ec ilvIH(G14D)*) y una cepa de delección de control *ilvE* (pZA31 MCS pTrcHisA).

La Figura 36 es un gráfico de barras que ilustra la producción de ácido graso de cadena ramificada anteiso e iso en derivados BW25113 de *E. coli* que contienen polinucleótidos que codifican FabH de *Listeria monocytogenes* y Bkd de *B. subtilis*.

50 **Descripción detallada de la invención**

- La invención se refiere a ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso producidos de forma biológica, y a la producción biológica mejorada de dichos ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso. Esta producción biológica mejorada puede, en algunas realizaciones, proporcionar mayores rendimientos de ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso. De forma adicional, o alternativa, la invención proporciona la capacidad de personalizar la longitud de cadena de los ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso para obtener una longitud de cadena deseada.
- En la presente memoria, “amplificar” “amplificado,” o “amplificación” se refiere a cualquier proceso o protocolo para copiar una secuencia de polinucleótido en un mayor número de moléculas de polinucleótido, por ejemplo, mediante transcripción inversa, reacción en cadena de la polimerasa, y reacción en cadena de la ligasa.
- En la presente memoria, una “secuencia de sentido contrario” se refiere a una secuencia que se hibrida de forma específica con una segunda secuencia de polinucleótido. Por ejemplo, una secuencia de sentido contrario es una secuencia de ADN que está invertida con respecto a su orientación normal para transcripción. Las secuencias de sentido contrario pueden expresar un transcrito de ARN que sea complementario de una molécula de ARNm diana expresada en la célula huésped (p. ej., se puede hibridar con la molécula de ARNm diana mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick).
- En la presente memoria, “ADNc” se refiere a un ADN que es complementario o idéntico de un ARNm, tanto en forma monocatenaria como en forma bicatenaria.
- En la presente memoria, “complementario” se refiere a un polinucleótidos cuyas bases están emparejadas con un segundo polinucleótido. Dicho de otra forma, “complementario” describe la relación entre dos secuencias de ácidos nucleicos monocatenarias que se hibridan con emparejamiento de bases. Por ejemplo, un polinucleótido que tiene la secuencia 5'-GTCCGA-3' es complementario de un polinucleótido con la secuencia 5'-TCGGAC-3'.
- En la presente memoria, una “sustitución conservativa” se refiere a la sustitución en un polipéptido de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una funcionalidad similar. Dicho de otra forma, una sustitución conservativa implica la sustitución de un residuo de aminoácidos por un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la materia familias de residuos de aminoácidos con cadenas laterales similares, que incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, e histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico y ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, y cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, y triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina e isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, e histidina).
- En la presente memoria, “codificar” se refiere a la propiedad inherente de los nucleótidos para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas. Salvo que se indique lo contrario, una “secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos” incluye todas las secuencias de nucleótidos que sean versiones degeneradas entre sí y que codifiquen la misma secuencia de aminoácidos.
- En la presente memoria, “endógeno” se refiere a polinucleótidos, polipéptidos u otros compuestos que se expresan o se originan de manera natural en un organismo o célula. Esto es, polinucleótidos, polipéptidos u otros compuestos endógenos no son exógenos. Por ejemplo, un polinucleótido o péptido “endógeno” está presente en la célula cuando la célula se aísla originalmente de la naturaleza.
- En la presente memoria, “vector de expresión” se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos a expresar. Por ejemplo, los vectores de expresión adecuados se pueden replicar de forma autónoma en plásmidos, o integrarse en el cromosoma. Un vector de expresión también puede ser un vector basado en virus.
- En la presente memoria, “exógeno” se refiere a cualquier polinucleótido o polipéptido que no se exprese de manera natural en la célula u organismo concreto donde se desea la expresión. Los polinucleótidos, polipéptidos u otros compuestos endógenos no son exógenos.
- En la presente memoria, “hibridación” incluye cualquier proceso mediante el que una hebra de ácido nucleico se una a una hebra de ácido nucleico complementaria mediante emparejamiento de bases. Así, el término se refiere a la capacidad del complemento de una secuencia diana para unirse a una secuencia de ensayo (por ejemplo, una diana), o viceversa.
- En la presente memoria, las “condiciones de hibridación” se clasifican de forma típica por el grado de “rigor” de las condiciones en las que se mide la hibridación. El grado de rigor se puede basar, por ejemplo, en la temperatura de hibridación ( $T_m$ ) del complejo o sonda que se une al ácido nucleico. Por ejemplo, el “máximo rigor” se produce de forma típica a aproximadamente  $T_m - 5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ$  por debajo de la  $T_m$  de la sonda); “rigor alto” a aproximadamente  $5-10^\circ$  por debajo de la  $T_m$ ; “rigor intermedio” a aproximadamente  $10-20^\circ$  por debajo de la  $T_m$  de la sonda; y “rigor bajo” a aproximadamente  $20-25^\circ$  por debajo de la  $T_m$ ; De forma alternativa, o adicional, las condiciones de hibridación se pueden basar en las condiciones de sal o fuerza iónica de la hibridación y/o de uno o más lavados con rigor. Por ejemplo,  $6\times\text{SSC}$ =rigor muy

- bajo; 3xSSC=rigor de bajo a medio; 1xSSC=rigor medio; y 0,5xSSC=rigor alto. Desde el punto de vista funcional, las condiciones de rigor máximo se pueden utilizar para identificar secuencias de ácido nucleico con una identidad estricta (es decir, aproximadamente 100%) o una identidad casi estricta con la sonda de hibridación; mientras que se usan condiciones de rigor alto para identificar secuencias de ácido nucleico que tienen aproximadamente 80% o más de identidad de secuencia con la sonda.
- En la presente memoria, “idéntica” o por ciento de “identidad”, en el contexto de dos o más secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para obtener la máxima correspondencia, tal como se mide con algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual.
- En la presente memoria, “ácidos grasos de cadena larga” se refiere a ácidos grasos con colas alifáticas de más de 14 carbonos,
- En la presente memoria, “ácidos grasos de cadena media” se refiere a ácidos grasos con colas alifáticas de entre 6 y 14 carbonos, En algunas realizaciones, los ácidos grasos de cadena media tienen de 11 a 13 carbonos.
- En la presente memoria, “de origen natural” se refiere a un objeto que se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluidos virus) que se puede aislar de una fuente natural, y que no se ha modificado por el hombre de forma intencionada en el laboratorio es de origen natural.
- En la presente memoria, “unido operativamente”, cuando se describe la relación entre dos regiones de ADN o dos regiones de un polipéptido, significa que las regiones están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado de forma que permita la traducción; una secuencia está unida operativamente a un péptido si actúa como secuencia señal, tal como participando en la secreción de la forma madura de la proteína.
- En la presente memoria, “expresión en exceso” se refiere a la expresión de un polinucleótido para producir un producto (p. ej., un polipéptido o ARN) a un nivel superior en el que el polinucleótido se expresa de forma normal en la célula huésped. Un polinucleótido expresado en exceso es un polinucleótido natural en la célula huésped, cuyo producto se genera en cantidad mayor del que se encuentra de manera natural en la célula huésped. La expresión en exceso se consigue, por ejemplo, y sin limitación, uniendo de forma operativa el polinucleótido de un promotor diferente a un promotor natural del polinucleótido o introduciendo copias adicionales del polinucleótido en la célula huésped.
- En la presente memoria, “polinucleótido” se refiere a un polímero compuesto de nucleótidos. El polinucleótido puede estar en forma de un fragmento independiente o como un componente de una secuencia de nucleótidos mayor en una construcción, que se ha derivado de una secuencia de nucleótidos aislada al menos una vez en cantidad o concentración suficiente que permita la identificación, manipulación y recuperación de la secuencia y sus secuencias de nucleótidos componentes siguiendo métodos normales de biología molecular, por ejemplo, usando un vector de clonación. Cuando una secuencia de nucleótidos está representada por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) donde “U” sustituye a “T.” Dicho de otra forma, “polinucleótido” se refiere a un polímero de nucleótidos separados de otros nucleótidos (un fragmento o entidad independiente) o bien puede ser un componente o elemento de una construcción nucleotídica superior, tal como un vector de expresión o una secuencia policistrónica. Los polinucleótidos incluyen secuencias de ADN, ARN y ADNc.
- En la presente memoria, “polipéptido” se refiere a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos que pueden contener o no modificaciones tales como grupos fosfato y grupos formilo.
- En la presente memoria, “vector de expresión recombinante” se refiere a una construcción de ADN utilizada para expresar un polinucleótido que, por ej., codifica un polipéptido deseado. Un vector de expresión recombinante puede incluir, por ejemplo, una subunidad transcripcional que comprende (i) un conjunto de elementos genéticos con un papel regulador de la expresión génica, por ejemplo, promotores y potenciadores, (ii) una secuencia estructural o de codificación que se transcribe al ARNm se traduce a proteína, y (iii) secuencias adecuadas para iniciar y finalizar la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión recombinantes se construyen de cualquier manera adecuada. La naturaleza del vector no es importante, y se puede usar cualquier vector, incluidos plásmidos, virus, bacteriófagos y trasposones. Los posibles vectores para usar en la invención incluyen, aunque no de forma limitativa, secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, p. ej., plásmidos bacterianos; ADN de fago; plásmidos de levaduras; y vectores derivados de combinaciones de ADN plásmido y de fago, ADN de virus tales como vaccinia, adenovirus, viruela aviar, baculovirus, SV40, y seudorabias.
- En la presente memoria, “cebador” se refiere a un polinucleótido que puede hibridarse de forma específica a un molde de polinucleótido designado y proporcionar un punto de inicio para la síntesis de un polinucleótido complementario, cuando el cebador polinucleótido se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis. En

la presente memoria, “polinucleótido recombinante” se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no se unen entre sí de manera natural. Un polinucleótido recombinante se puede incluir en un vector adecuado, y el vector se puede utilizar para transformar una célula huésped adecuada. Una célula huésped que comprende el polinucleótido recombinante se denomina como “célula huésped recombinante”. A continuación, el polinucleótido se expresa en la célula huésped recombinante para producir, p. ej., un polipéptido recombinante”.

En la presente memoria, “hibridación específica” se refiere a la unión, duplicación o hibridación de un polinucleótido preferentemente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas.

En la presente memoria, “condiciones rigurosas” se refiere a las condiciones en las que una sonda se hibridará preferentemente a su subsecuencia diana, y en menor medida, o nada en absoluto, a otras secuencias.

En la presente memoria, “ácidos grasos de cadena corta” se refiere a ácidos grasos con colas alifáticas inferiores a 6 carbonos,

En la presente memoria, “sustancialmente homólogo” o “sustancialmente idéntico” en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos se refiere por lo general a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen una identidad de al menos 40%, 60%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% nucleótidos o residuos de aminoácidos, cuando se comparan y alinean para obtener la correspondencia máxima, tal como se mide con algoritmos de comparación de secuencia o mediante examen visual. La identidad sustancial puede existir para cualquier región de las secuencias, adecuada, tal como por ejemplo, una región que tenga al menos aproximadamente 50 residuos de longitud, una región que tenga al menos aproximadamente 100 residuos o una región que tenga al menos aproximadamente 150 residuos. En determinadas realizaciones, las secuencias son sustancialmente idénticas para la longitud total de cualquiera de los biopolímeros de comparación, o para ambos.

En un aspecto, la invención se refiere a un método novedoso para producir ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso (o productos derivados de ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso) usando bacterias. En un aspecto, el método presenta la incorporación de uno o más polinucleótidos exógenos que aumentan la producción de ácido graso anteiso o iso en una célula adecuada, tal como, por ejemplo, por transfección o transformación de la célula con el polinucleótido o polinucleótidos. De forma alternativa o adicional, el método comprende la expresión en exceso de uno o más polinucleótidos para aumentar la producción de ácido graso anteiso o iso dentro de la célula huésped. Las rutas metabólicas ilustrativas para producir ácido graso anteiso e iso en una célula huésped se ilustran en las Figuras 1, 2, y 17. La Figura 1 ilustra rutas metabólicas para producir (1) ácido graso anteiso mediante una ruta que incluye la conversión de isoleucina en 2-ceto 3-metilvalerato, (2) los ácidos grasos de cadena ramificada iso con un número total de átomos de carbono impar mediante una ruta que incluye la conversión de leucina en 2-ceto-isocaproato (también denominado 2-ceto, 4-metilvalerato), y (3) los ácidos grasos de cadena ramificada iso con un número total de átomos de carbono par mediante una ruta que incluye la conversión de valina en 2-ceto-isovalerato (también denominado como 2-ceto 3-metilbutirato). En determinadas realizaciones, dirigir el flujo de carbono hacia al precursor 2-cetoácido ramificado da como resultado un aumento en la producción del correspondiente ácido graso de cadena ramificada. Por ejemplo, 1) al aumentar el flujo de carbono a la ruta de la isoleucina da como resultado una mayor producción de ácido graso anteiso; 2) aumentar el flujo de carbono hacia la ruta de la leucina da como resultado una mayor producción de ácido graso de cadena ramificada con un número de átomos de carbono impar; y/o 3) aumentar el flujo de carbono hacia la ruta de la valina da como resultado una mayor producción de ácido graso de cadena ramificada con un número de átomos de carbono par; Las Figuras 2 y 17 ilustran rutas para generar isoleucina y/o 2-ceto 3-metilvalerato a partir de treonina o piruvato, respectivamente. El aumento del flujo de carbono a las rutas de la treonina y/o piruvato mejora la producción de ácido graso de cadena ramificada anteiso en una célula huésped recombinante.

En un aspecto, la invención proporciona un método para producir un ácido graso anteiso. El método comprende cultivar una célula que comprende al menos un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que cataliza al menos una de las siguientes reacciones: (aa) conversión de piruvato a citramalato; (bb) conversión de citramalato a citraconato; (cc) conversión de citraconato a  $\beta$ -metil-D-malato; (dd) conversión de  $\beta$ -metil-D-malato a 2-oxobutanoato; o (ee) conversión de treonina a 2-oxobutanoato. De manera opcional, la célula comprende al menos un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que cataliza al menos una de las siguientes reacciones: (ff) conversión de 2-oxobutanoato a 2-aceto-2-hidroxi-butirato, (gg) conversión de 2-aceto-2-hidroxi-butirato a 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato, o (hh) conversión de 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato a  $\alpha$ -ceto-3-metilvalerato. En algunas realizaciones, la célula comprende polinucleótidos exógenos o expresados en exceso que codifican polipéptidos que catalizan 3, 4, 5, 6, 7, o todas las reacciones. La célula se cultiva en condiciones que permitan la expresión del polinucleótido o polinucleótidos, y la producción del ácido graso anteiso. La invención se debe, al menos en parte, a la observación de que las células huésped que comprenden las modificaciones genéticas descritas en la presente memoria producen más ácidos grasos anteiso que una célula por otra parte similar que no comprende el polinucleótido o polinucleótidos. Se describen en más detalle a continuación rutas metabólicas y modificaciones genéticas para aumentar la producción de ácido graso anteiso e iso en una célula.

Un método para aumentar el flujo de carbono a la ruta de la isoleucina comprende regular en exceso la producción de 2-ceto 3-metilvalerato mediante la ruta dependiente de treonina de la Figura 2. Treonina se puede

producir a niveles elevados en, por ejemplo, *E. coli* (Lee y col., *Molecular Systems Biology* 3: 149 (2007)) y, mediante la serie de etapas mostradas en la Figura 2, isoleucina se produce a partir de treonina mediante 2-ceto 3-metilvalerato como producto intermedio. Como se ilustra en la Figura 2, la ruta dependiente de treonina conlleva la conversión de treonina en 2-oxobutanoato mediante, p. ej., treonina desaminasa; la conversión de 2-oxobutanoato en 2-aceto 2-hidroxi-butilato mediante, p. ej., acetohidroxiácido sintetasa (AHAS) (también conocida como acetohidroxibutanoato sintetasa); conversión de 2-aceto 2-hidroxi-butilato a 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato mediante, p. ej., acetohidroxiácido isomeroeductasa; y conversión de 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato a 2-ceto-3-metil-valerato mediante, p. ej., dihidroxiácido deshidratasa. La ruta se optimiza para un flujo de carbono a 2-ceto-3-metil-valerato y finalmente al ácido graso anteiso por expresión de polinucleótidos exógenos o expresando en exceso polinucleótidos exógenos que codifican una o más de las actividades descritas anteriormente. Por ejemplo, la ruta se optimiza para un flujo de carbono de 2-ceto 3-metil-valerato por expresión en exceso de *ilvA*, *tdcB*, *ilvI*, *ilvH*, *ilvC* y/o *ilvD*. *IlvA* y *TdcB* son treonina desaminasas. *IlvC* es una acetohidroxiácido isomeroeductasa (también conocida como cetol-ácido reductoisomerasa), e *IlvD* es una dihidroxiácido deshidratasa. *IlvI* e *IlvH* son dos subunidades que constituyen AHAS, que cataliza la formación de 2-acetolactato a partir de piruvato para la síntesis de valina o leucina, o la formación de 2-aceto-2-hidroxibutilato a partir de 2-oxobutanoato y piruvato para la biosíntesis de isoleucina (véase la Figura 1). Las dos reacciones AHAS son etapas irreversibles y dirigidas a la síntesis de dos conjuntos diferentes de aminoácidos ramificados. En determinadas realizaciones, por ejemplo, la delección de AHAS I (*ilvBN*) y/o la sobreproducción de AHAS II (*ilvGM*) y/o AHAS III (*ilvIH*) minimizan la producción de ácido graso iso derivado de leucina o valina. *IlvBH* también es un AHAS adecuado para usar en el contexto de la invención.

Así, en un aspecto, la célula de la invención comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica un polipéptido que cataliza la conversión de treonina en 2-oxobutanoato (p. ej., una treonina desaminasa) y un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica un polipéptido que cataliza la conversión de 2-oxobutanoato en 2-aceto 2-hidroxi-butilato (p. ej., un AHAS).

En determinadas realizaciones, las células u organismos de la invención se diseñan mediante ingeniería genética para acumular ácidos grasos anteiso en condiciones limitantes de nitrógeno y a utilizar una ruta de síntesis de isoleucina independiente de treonina, tal como la ruta del piruvato mostrada en la Figura 17. Como se ilustra en la Figura 17, el piruvato se combina con acetil-CoA para producir citramalato mediante, p. ej., citramalato sintetasa. Una citramalato sintetasa ilustrativa es *CimA*, tal como *CimA* derivada de *M. jannaschii*. El citramalato se convierte en continuación en citraconato mediante, p. ej., una citraconato hidrolasa (también conocida como isopropilmalato o citramalato isomerasa), un ejemplo de la cual se codifica mediante *leuCD*. El citraconato se convierte en  $\beta$ -metil-D-malato mediante, p. ej., una isopropilmalato isomerasa (tal como *LeuCD*), y el  $\beta$ -metil-D-malato resultante se convierte en 2-oxobutanoato (también denominado como  $\alpha$ -cetobutilato) mediante, p. ej., isopropilmalato deshidrogenasa (tal como *LeuB*). La ruta del piruvato converge con la ruta de la treonina de la Figura 2, como 2-oxobutanoato se convierte en 2-aceto-2-hidroxi-butilato mediante, p. ej., AHAS; 2-aceto 2-hidroxi-butilato se convierte en 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato mediante, p. ej., acetohidroxiácido isomeroeductasa; y 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato se convierte en 2-ceto-3-metil-valerato mediante, p. ej., dihidroxiácido deshidratasa. La ruta se optimiza para un flujo de carbono a 2-ceto-3-metil-valerato y finalmente al ácido graso anteiso por expresión de polinucleótidos exógenos o expresando en exceso polinucleótidos endógenos que codifican una o más de las actividades descritas anteriormente. Por ejemplo, la ruta se optimiza para un flujo de carbono hacia 2-ceto 3-metil-valerato mediante la expresión en exceso o la expresión de *cimA*, *leuCD*, *leuB*, *ilvI*, *ilvH*, *ilvC* y/o *ilvM*, y/o *ilvD* exógeno.

Así, en un aspecto, la célula de la invención comprende polinucleótidos exógenos o expresados en exceso que codifican polipéptidos que catalizan la conversión de piruvato a citramalato, la conversión de citramalato a citraconato, la conversión de citraconato a  $\beta$ -metil-D-malato, y la conversión de 2-oxobutanoato a 2-aceto-2-hidroxi-butilato. Por ejemplo, en una realización, la célula comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una citramalato sintetasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una isopropilmalato isomerasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una isopropilmalato deshidrogenasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una AHAS, o una de sus combinaciones, incluida una combinación de polinucleótidos que codifican los cuatro polipéptidos.

En un aspecto, la célula huésped se modifica para expresar un polinucleótido exógeno o expresar en exceso un polinucleótido natural que codifica una o más actividades enzimáticas que median las reacciones posteriores que dan lugar a ácido graso anteiso o iso a partir de isoleucina, leucina o valina. Por ejemplo, según muestra la Figura 1, en determinadas realizaciones, las células se modifican para producir ácidos grasos anteiso mediante una ruta que incluye la conversión de isoleucina en 2-ceto 3-metilvalerato mediante un aminoácido ramificado aminotransferasa (BCAT). De forma alternativa, el 2-ceto 3-metilvalerato se introduce en la ruta de biosíntesis de la isoleucina sin convertirse previamente en isoleucina. El 2-ceto 3-metilvalerato se convierte a continuación en 2-metilbutiril-CoA mediante, p. ej., una  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (BCDH), tal como una BCDH codificada por *bkd*. La 2-metilbutiril-CoA se condensa con una malonil-ACP mediante, p. ej., una 3-cetoacil-ACP sintetasa, y la incorporación posterior de malonil-ACP se procesa mediante la biosíntesis de ácido graso en acil-ACP anteiso. Acil-ACP se convierte a continuación en ácidos grasos anteiso mediante una tioesterasa.

En determinadas realizaciones, los ácidos grasos ramificados con un número de átomos de carbono impar se producen mediante una ruta que incluye la conversión de leucina en 2-ceto-isocaproato (también denominado como 2-ceto, 4-metilvalerato) mediante, p. ej., una BCAT. Si se desea, 2-ceto-isocaproato se introduce en la ruta de biosíntesis de la leucina sin convertirse previamente en leucina. El 2-ceto-isocaproato se convierte a continuación en isovaleril-CoA (también denominado como 3-metilbutiril-CoA) mediante, p. ej., una BCDH, tal como una BCDH codificada mediante *bkd*. La isovaleril-CoA se condensa con una malonil-ACP mediante, p. ej., una 3-cetoacil-ACP sintetasa, y la incorporación posterior de malonil-ACP se procesa mediante la biosíntesis de ácido graso en acil-ACP iso. Acil-ACP iso se convierte a continuación en ácidos grasos iso mediante una tioesterasa.

Además, en determinadas realizaciones, los ácidos grasos ramificados con un número de átomos de carbono par se producen mediante una ruta que incluye la conversión de valina en 2-ceto-isovalerato (también denominado como 2-ceto, 3-metilbutirato) mediante una BCAT. De manera opcional 2-ceto-isovalerato se introduce en la ruta de biosíntesis de valina sin convertirse previamente en valina. El 2-ceto-isovalerato se convierte a continuación en isobutil-CoA mediante, p. ej., una BCDH, tal como una BCDH codificada mediante *bkd*. La isobutil-CoA se condensa con una malonil-ACP mediante, p. ej., una 3-cetoacil-ACP sintetasa, y la incorporación posterior de malonil-ACP se procesa mediante la biosíntesis de ácido graso en acil-ACP iso. Acil-ACP iso se puede convertir a continuación en ácidos grasos iso mediante una tioesterasa.

Así, en algunas realizaciones, la célula huésped comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una BCDH o un fragmento biológicamente activo o variante de la misma. De manera alternativa, o adicional, la célula comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una BCAT y/o un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una acil transferasa. De manera alternativa, o adicional, la célula comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa que utiliza cebadores anteiso y/o iso ramificado-CoA como sustratos en una célula adecuada. De manera adicional o alternativa, la célula comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una enoil-ACP reductasa. De manera adicional o alternativa, la célula comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una tioesterasa. Dependiendo de la actividad y la especificidad de la tioesterasa, dichas células recombinantes pueden producir ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso que tengan la longitud de cadena deseada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula huésped preferentemente genera ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos de cadena media, o una combinación deseada de los mismos (p. ej., 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o más del ácido graso comprende el número de átomos de carbono deseados). Las combinaciones de cualquiera de las enzimas descritas en la presente memoria también se contemplan, tal como, una célula que comprende polinucleótidos exógenos o expresados en exceso que codifican BCDH, 3-cetoacil-ACP sintetasa, y una tioesterasa (tal como TesA). Así, la invención contempla una célula diseñada mediante ingeniería genética para aumentar el flujo de carbono hacia las rutas dependientes de treonina y/o independientes de treonina como se ha descrito anteriormente y que comprende además polinucleótidos exógenos o expresados en exceso que aumentan el flujo de carbono hacia las rutas de la isoleucina, leucina, y/o valina como se ilustra en la Figura 1. De manera opcional, uno o más polinucleótidos exógenos o expresados en exceso comprenden una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 90 por ciento de identidad con la secuencia de ácido nucleico definida en las SEC ID N.º: 1, 4, 7, 13, 17-23, 68, 77, ó 78.

De manera adicional o alternativa, en determinadas realizaciones, la producción de ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso se potencia por modificación de las células para aumentar la actividad acetil-CoA carboxilasa. Por ejemplo la producción de una o más subunidades de enzima se aumenta mediante, p. ej., el aumento de la cantidad de biotina disponible por aumento en la actividad o en la cantidad de biotina-proteína ligasa, BirA. La sobre-regulación de los niveles de tiamina en una célula huésped mediante, por ejemplo, el aumento de la producción de tiamina sintetasa, también se contempla en la presente memoria para mejorar adicionalmente la síntesis de ácido graso de cadena ramificada.

En algunas realizaciones de la invención, la célula se diseña mediante ingeniería genética para expresar uno o más polinucleótidos exógenos que codifican una o más de las actividades enzimáticas descritas en la presente memoria y/o que se diseña mediante ingeniería genética para expresar uno o más polinucleótidos endógenos que codifican una o más de las actividades enzimáticas descritas en la presente memoria. Distintos microorganismos fabrican ácidos grasos usando diferentes rutas, y las reacciones endógenas para sintetizar ácido graso pueden drenar recursos de la síntesis de ácido graso de cadena ramificada. Así, en determinadas realizaciones, la actividad de la enzima natural se atenúa para potenciar la síntesis de ácido graso de cadena ramificada. Por ejemplo, en *E. coli*, que no produce de forma natural ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso, la primera reacción de condensación en la síntesis de ácido graso es la reacción de acetil-CoA con malonil-ACP, lo que proporciona 3-cetobutil-ACP (Smirnova y Reynolds, *J. Industrial Microbiology & Biotechnology* 27: 246-51 (2001)). Esta reacción se cataliza en primer lugar mediante el producto de *fabH*, una 3-cetoacil-ACP sintetasa. La 3-cetoacil-ACP sintetasa de *E. coli*, sin embargo, muestra especificidad en que prefiere acetil-CoA sobre la acil-CoA ramificada tal como 2-metilbutiril-CoA (Choi y col., *J. Bacteriology* 182: 365-70 (2000)). Reducir o eliminar la actividad endógena de FabH mediante inhibidores químicos tales como cerulenina o por ingeniería genética (p. ej., por creación de un mutante doble *fabD* y *fabH*) reduce la cantidad de los ácidos grasos de cadena lineal producidos. Si se desea, la producción de ácido graso de cadena ramificada también se aumenta eliminando o reduciendo la capacidad de una célula huésped (p. ej., *E. coli*) para fabricar ácidos grasos de cadena lineal mediante por ejemplo, la incorporación de

genes de síntesis de ácido graso derivados de *Exiguobacterium* para acortar la longitud de cadena y/o aumentar la cantidad de ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso.

De manera adicional o alternativa, se puede utilizar la inactivación o eliminación genética que minimiza el flujo de carbono a las rutas ramificadas que no contribuyen a la formación del ácido graso anteiso o iso. Por ejemplo, la actividad isoleucina transaminasa se atenúa para redirigir el flujo de carbono desde la síntesis de isoleucina a la síntesis de ácido graso de cadena ramificada anteiso (véanse las Figuras 2 y 17). A este respecto, la célula se modifica genéticamente para reducir la expresión de *ilvE* o inhibir la actividad del producto génico. De forma alternativa, la célula se modifica para generar un mutante *fadD* defectivo en la conversión de ácido graso a acil-CoA graso, la primera etapa en la degradación de ácido graso. El contenido en ácido graso se incrementa de esta forma. De manera alternativa, o adicional, la célula se modifica para atenuar la actividad aminotransferasa de aminoácido ramificado (BCAT). La actividad enzimática se atenúa (es decir, se reduce o elimina) mediante, por ejemplo, mutación de la secuencia codificante de la enzima para crear un polipéptido no funcional o con una funcionalidad reducida, eliminando la secuencia codificante de la enzima del genoma celular, interfiriendo la traducción del transcrito de ARN que codifica la enzima (p. ej., usando oligonucleótidos de sentido contrario), o por manipulación de las secuencias de control de la expresión que afectan a la expresión de la enzima.

Los ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso se producen usando cualesquiera células u organismos modificados, tales como, por ejemplo, las células bacterianas y otras células procariotas, células de levadura, o células de mamífero. En determinadas realizaciones, la invención se refiere a células, tales como células de *Escherichia* (p. ej., *E. coli*), que no producen de forma natural ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso. Estas células se diseñan mediante ingeniería genética para producir ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso como se describe en la presente memoria. En un aspecto, las células se modifican para producir ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso a niveles deseados y con longitudes de cadena deseadas. Además, en determinadas realizaciones, las células diseñadas mediante ingeniería genética toleran grandes cantidades de ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso en el medio de crecimiento, membrana plasmática o gotículas lipídicas, y/o producir ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso de forma más económica que una célula no modificada mediante, p. ej., usar una fuente menos cara, que requiere menos tiempo de fermentación, y similares.

En determinadas realizaciones, las células u organismos que de forma natural producen ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso, tales como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces avermitilis*, se modifican como se describe en la presente memoria para producir niveles mayores de ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso en comparación con una célula u organismo no modificado. La optimización se consigue, por ejemplo, incorporando mutaciones reguladoras que conducen a niveles mayores de ácidos grasos en las células y/o expresando en exceso actividades enzimáticas para el precursor y/o precursores de cetoácido ramificado para la ruta de síntesis de ácido graso. La optimización también se puede conseguir atenuando la actividad enzimática que desvía el flujo de carbono de la producción de ácido graso de cadena ramificada. De manera alternativa, o adicional, las células producen ácidos grasos de cadena ramificada anteiso y/o iso con longitudes de cadena especificadas. Si se desea, se selecciona una tioesterasa que sea específica de una longitud de cadena particular. Por ejemplo, las tioesterasas de la glándula uropigial de Mallard y de la glándula mamaria de rata generan preferentemente ácidos grasos de longitud de cadena media que tienen colas alifáticas C6-C14.

Las bacterias ilustrativas que de manera natural producen ácidos grasos de cadena ramificada y que son adecuado para usar en la invención incluyen, aunque no de forma limitativa, *Spirochaeta aurantia*, *Spirochaeta littoralis*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Legionella anisa*, *Moraxella catarrhalis*, *Thermus aquaticus*, *Flavobacterium aquatile*, *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides fragilis*, *Succinimonas amyolytica*, *Desulfovibrio africanus*, *Micrococcus agilis*, *Stomatococcus mucilaginosus*, *Planococcus citreus*, *Marinococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Ruminococcus albus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus anthracis*, *Sporolactobacillus inulinus*, *Clostridium thermocellum*, *Sporosarcina ureae*, *Desulfotomaculum nigrificans*, *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Renibacterium salmoninarum*, *Kurthia zopfii*, *Corynebacterium aquaticum*, *Arthrobacter radiotolerans*, *Brevibacterium fermentans*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Eubacterium lentum*, *Cytophaga aquatilis*, *Sphingobacterium multivorumb*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Sporocytophaga myxococcoides*, *Flexibacter elegans*, *Myxococcus coraloides*, *Archangium gephyra*, *Stigmatella aurantiaca*, *Oerskovia turbata*, y *Saccharomonospora viridis*. Los microorganismos ilustrativos que producen ácidos grasos de cadena ramificada también se han descrito, p. ej., en Kaneda, *Microbiol. Rev.* 55(2): 288-302 (1991) (véase la Tabla 3).

El polinucleótido o polinucleótidos que codifican una o más actividades enzimáticas para producir ácidos grasos anteiso y/o iso se pueden derivar de cualquier fuente. Dependiendo de la realización de la invención, el polinucleótido se aísla de una fuente natural tal como bacterias, algas, hongos, plantas, o animales; se produce por una ruta semisintética (p. ej., la secuencia de ácido nucleico de un polinucleótido se optimiza para el codón para su expresión en una célula huésped particular como *E. coli*); o se sintetiza *de novo*. En determinadas realizaciones, es ventajoso seleccionar una enzima de una fuente concreta basada en, p. ej., la especificidad de la enzima por el sustrato, el tipo de ácido graso de cadena ramificada producido por la fuente, o el nivel de actividad enzimática en una célula huésped dada. En un aspecto de la invención, la enzima y el polinucleótido correspondiente se encuentran de forma natural en la célula huésped y se desea la expresión en exceso del polinucleótido. A este



respecto, en algunos casos, se introducen copias adicionales del polinucleótido en la célula huésped para aumentar la cantidad de enzima disponible para la producción de ácido graso. La sobreexpresión de un polinucleótido nativo también se consigue regulando en exceso la actividad del promotor endógeno, o uniendo de forma operativa el polinucleótido a un promotor más sólido.

5 Las enzimas exógenas y sus correspondientes polinucleótidos son también adecuados para usar en el contexto de la invención, y los rasgos de la ruta de biosíntesis o del producto final se pueden hacer a medida dependiendo de la enzima concreta utilizada. Si se desea, el polinucleótido o polinucleótidos se aíslan o derivan de los organismos productores de ácido graso de cadena ramificada descritos en la presente memoria. Por ejemplo, FabH de *E. coli*, una 3-cetoacil-ACP sintetasa, utiliza preferiblemente la acetil-CoA como sustrato en lugar de la acil-CoA ramificada, mientras que FabH de *B. subtilis* impulsa de manera más eficaz la síntesis de ácido graso ramificado. Así, en un aspecto, la célula es una célula de *E. coli* que comprende un polinucleótido que codifica un FabH de *B. subtilis*.

Una citramalato sintetasa ilustrativa producida por las células se deriva de CimA de *M. jannaschii*. AHAS ilustrativas incluyen *E. coli* llvIH, *E. coli* llvIH (G14D), *E. coli* llvGM, y *B. subtilis* llvBH. Una BCDH ilustrativa es Bkd de *B. subtilis*, y una 3-cetoacil-ACP sintetasa ilustrativa es FabH de *B. subtilis*. Una treonina desaminasa ilustrativa es TdcB de *E. coli*. Las tioesterasas ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, TesA de *E. coli*, tioesterasa de la glándula uropigial de Mallard, y tioesterasa de glándula mamaria de rata. Una isopropilmalato isomerasa ilustrativa es LeuCD de *E. coli*, y una isopropilmalato deshidrogenasa ilustrativa es LeuB de *E. coli*. En un aspecto, la célula comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 90 por ciento de identidad con la secuencia de ácido nucleico definida en la SEC ID N.º: 32, 36, 42, 43, 46, 51, 57, 62, 68, u 83, o codifica una polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 por ciento de identidad con la secuencia de aminoácido definida en la SEC ID N.º: 33, 39, 40, 41, 47, 48, 52, 53, 58, 65, 66, 67, 84, u 85. Las enzimas ilustrativas que median en la producción de ácidos grasos anteiso y/o iso también se han descrito en la Tabla A.

25 Tabla A

Actividad	Nombre del gen	Organismo	N.º acceso
Aminoácido de cadena ramificada transaminasa	<i>ilvE</i>	<i>Salmonella enteric</i>	NP_457845
	<i>ilvE</i>	<i>Yersinia pestis</i>	YP_002348774
	<i>ilvE</i>	<i>Shigella flexneri</i>	NP_709575
	<i>ilvE</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	YP_003018265
	<i>ilvE</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	YP_003753411
2-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, componente E1, subunidad alfa	<i>bkdAA</i>	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	YP_002315323
	<i>bfmBAA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	NP_374631
	<i>bkdA1</i>	<i>Sphingobium japonicum</i>	YP_003544745
	<i>bkdA1</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	YP_002771850
2-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, componente E1, subunidad beta	<i>bkdA</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	YP_001987607
	<i>bkdAB</i>	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	YP_002315324
	<i>bfmBAB</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	NP_374630
	<i>bkdA2</i>	<i>Sphingobium japonicum</i>	YP_003544746
2-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, componente E2	<i>bkdA2</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	YP_002771851
	<i>bkdB</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	YP_001987606
	<i>bkdB</i>	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	YP_002315325
	<i>bfmBB</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	NP_374629
	<i>pdhC</i>	<i>Sphingobium japonicum</i>	YP_003544747

ES 2 525 150 T3

	<i>bkdB</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	YP_002771852
	<i>bkdC</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	YP_001987605
2-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, componente E3	<i>lpdV</i>	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	YP_002315322
		<i>Staphylococcus aureus</i>	NP_374632
	<i>pdhD</i>	<i>Sphingobium japonicum</i>	YP_003545508
	<i>Lpd</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	YP_002771849
	<i>bkdD</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	YP_001987608
3-cetoacil-ACP sintetasa III	<i>fabH</i>	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	YP_146657.1
		<i>Bacillus megaterium</i>	YP_003561163.1
	<i>fabH</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ZP_05601460.1
	<i>fabH1</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	P72392
		<i>Beutenbergia cavernae</i>	YP_002881824
citramalato sintetasa	<i>cimA</i>	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	YP_003424156
	<i>cimA</i>	<i>Leptospira interrogans</i>	ABK13754
		<i>Ignicoccus hospitalis</i>	ABU82163
		<i>Cyanothece 51142</i>	YP_001801665
		<i>Geobacter sulfurreducens</i>	NP_952848
3-isopropilmalato deshidrogenasa	<i>leuB</i>	<i>Cronobacter turicensis</i>	YP_003209069.1
	<i>leuB</i>	<i>Shigella boydii</i>	YP_406624
	<i>leuB</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	YP_001651485
	<i>leuB</i>	<i>Cronobacter turicensis</i>	YP_003209069
	<i>leuB</i>	<i>Pantoea ananatis</i>	YP_003519000
isopropilmalato isomerasa subunidad grande	<i>leuC</i>	<i>Salmonella enteric</i>	NP_459116
	<i>leuC</i>	<i>Serratia proteamaculans</i>	YP_001476977
	<i>leuC</i>	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	YP_003039932
	<i>leuC</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	YP_002917788
	<i>leuC</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	NP_439151
isopropilmalato isomerasa subunidad pequeña	<i>leuD</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	YP_401823
	<i>leuD</i>	<i>Buchnera aphidicola</i>	YP_002477704
	<i>leuD</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	YP_001967934
	<i>leuD</i>	<i>Haemophilus somnus</i>	YP_718599
	<i>leuD</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	YP_365316
treonina desaminasa	<i>Cha1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_001018030
	<i>ilvA</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	YP_002157347
	<i>ilvA</i>	<i>Shewanella violacea</i>	YP_003558613

ES 2 525 150 T3

	<i>ilvA</i>	<i>Metilococcus capsulatus</i>	YP_112886
	<i>ilvA</i>	<i>Dichelobacter nodosus</i>	YP_001209243
treonina deshidratasa	<i>tdcB</i>	<i>Pantoea ananatis</i>	YP_003519179
	<i>tdcB</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	YP_001335951
	<i>tdcB</i>	<i>Shigella boydii</i>	YP_409322
	<i>tdcB</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	YP_001706275
	<i>tdcB</i>	<i>Psychrobacter arcticum</i>	YP_264671
acetolactato sintetasa (AHAS) subunidad III grande	<i>ilvI</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	YP_001005008
	<i>ilvI</i>	<i>Salmonella enterica</i>	YP_002113134
	<i>ilvI</i>	<i>Buchnera aphidicola</i>	NP_240056
	<i>ilvI</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	YP_003469370
	<i>ilvI</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	YP_001333772
acetolactato sintetasa (AHAS) subunidad III pequeña	<i>ilvH</i>	<i>Laribacter hongkongensis</i>	YP_002794162
	<i>ilvH</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	YP_103450
	<i>ilvH</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i>	NP_841373
	<i>ilvH</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	YP_178690
	<i>ilvH</i>	<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	YP_003156951
acetolactato sintetasa (AHAS) subunidad II grande	<i>ilvG</i>	<i>Yersinia pestis</i>	YP_002348776
	<i>ilvG</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	YP_003752653
	<i>ilvG</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	NP_887973
	<i>ilvG</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	YP_001140066
	<i>ilvG</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	YP_001973605
acetolactato sintetasa (AHAS) subunidad II pequeña	<i>ilvM</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	YP_405398
	<i>ilvM</i>	<i>Dickeya dadantii</i>	YP_002989351
	<i>ilvM</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	YP_003470064
	<i>ilvM</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>	NP_931846
	<i>ilvM</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i>	YP_199583
cetol-ácido reductoisomerasa	<i>ilvC</i>	<i>Buchnera aphidicola</i>	NP_240398
	<i>ilvC</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	YP_002442658
	<i>ilvC</i>	<i>Francisella tularensis</i>	YP_001122021
	<i>ilvC</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	YP_205911
	<i>ilvC</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	YP_001652891
dihidroxiácido deshidratasa	<i>ilvD</i>	<i>Citrobacter rodentium</i>	YP_003367413
	<i>ilvD</i>	<i>Buchnera aphidicola</i>	YP_002468875
	<i>ilvD</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	YP_001901776

	<i>ivlD</i>	<i>Mitilococcus capsulatus</i>	YP_114512
	<i>ivlD</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	NP_900947
enoil-ACP reductasa	<i>fabI</i>	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	YP_001124839
	<i>fabI</i>	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	YP_002316451
	<i>fabI</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	ZP_05298370
	<i>fabI</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ZP_04796766
	<i>fabI</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>	ABN54364

En determinadas realizaciones, la célula recombinante produce un análogo o variante del polipéptido que codifica una actividad enzimática implicada en la biosíntesis de ácido graso. Las variantes de secuencia de aminoácidos de los polipéptidos incluyen variantes de sustitución, inserción, o delección, y las variantes pueden ser sustancialmente homólogas o sustancialmente idénticas a los polipéptidos no modificados, como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones, las variantes retienen al menos parte de la actividad biológica, p. ej., la actividad catalítica, del polipéptido. Otras variantes incluyen variantes del polipéptido que retienen al menos aproximadamente 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, de la actividad biológica.

Las variantes de sustitución intercambian de forma típica un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína. Las sustituciones de este tipo pueden ser conservativas, esto es, un aminoácido se sustituye por otro de forma y carga similares. Las sustituciones conservativas incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; isoleucina por leucina o valina; leucina por valina o isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina o isoleucina; fenilalanina por tirosina, leucina o metionina; serina por treonina; treonina por serina; triptófano por tirosina; tirosina por triptófano o fenilalanina; y valina por isoleucina o leucina.

En algunos casos, la célula recombinante comprende un análogo o variante del polinucleótido o polinucleótidos exógenos o expresados en exceso descritos en la presente memoria. Las variantes de secuencia de ácido nucleico incluyen una o más sustituciones, inserciones o delecciones, y las variantes pueden ser sustancialmente homólogas o sustancialmente idénticas al polinucleótido no modificado. Las variantes o análogos de polinucleótido codifican enzimas mutantes que tienen al menos parcialmente la actividad de la enzima no modificada. De forma alternativa, las variantes o análogos de polinucleótido codifican la misma secuencia de aminoácidos que el polinucleótido no modificado. Las secuencias optimizadas para el codón, por ejemplo, codifican por lo general la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia precursora/natural pero contiene codones que se expresan preferentemente en un organismo hospedador particular.

Un polipéptido o polinucleótido “derivado de” un organismo contiene una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos o en la secuencia de nucleótidos natural y presenta una actividad similar, incluso mejor, si se compara con la enzima natural (p. ej., al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, o al menos 110% del nivel de actividad de la enzima natural). Por ejemplo, la actividad enzimática se mejora en algunos contextos mediante la evolución dirigida de una secuencia precursora/natural. De manera adicional o alternativa, una secuencia codificante de enzima se muta para conseguir retroresistencia. La citramalato sintetasa CimA3.7 derivada de *M. jannaschii* y descrita en el Ejemplo 14 está truncada y comprende sustituciones si se compara con la enzima citramalato sintetasa natural de *M. jannaschii*. Las modificaciones confieren retroresistencia a la enzima CimA3.7 y mejora su actividad. Análogamente, la sustitución de glicina por aspartato en la posición de aminoácido 14 de la secuencia AHAS en IlvIH de *E. coli* (designada como IlvIH (G14D)) confiere resistencia a la inhibición con 2-aceto-2-hidroxi-butarato. Así, en una o más realizaciones de la invención, el polipéptido codificado por el polipéptido exógeno es retroresistente y/o está modificado para alterar la actividad de la enzima natural.

Las células recombinantes se pueden producir de cualquier manera adecuada para establecer un vector de expresión dentro de la célula. El vector de expresión puede incluir el polipéptido exógeno unido de forma operativa con los elementos de expresión, tal como por ejemplo, promotores, potenciadores, sitios de unión a ribosoma, operadores y secuencias de activación. Dichos elementos de expresión se pueden regular, por ejemplo, inducir (mediante la adición de un inductor). De manera alternativa, o adicional, el vector de expresión puede incluir copias adicionales de un polinucleótido que codifica un producto génico natural unido de forma operativa a los elementos de expresión. Los ejemplos representativos de promotores útiles incluyen, aunque no de forma limitativa: el promotor LTR (repetición larga terminal 35 de un retrovirus) o SV40, el promotor *lac*, *tet*, o *trp* de *E. coli*, el promotor del fago Lambda P<sub>L</sub>, así como otros promotores conocidos para controlar la expresión de genes en células procariontas o eucariotas, o sus virus. En un aspecto, el vector de expresión también incluye secuencias adecuadas para amplificar la expresión. El vector de expresión puede comprender elementos que faciliten la incorporación de polinucleótidos al genoma celular. La introducción del vector de expresión o de otros polinucleótidos en las células se puede llevar a cabo con cualquier método, como por ejemplo, transformación,

electroporación, microinyección, bombardeo con microproyectiles, precipitación con fosfato de calcio, precipitación modificada con fosfato de calcio, tratamiento con lípidos catiónicos, fotoporación, metodologías de fusión, transferencia mediada por recepción o precipitación en membranas de polímero. De forma alternativa, el vector de expresión u otros polinucleótidos se pueden introducir mediante infección con un vector vírico, mediante conjugación, mediante transducción, o mediante otro método adecuado.

Las células como las células bacterianas o cualquier otra célula huésped deseada que contienen los polinucleótidos que codifican las proteínas exógenas o expresadas en exceso se cultivan en condiciones adecuadas para el crecimiento de las células y la expresión del polinucleótido o polinucleótidos. Las células que expresan el polipéptido o polipéptidos se pueden identificar mediante cualquier método adecuado, como por ejemplo, cribado por PCR, cribado por análisis mediante transferencia Southern, o cribado para determinar la expresión de la proteína. En determinadas realizaciones, las células que contienen el polinucleótido se pueden seleccionar incluyendo un marcador detectable en la construcción de ADN, y posteriormente cultivar las células que contienen un marcador seleccionable, en condiciones adecuadas para la supervivencia de solamente las células que expresan el gen marcador seleccionado. La construcción de ADN introducida se puede amplificar adicionalmente cultivando células genéticamente modificadas en las condiciones adecuadas (p. ej., cultivando células modificadas genéticamente que contienen un gen marcador amplificable en presencia de la concentración de un fármaco donde solamente las células que contienen múltiples copias del gen marcador amplificable pueden sobrevivir. Las células que contienen y expresan polinucleótidos que codifican las proteínas exógenas o expresadas en exceso reciben el nombre en la presente memoria de células genéticamente modificadas. Las células bacterianas que contienen y expresan polinucleótidos que codifican las proteínas exógenas o expresadas en exceso reciben el nombre en la presente memoria de células bacterianas genéticamente modificadas.

En determinadas realizaciones, las células genéticamente modificadas (tal como las células bacterianas genéticamente modificadas) tienen una temperatura de crecimiento óptima, tales como, por ejemplo una temperatura inferior a la que se encuentra habitualmente para el crecimiento y/o la fermentación. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la incorporación de ácidos grasos de cadena ramificada a la membrana aumenta la fluidez de la membrana, una propiedad asociada normalmente con temperaturas de crecimiento menores. Además, en determinadas realizaciones, las células de la invención presentan un declive en el crecimiento a temperaturas superiores si se compara con las temperaturas normales de crecimiento y/o fermentación que se encuentran habitualmente en células de ese tipo.

Cualquier condición de cultivo celular adecuada para hacer crecer una célula huésped y sintetizar ácidos grasos anteiso y/o iso es adecuada para usar en el método de la invención. En la presente memoria se contempla la adición de productos intermedios, precursores, y/o cofactores de la síntesis de ácidos grasos a las enzimas asociadas con la síntesis de ácido graso de cadena ramificada anteiso y/o iso al cultivo. En una realización, el método comprende exponer la célula huésped a tiamina, que potencia la síntesis de ácido graso anteiso. Isoleucina, leucina, y/o valina se añaden al cultivo en algunas realizaciones.

El método de la invención comprende de forma opcional extraer el ácido graso anteiso y/o iso del cultivo. Los ácidos grasos se pueden extraer del medio de cultivo y medirse de cualquier forma adecuada. Los métodos de extracción adecuados incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en Bligh y col., "A rapid method for total lipid extraction and purification," *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917 (1959). En determinadas realizaciones, se puede medir la producción de ácidos grasos en el sobrenadante del cultivo o en la fracción de membrana de las células recombinantes. En esta realización, los cultivos se preparan de la forma normal, aunque se pueden añadir al cultivo nutrientes (p. ej., 2-metilbutirato, isoleucina) que pueda suponer un impulso al suministro de sustrato. Las células se recogen mediante centrifugación, se acidifican con ácido clorhídrico o perclórico, y se extraen con cloroformo y metanol, donde los ácidos grasos entran en la capa orgánica. Los ácidos grasos se convierten a ésteres de metilo usando metanol a 100 °C. Los ésteres de metilo se separan mediante cromatografía de gases (CG) y se comparan con patrones conocidos de ácidos grasos de cadena lineal, iso y anteiso (adquiridos de Larodan o Sigma). La confirmación de la identidad química se lleva a cabo mediante cromatología combinada de gases/masas, donde si es necesario se realiza un análisis mediante espectroscopía de masas adicional sobre el material fragmentado.

En una realización, la célula utiliza el ácido graso de cadena ramificada anteiso y/o iso como precursor para preparar uno o más productos adicionales. Los productos biosintetizados (es decir, derivados) de ácido graso anteiso o iso incluyen, aunque no de forma limitativa, fosfolípidos, triglicéridos, alcanos, olefinas, ésteres de cera, alcoholes grasos, y aldehídos grasos. Algunas células huésped generan de forma natural uno o más productos derivados de ácido graso anteiso o iso; otras células huésped están diseñadas mediante ingeniería genética para transformar ácido graso ramificado en, p. ej., un alcano, olefina, éster de cera, alcohol graso, y/o aldehído graso. Los organismos y sus modificaciones genéticas para sintetizar productos derivados de ácidos grasos de cadena ramificada se describen en más detalle en, p. ej., las publicaciones de patente internacional con números WO 2007/136762, WO 2008/151149, y WO 2010/062480, y en la publicación de solicitud estadounidense 2010/0298612. En un aspecto, el método de la invención comprende extraer un producto derivado de ácido graso anteiso (fosfolípido, triglicérido, alcano, olefina, éster de cera, alcohol graso y/o aldehído graso sintetizado en la célula a partir del ácido graso anteiso) del cultivo. Cualquier método de extracción es adecuado, incluyendo los métodos de extracción descritos en las publicaciones de patente internacional con números WO 2007/136762, WO 2008/151149, y WO 2010/062480, y

en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense con números US-2010/0251601, US-20100242345, US-20100105963, y US-2010/0298612.

- 5 En una realización, la invención proporciona una célula que comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una treonina desaminasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una acetohidroxiácido sintetasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica a  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, y un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa. La célula además comprende de manera opcional un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una tioesterasa. Los polinucleótidos se expresan en la célula. En un aspecto, la célula es una célula bacteriana que no produce de manera natural ácido graso anteiso, tal como *Escherichia coli*. La invención proporciona además un método para producir ácido graso anteiso, comprendiendo el método cultivar la célula bacteriana en condiciones que permitan la expresión de los polinucleótidos y la producción del ácido graso anteiso.
- 10
- 15 En otra realización, la invención proporciona una célula que comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una citramato sintetasa (tal como *M. jannaschii* CimA o un derivado retrorresistente de la misma), un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica a  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (tal como *B. subtilis* Bkd), y un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa (tal como *B. subtilis* FabH), en donde los polinucleótidos se expresan en la célula. La célula además comprende de manera opcional al menos un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una isopropilmalato isomerasa, una isopropilmalato deshidrogenasa, una acetohidroxiácido sintetasa (tal como *E. coli* llvIH, *E. coli* llvIH (G14D), *E. coli* llvGM, o *B. subtilis* llvBH), una tioesterasa, o una de sus combinaciones.
- 20
- 25 La célula de la invención preferiblemente produce más ácido graso anteiso de lo que haría una célula similar que no comprendiera el polinucleótido o polinucleótidos. Los métodos para medir el ácido graso liberado en el caldo de fermentación o en el medio de cultivo se describen en la presente memoria. La producción de ácido graso anteiso no está limitada al ácido graso acumulado en el cultivo, sin embargo, pero también incluye el ácido graso usado como precursor de las reacciones posteriores que proporcionan productos derivados del ácido graso anteiso. Así, los productos derivados del ácido graso anteiso (o iso) (p. ej., fosfolípidos, triglicéridos, alcoholes grasos, ésteres de cera, aldehídos grasos y alcanos) son, en algunas realizaciones, formas secundarias para medir la producción de ácido graso ramificado en una célula huésped. Los métodos para medir el contenido en ácido graso en los fosfolípidos de la membrana celular se describen en la presente memoria. Análogamente, la medición de los productos de degradación de los ácidos grasos de cadena ramificada anteiso también es instructiva de la cantidad de ácido graso anteiso que se produce en una célula huésped. Dependiendo de la realización particular de la invención, la célula de la invención produce al menos 3%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 25%, o al menos 50% más ácido graso anteiso que una célula por otra parte similar que no comprende el polinucleótido o polinucleótidos.
- 30
- 35

40 Los **Ejemplos** siguientes describen y demuestran más detalladamente realizaciones dentro del ámbito de la presente invención. Los ejemplos son únicamente a título ilustrativo y no deben interpretarse como limitaciones a la presente invención.

*Ejemplo 1.* Construcción de vectores de expresión de *Bacillus subtilis bkd*.

Este ejemplo demuestra la producción de un vector de expresión recombinante par la expresión de *B. subtilis bkd* en, p. ej., *E. coli*.

- 45 Se preparó ADN genómico a partir de *B. subtilis* 168 (*Bacillus* Genetic Stock Center, Columbus, OH) por repicado de una colonia de una placa de agar, suspensión de la colonia en 100  $\mu$ l de Tris 1 mM pH 8,0, EDTA, 0,1 mM, hervir la mezcla durante cinco minutos, y eliminación de los residuos insolubles mediante centrifugación.

ADNc de *B. subtilis bkd* (SEC ID N.º: 1) (incluidos los genes *lpdV*, *bkdAA*, *bkdAB*, *ybkdB* que forman parte del operón *bkd* más grande de *B. subtilis*), se amplificó a partir de la muestra de ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores BKD1 (SEC ID N.º: 2) y BKD2 (SEC ID N.º: 3) 5', que incorporan los sitios de restricción flanqueantes de *Apal* y *MluI* en el ADNc de *bkd* durante la reacción de la PCR.

50

La PCR se transformó con 10  $\mu$ l de mezcla maestra *Pfu* Ultra II Hotstart 2X (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), 1  $\mu$ l de una mezcla de los dos cebadores (10  $\mu$ moles de cada), 1  $\mu$ l de ADN genómico de *B. subtilis* y 8  $\mu$ l de agua. La PCR comenzó con una incubación de dos minutos a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 20 segundos a 95 °C para desnaturalización, 20 segundos para hibridación a 62 °C, y 90 segundos a 72 °C para extensión. Las muestras se incubaron a 72 °C durante tres minutos y después se mantuvieron a 4 °C. El producto de la PCR se purificó usando un kit de purificación QIAquick® PCR (Qiagen, Valencia, CA) y se digirió con las enzimas de restricción *Apal* y *MluI*.

55

El vector de expresión bacteriana pZA31-MCS (Expressys, Ruelzheim, Alemania) se digirió con *Apal*, *MluI*, y *HindIII*, y el vector digerido y la inserción se unieron entre sí con Fast-Link (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). La mezcla de unión se usó a continuación para transformar células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los plásmidos recombinantes se aislaron con un kit de minipreparación de plásmidos por centrifugación QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) y se caracterizaron mediante electroforesis en gel de los productos digeridos con restricción con *EcoRV* y con *PstI*. El ADN plásmido se aisló y la secuenciación del ADN confirmó que la inserción *bkd* se había clonado y que la inserción codificaba la secuencia de aminoácidos publicada (Genbank n.º AL009126.3) (SEC ID N.º: 4). El plásmido resultante se designó como pZA31-*Bs bkd*.

Ejemplo 2. Construcción de vectores de expresión de *B. subtilis fabHA*.

10 Este ejemplo demuestra la producción de vectores de expresión recombinantes para la expresión de *B. subtilis fabHA* en, p. ej., *E. coli*.

Para diseñar mediante ingeniería genética *E. coli* para conseguir una incorporación más eficaz de 2-metilbutiril-CoA como un cebador en la síntesis de ácido graso, *E. coli* se transformó con un vector que contiene *B. subtilis fabHA*, que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa que actúa eficazmente sobre 2-metilbutiril-CoA. *B. subtilis* codifica dos genes *fabH* cuyos productos catalizan esta reacción. Cada gen *fabH* se clonó por separado.

15 Se preparó ADN genómico a partir de *B. subtilis* 168 (*Bacillus* Genetic Stock Center, Columbus, OH) por repicado de una colonia aislada de una placa de agar Luria, suspendiendo de la colonia en 50 µl de agua Milli-Q estéril (Millipore, Bedford, Ma), hirviendo la mezcla a 100 °C durante cinco minutos, y eliminando de los residuos insolubles mediante centrifugación.

20 Para generar un plásmido de expresión que careciera de una etiqueta polihistidina, el ADNc de *B. subtilis fabHA* se amplificó a partir de la muestra de ADN genómico mediante PCR usando los cebadores *Bs\_939\_fabHA\_nco\_U38* (SEC ID N.º: 5) y *Bs\_939\_fabHA\_pst\_L30* (SEC ID N.º: 6), que incorporaban sitios de restricción flanqueantes para *NcoI* y *PstI* en el ADNc amplificado. Debido al uso de un sitio *NcoI* en esta construcción de clonación, se añadieron tres pares de bases adicionales al *fabHA* de forma que se predeciría la aparición de una alanina extra en la proteína FabHA.

25 Para generar un plásmido de expresión donde *fabHA* está fusionado con una etiqueta de polihistidina, el ADNc de *B. subtilis fabHA* SEC ID N.º: 7) se amplificó a partir de la muestra de ADN genómico mediante PCR usando los cebadores *Bs\_939\_fabHA\_xho\_U38* (SEC ID N.º: 8) y *Bs\_939\_fabHA\_pst\_L30* (SEC ID N.º: 9), que incorporaban sitios de restricción flanqueantes para *XhoI* y *PstI* en el ADNc amplificado.

30 Se ejecutó la PCR en las muestras que tenían 1 µl de ADN genómico de *B. subtilis* 168, 1,5 µl de una disolución madre 10 µM de cada cebador, 5 µl de mezcla de reacción 10X *Pfx* (Invitrogen Carlsbad, CA), 0,5 µl de ADN polimerasa *Pfx* (1,25 unidades), y 41 µl de agua. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: las muestras se incubaron inicialmente a 95 °C durante un minuto, seguido por 30 ciclos a 95 °C durante 30 segundos (preparación de la hebra), 58 °C durante 30 segundos (hibridación del cebador), y 68 °C para extensión del cebador durante 1,5 minutos. Tras estos ciclos, se realizó una incubación de diez minutos a 68 °C, y a continuación las muestras se guardaron a 4 °C.

40 Los productos de la PCR se purificaron mediante un kit de purificación QIAquick® PCR (Qiagen), se digirieron por duplicado en enzimas de restricción *XhoI/PstI* o *NcoI/PstI*, y se unieron (Fast-Link Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) a pBAD/His A digerido mediante *XhoI/PstI* o *NcoI/PstI* (Invitrogen, Carlsbad, CA). La mezcla de unión se usó a continuación para transformar células de *E. coli* DH5α™ (Invitrogen Carlsbad, CA). Se cribaron las colonias aisladas mediante la PCR usando como inóculo un fragmento en una punta de pipeta estéril introducida en un tubo de reacción que solo contenía agua, seguido por adición del resto del cóctel de la reacción de la PCR (AccuPrime™ SuperMixII, Invitrogen Carlsbad, CA) y cebadores como se ha descrito anteriormente.

45 Los plásmidos recombinantes se aislaron y se purificaron con el QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) y se caracterizaron mediante digestión con enzimas de restricción (*XhoI* + *PstI*, *NcoI* + *PstI*, *DraI*, *MfeI*, y *HaeIII* de Invitrogen o New England Biolabs, Beverly, MA). Posteriormente, los plásmidos se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* BW25113 (*E. coli* Genetics Stock Center, New Haven, CT) que se ha convertido en competente utilizando el método del cloruro de calcio. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar Luria que contiene 100 µg/ml de ampicilina. El ADN plásmido se aisló y se purificó usando el kit QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (Qiagen). La secuenciación del ADN confirmó que las inserciones de *fabHA* se habían clonado y que las inserciones codificaron la secuencia de aminoácidos publicada (SEC ID N.º: 10). El plásmido resultante que carecía de la etiqueta de polihistidina se denominó *Bs fabHA*-His y el plásmido que incorporaba la etiqueta de polihistidina se denominó pBAD-*Bs fabHA*+His.

Ejemplo 3. Construcción de vectores de expresión de *B. subtilis fabHB*.

55 Este ejemplo demuestra la producción de vectores de expresión recombinantes para la expresión de *B. subtilis fabHB* en, p. ej., *E. coli*.

Se preparó ADN genómico a partir de *B. subtilis* 168 (*Bacillus* Genetic Stock Center, Columbus, OH) por repicado de una colonia aislada de una placa de agar Luria, suspensión de la colonia en 50 µl de agua Milli-Q estéril (Millipore, Bedford, Ma), hirviendo la mezcla a 100 °C durante cinco minutos, y eliminando los residuos insolubles mediante centrifugación.

5 Para generar un plásmido de expresión que careciera de una etiqueta polihistidina, el ADNc de *B. subtilis fabHB* se amplificó a partir de la muestra de ADN genómico mediante PCR usando los cebadores RC\_Bs\_978\_fabHB\_nco\_U36 (SEC ID N.º: 11) y RC\_Bs\_978\_fabHB\_pst\_L32 (SEC ID N.º: 12), que incorporaban sitios de restricción flanqueantes para *NcoI* y *PstI* en el ADNc amplificado. Debido al uso de un sitio *NcoI* en esta clonación, se realizó un cambio previsto de serina a alanina en la proteína FabHB.

10 Para generar un plásmido de expresión donde *fabHB* se fusionaría con una etiqueta de polihistidina, el ADNc de *B. subtilis fabHB* SEC ID N.º: 13) se amplificó a partir de la muestra de ADN genómico mediante PCR usando los cebadores RC\_Bs\_978\_fabHB\_xho\_U41 (SEC ID N.º: 14) y RC\_Bs\_978\_fabHB\_pst\_L35 (SEC ID N.º: 15), que incorporaban sitios de restricción flanqueantes para *XhoI* y *PstI* en el ADNc amplificado.

15 Se ejecutó la PCR en las muestras que tenían 1 µl de ADN genómico de *B. subtilis* 168, 1,5 µl de una disolución madre 10 µM de cada cebador, 5 µl de mezcla de reacción 10X*Pfx* (Invitrogen Carlsbad, CA), 0,5 µl de ADN polimerasa *Pfx* (1,25 unidades), y 41 µl de agua. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: las muestras se incubaron inicialmente a 95 °C durante un minuto, seguido por 30 ciclos a 95 °C durante 30 segundos (preparación de la hebra), 58 °C durante 30 segundos (hibridación del cebador), y 68 °C para extensión del cebador durante 1,5 minutos. Tras estos ciclos, se realizó una incubación de diez minutos a 68 °C, y a continuación las muestras se guardaron a 4 °C.

20 Los productos de la PCR se purificaron mediante un kit de purificación QIAquick® PCR (Qiagen), se digirieron por duplicado en enzimas de restricción *XhoI/PstI* o *NcoI/PstI*, y se unieron (Fast-Link Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) a pBAD/His A digerido mediante *XhoI/PstI* o *NcoI/PstI* (Invitrogen, Carlsbad, CA). La mezcla de unión se usó a continuación para transformar células de *E. coli* DH5α™ (Invitrogen Carlsbad, CA). Se cribaron las colonias aisladas mediante la PCR usando como inóculo un fragmento en una punta de pipeta estéril introducida en un tubo de reacción que solo contenía agua, seguido por adición del resto del cóctel de la reacción de la PCR (AccuPrime™ SuperMixII, Invitrogen Carlsbad, CA) y cebadores como se ha descrito anteriormente.

25 Los plásmidos recombinantes se aislaron y se purificaron con el QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) y se caracterizaron mediante digestión con enzimas de restricción (*XhoI + PstI*, *NcoI + PstI*, *DraI*, *MfeI*, y *HaeIII* de Invitrogen o New England Biolabs, Beverly, MA). Posteriormente, los plásmidos se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* BW25113 (*E. coli* Genetics Stock Center, New Haven, CT) que se ha convertido en competente utilizando el método del cloruro de calcio. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar Luria que contiene 100 µg/ml de ampicilina. El ADN plásmido se aisló y se purificó usando el kit QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (Qiagen). La secuenciación del ADN confirmó que las inserciones de *fabHB* se habían clonado y que las inserciones codificaron la secuencia de aminoácidos de FabHB (SEC ID N.º: 16). El plásmido resultante que carecía de la etiqueta de polihistidina se denominó *Bs fabHB*-His y el plásmido que incorporaba la etiqueta de polihistidina se denominó pBAD-*Bs fabHB*+His.

#### Ejemplo 4. Transformación simultánea de *E. coli* con los genes *B. subtilis fabHA*, *fabHB* y *bkd*.

Este ejemplo demuestra la transformación simultánea de *E. coli* con los genes de *B. subtilis fabHA*, *fabHB* y *bkd*.

40 Para producir ácidos grasos anteiso en *E. coli*, se utilizaron las combinaciones de cada construcción plásmida *B. subtilis fabH* (Ejemplos 2 y 3), con y sin la construcción plásmida *B. subtilis bkd* (Ejemplo 1), para transformar tanto el precursor BW25113 como el BW25113 desactivado genéticamente en 730 cepas  $\Delta$ *fadD* (*E. coli* Genetic Stock Center, New Haven, CT). Las 730 cepas  $\Delta$ *fadD* tienen un gen de la acil-CoA sintetasa eliminado. Acil-CoA sintetasa es una enzima de la ruta de degradación de ácidos grasos, y la delección del gen de la acil-CoA sintetasa aumenta el contenido en ácido graso de la célula huésped por atenuación de la ruta natural de degradación de ácido graso de la célula.

45 Las dos cepas de *E. coli* se prepararon químicamente competentes para su transformación mediante ADN plásmido mediante el método del cloruro de calcio. 50 ml de cultivos de *E. coli* en crecimiento activo se hicieron crecer hasta una densidad óptica (a 600 nm) de ~0,4. Los cultivos se enfriaron rápidamente sobre hielo, y las bacterias se recuperaron por centrifugación a 2700xg durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y los aglomerados se suspendieron suavemente en 30 ml de una disolución agua hielo de MgCl<sub>2</sub> 80 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Las células se recuperaron de nuevo por centrifugación a 2700xg durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y los aglomerados se resuspendieron suavemente en 2 ml de una disolución agua hielo de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M.

Las células competentes se usaron directamente para las siguientes transformaciones simultáneas:

55 pBAD-*Bs fabHA* y pZA31-*Bs bkd*

pBAD-*Bs fabHA*-His y pZA31-*Bs bkd*



pBAD-*Bs fabHB* y pZA31-*Bs bkd*

pBAD-*Bs fabHB*-His y pZA31-*Bs bkd*

5 Las células se transformaron en tubos de centrifuga de fondo redondo de 14 ml preenfriados. Aproximadamente 25 ng de cada plásmido se incubaron en hielo con 100 µl de células competentes durante 30 minutos. Las células se sometieron a choque térmico a 42 °C durante 90 segundos e inmediatamente se colocaron sobre hielo durante 2 minutos. Se añadieron 500 µl de medio SOS (Invitrogen, Carlsbad, CA) precalentado, y se dejó que las células se recuperaran a 37 °C con agitación a 225 rpm. 50 µl de la mezcla de células transformadas se diseminaron sobre placas de agar LB selectivo con 100 µg/ml de ampicilina para seleccionar las células que tenían los plásmidos pBAD-*Bs fabH*. 50 µl de la mezcla de células transformadas se diseminaron sobre placas de agar LB selectivo con 34 µg/ml de ampicilina para seleccionar las células que tenían los plásmidos pZA31-*Bs bkd*. 150 µl de la mezcla de células transformadas se diseminaron sobre placas de agar LB selectivo con 100 µg/ml ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol para seleccionar las células que tenían ambos plásmidos pBAD-*Bs fabH* y pZA31-*Bs bkd*.

15 Las colonias individuales se repicaron de cada placa y se cubrieron las tres variedades de placas de agar LB para confirmar el fenotipo de resistencia al antibiótico. Cada cepa se cubrió hasta una densidad de una sola colonia, y una colonia individual se seleccionó para su amplificación para aislamiento del ADN plásmido con los kits QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA). El análisis de la digestión por la endonucleasa de restricción del ADN plásmido aislado con *HaeIII* verificó la combinación de ADN plásmido de cada cepa.

20 Ejemplo 5. Construcción de un vector de expresión para la expresión de ácido graso de cadena media ramificada tioesterasa en glándula uropigial de Mallard.

Este ejemplo demuestra la construcción de un vector de expresión para la expresión de ácido graso de cadena media ramificada tioesterasa en glándula uropigial de Mallard.

25 La secuencia codificante de la tioesterasa (AAA49222.1) se optimizó según el codón para la expresión en *B. subtilis*. La alineación del marco de lectura abierto (ORF) optimizado (SEC ID N.º: 17) con la secuencia original (SEC ID N.º: 18) se muestra en la Figura 13. El ORF optimizado se sintetizó (GenScript) y se insertó entre los sitios de expresión *NcoI* y *BamHI* del vector de expresión pTrcHisA (Invitrogen).

30 Ejemplo 6. Construcción de un vector de expresión para la expresión de ácido graso de cadena media ramificada tioesterasa en glándula mamaria de rata.

Este ejemplo demuestra la construcción de un vector de expresión para la expresión de ácido graso de cadena media ramificada tioesterasa en glándula mamaria de rata.

La secuencia codificante (AAA41578.1) se optimizó según el codón para la expresión en *B. subtilis*. La alineación del ORF optimizado (SEC ID N.º: 19) con la secuencia original (SEC ID N.º: 20) se muestra en la Figura 15. El ORF optimizado se sintetizó (GenScript) y se insertó entre los sitios de expresión *NcoI* y *BamHI* del vector de expresión pTrcHisA (Invitrogen).

35 Ejemplo 7. Extracción de lípidos del medio de cultivo

Este ejemplo demuestra la extracción de lípidos del medio de cultivo.

40 Los lípidos liberados de las células se extrajeron de la siguiente forma: Células *E. coli* se hicieron crecer en caldo Luria, Miller (BD, Sparks, MD) hasta una densidad óptica (600 nm) de al menos 2 unidades de absorbancia. Tras centrifugar para aglomerar las células, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, y se añadió ácido clorhídrico hasta un pH final comprendido entre 1 y 2. De forma alternativa, para concentrar el sobrenadante, 25-50 ml se pueden liofilizar (VirTis, Gardiner, NY) y suspender en 1 ml de agua. Tubos completamente de vidrio Pyrex nuevos o lavados con disolvente (Corning, Lowell, MA) se utilizaron en todas las etapas posteriores. Tres ml de cloroformo:metanol 1:2 (v/v) se añadieron a cada 1 ml de muestra de sobrenadante. En el tubo que contiene el sobrenadante se introdujo 1 ml de agua estéril Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) seguido por 1 ml de cloroformo. Tras centrifugar los tubos un poco (1000 rpm) durante cinco minutos a temperatura ambiente, la fase acuosa superior se retiró, y la fase orgánica inferior se transfirió a un vial V-Vial® de 2 ml limpio, pesado previamente, y etiquetado (15 - 415, diam. × H 17 mm × 61 mm; Corning). Las muestras se secaron con nitrógeno o al aire.

Ejemplo 8. Hidrólisis de fosfolípidos, extracción de ácidos grasos de las células, y esterificación de ácidos grasos.

50 Este ejemplo describe la hidrólisis de fosfolípidos, extracción de ácidos grasos de las células, y esterificación de ácidos grasos.

Los ácidos grasos se extrajeron de las células de la siguiente forma: Células *E. coli* se hicieron crecer en caldo Luria, Miller hasta una densidad óptica (600 nm) de al menos 2 unidades de absorbancia. Tras la centrifugación (3700 rpm durante 10 minutos) para aglomerar las células, el sobrenadante se descartó. Dos ml de 0,1 M NaCl + 50 mM Tris-HCl (pH entre 7,5-8,0) se añadieron al aglomerado, el tubo se vortizó, se centrifugó (3700 rpm durante 10 minutos) para

aglomerar las células, y el sobrenadante se descartó. Se añadió agua estéril Milli-Q (2 ml) al tubo que contenía el aglomerado de células, se vortizó completamente, y el contenido del tubo se transfirió a un vial limpio, pesado previamente y etiquetado Corning V-Vial® con capacidad de tapón sólido (2,0 ml, tamaño de la rosca, 415, diam. × H: 17 mm × 61 mm). Se colocó papel de aluminio sobre los viales que contenían los 2 ml de aglomerado, y la muestra se congeló a -80 °C durante 30 minutos y se introdujo en el liofilizador Virtis Freezemobile (VirTis, Gardiner, NY) durante la noche (a 27 °C).

Se registraron los pesos secos de las muestras liofilizadas, se añadieron cloroformo (0,75 ml) y ácido sulfúrico al 15% (en metanol) y los tubos se introdujeron en un bloque calefactor a 100 °C (en una campana protectora). Después de cuatro horas, la mezcla de reacción se transfirió con una pipeta Pasteur de vidrio a un tubo Pyrex de 13 x 100 mm (Corning). Se añadieron cloroformo (1 ml) y cloruro sódico 1 M (1 ml) a cada tubo, y se mezclaron manualmente antes de una corta centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. Con una pipeta Pasteur de vidrio, se descartó la capa acuosa superior y se añadió al tubo una cantidad saturada de sulfato de sodio anhidro (~50 mg). El resto del volumen (~ 1 ml) se retiró cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se transfirió a un tubo GC de vidrio pesado previamente. El tubo se puede secar con nitrógeno o durante la noche en una campana protectora. Se añadió al tubo seco 1 g (~700 µl) de cloroformo, junto con 0,1 g (~70 µl) de una solución de benzoato de metilo 0,1 g/l.

Ejemplo 9. Análisis de los ésteres de metilo de ácido graso.

Este ejemplo demuestra los análisis mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas de los ésteres de metilo de ácido graso.

Los ésteres de metilo de ácido graso se analizaron mediante cromatografía de gases, usando hidrógeno como gas portador a un caudal inicial de 1 cm<sup>3</sup>/s. La temperatura del inyector se ajustó a 275 °C y el detector FID a 340 °C. La temperatura del horno se mantuvo a 70 °C durante 1 minuto después de inyectar 1 µl (división 50:1) con una rampa de temperatura de 10 °C/min o 3 °C/min hasta 325 °C. La columna de siloxano utilizada en el HP GC 6890 era una J&W Scientific DB-1 (n.º de pieza 122-1131), 60 m x 0,25 mm DI x 0,1 µm de espesor de película.

Los ésteres de metilo de ácido graso también se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas, usando helio como gas portador a un caudal inicial de 0,9 ml/min (55 kPa (7,98 psi), 36 cm/s). La temperatura del inyector se ajustó a 250 °C. La temperatura del horno se mantuvo a 70 °C durante un minuto después de inyectar 1 µl (división 20:1) con una rampa de temperatura de 10 °C/min hasta 325 °C. El tipo de columna usado en el instrumento HP GC 6890 fue una HP-5 Crosslinked 5% PhMe (silicona; HP n.º de pieza 19091J-433) con un espesor de película de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

Ejemplo 10. Producción de ácidos grasos anteiso e iso mediante BW25113 que contiene pBAD-Bs *fabHA*-His y pZA31-Bs *bkd*.

Este ejemplo demuestra la producción de ácidos grasos anteiso e iso mediante BW25113 que contiene pBAD-Bs *fabHA*-His y pZA31-Bs *bkd*.

Las células (50 ml) se cultivaron en caldo Luria (BD, Sparks, MD). Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (600 nm) de 0,4-0,6, se añadió arabinosa (0,2%) para inducir la expresión de *fabHA*. El lípido se recogió del aglomerado celular (Ejemplo 8) y se examinó mediante cromatografía de gases (Ejemplo 7), lo que reveló picos que se correspondían con la movilidad de los patrones de C15 ácido graso anteiso C15. La identificación de estos picos se confirmó mediante cromatografía de gases seguida por espectrometría de masas.

Este ejemplo ilustra un método para producir ácidos grasos anteiso e iso en un microbio que no produce de forma natural ácidos grasos anteiso (*E. coli*) por expresión en el microbio de polinucleótidos heterólogos que codifican una 3-cetoacil-ACP sintetasa (*fabHA* de *B. subtilis*) y una α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (*bkd* de *B. subtilis*).

Ejemplo 11. Aumento de la producción de ácido graso anteiso o iso mediante el aumento de los correspondientes precursores isoleucina, leucina o valina.

Este ejemplo demuestra un método de aumento de la producción de ácido graso anteiso o iso mediante el aumento de los precursores isoleucina, leucina o valina.

Se cultivó BW25113 que tenía pBAD-Bs *fabHA*-His y pZA31-Bs *bkd* y su perfil de ácido graso se caracterizó como se describe en el Ejemplo 10. Para demostrar la influencia de la variable isoleucina, se preparó un cultivo paralelo en presencia de un gramo por litro de isoleucina.

Las muestras se separaron mediante cromatografía de gases. Las áreas de pico se calcularon con un algoritmo del programa informático ChemStation® Rev A.06.06 [509]. Estos tamaños de pico se sumaron para todos los ácidos grasos anteiso y, por separado, para todos los ácidos grasos iso. La presencia de 1 gramo por litro de isoleucina se

asoció con un aumento en los ácidos grasos anteiso y una disminución en los ácidos grasos iso, según muestra la Figura 16.

5 Los resultados de este Ejemplo muestran que aumentar el flujo de carbono hacia la ruta de la isoleucina de la síntesis de ácido graso ramificado aumenta la cantidad de ácido graso ramificado anteiso producido en la célula huésped.

Ejemplo 12. Análisis de ácidos grasos.

Este ejemplo describe un método para analizar ácidos grasos, tal como los ácidos grasos producidos en células bacterianas mediante cromatografía de gases.

10 Las muestras para análisis se prepararon de la siguiente forma. Los cultivos bacterianos (aproximadamente 1,5 ml) se congelaron en viales de vidrio de 2,0 ml y se guardaron a -15 °C hasta estar listos para su procesamiento. Las muestras se enfriaron en hielo seco durante 30 minutos y a continuación se liofilizaron durante la noche (~16 horas) hasta sequedad. Se añadió a cada vial una alícuota de 10 µl de patrón interno (trinonadecanoato de glicerol (n.º de catálogo Sigma T4632-1G)), seguido por adición de 400 µl de NaOH 0,5 N (en metanol). El vial se tapó y se vortizó durante 10 segundos. A continuación, las muestras se incubaron a 65 °C durante 30-50 minutos, se retiraron de la incubadora, y se añadieron 500 µl de reactivo de trifluoruro de boro (número de catálogo Aldrich B1252). Las muestras se vortizaron durante 10 segundos. A continuación, las muestras se incubaron a 65 °C durante 10-15 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente (aproximadamente 20 minutos). Se añadió hexano (350 µl), y las muestras se vortizaron durante 10 segundos. Si las fases no se separan, se añadieron 50-100 µl de una solución salina saturada (5 g NaCl en 5 ml de agua), y la muestra se volvió a vortizar durante 10 segundos. Al menos 100 µl de la capa superior de hexano se introdujo en un vial de cromatografía de gases (CG), que se cerró y guardó a 4 °C o -20 °C hasta análisis.

25 La cromatografía de gases se llevó a cabo como se describe en la Tabla B siguiente. Un patrón de éster metílico de ácido bacteriano (número de catálogo Sigma 47080-U) y un patrón de éster metílico de ácido graso (número de catálogo Sigma 47885-U) se utilizaron para identificar picos en las muestras. Se utilizó una muestra de comprobación con tripalmitato de glicerilo I (número de catálogo Sigma T5888-1G) para confirmar la esterificación de las muestras. Se utilizó un patrón de blanco (solamente el patrón interno) para evaluar el ruido de fondo.

Tabla B

Cromatógrafo de gases	HP 5890 GC Series II
Detector	FID 360 °C 40 ml/min Hidrógeno, 400 ml/min Aire
Gas portador	Helio
Programa cuantitativo	GC Chemstation A.09.03. (Agilent)
Columna	VF-5 ms 15 M x 0,150 mm x 0,15 mm número de catálogo Varian CP9035
Revestimiento de inyección	Gooseneck (con envoltura de lana de vidrio)
Inyector	HP 7673
Jeringa de inyección	10 ml
Modo de inyección	División 25:1
Volumen de inyección	4 ml (velocidad del émbolo = rápida; 5 bombeos de la muestra)
Lavados con disolvente antes de la inyección	2 muestras
Lavados con disolvente después de la inyección	3 tanto con acetona como con hexano
Temperatura del inyector	325 °C
Tiempo total del programa	16 minutos

Programa térmico	Temp. inicial (°C)	Tiempo inicial (min)	Velocidad del suministro (°C/min)	Temp final (°C)	Tiempo final (min)
	90	0,75	20,0	325	1,0
			25,0	350	2,5

**Ejemplo 13.** Aumentar la producción de ácido graso anteiso por aumento del flujo de carbono hacia la ruta dependiente de treonina.

5 Existen dos rutas principales responsables de la producción de 2-oxobutanoato (también conocido como  $\alpha$ -cetobutirato), que es un producto intermedio de la síntesis de 2-metilbutiril-CoA, el cebador de la síntesis de ácido graso anteiso. Una ruta genera 2-oxobutanoato a partir de treonina (Figura 2), mientras que la segunda ruta utiliza citramalato como precursor (Figura 17). Este ejemplo demuestra que aumentar el flujo de carbono hacia una ruta que usa treonina aumenta la producción de ácido graso anteiso en las células huésped.

10 Se modificó una cepa de *E. coli* para aumentar la producción de treonina desaminasa y, en algunos casos, de acetohidroxiácido sintetasa (AHAS). Treonina desaminasa y AHAS son las dos primeras actividades enzimáticas de la ruta dependiente de treonina en la producción de ácido graso anteiso. Treonina desaminasa estimula la conversión de treonina en 2-oxobutanoato, que se convierte en 2-aceto-2-hidroxi-butirato vía AHAS. Se construyó un vector de expresión que comprendía una secuencia codificante de treonina desaminasa en *E. coli* *tdcB*, unida operativamente a un promotor *trc*. También se preparó un vector de expresión que comprende una fusión génica  
15 donde una secuencia codificante de AHAS III, *ilvIH*, está fusionada a la secuencia codificante *tdcB*.

20 Para aislar *tdcB*, se preparó ADN genómico a partir de *E. coli* BW25113 (*E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT) repicando una colonia aislada de una placa de agar Luria, suspensión de la colonia en 100  $\mu$ l de Tris (1 mM; pH 8,0), EDTA 0,1 mM, hervido de la muestra durante cinco minutos, y eliminación de los residuos insolubles por centrifugación *tdcB* se amplificó a partir de la muestra de ADN genómico mediante PCR usando los cebadores GTGCCATGGCTCATA TTACATACGATCTGCCGGTTGC (SEC ID N.º: 2) y GATCGAATTCATCCTTAGGCGTCAACGAAACCGGTGATTG (SEC ID N.º: 3). Se llevó a cabo la PCR sobre muestras que tenían 1  $\mu$ l de ADN genómico de *E. coli* BW25113, 1  $\mu$ l de disolución madre de 10  $\mu$ M de cada cebador, 25  $\mu$ l de mezcla maestra *Pfu* Ultra II Hotstart 2X (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), y 22  $\mu$ l de agua. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: las muestras se incubaron inicialmente a 95 °C durante dos minutos, seguido por tres ciclos a 95 °C durante 20 segundos (separación de la hebra), 56 °C durante 20 segundos (hibridación del cebador), y 72 °C para extensión del cebador durante 30 segundos. Además, se realizaron 27 ciclos a 95 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 20 segundos, y 72 °C con extensión del cebador durante 30 segundos. A continuación se realizó una incubación de tres minutos a 72 °C, y a continuación las muestras se guardaron a 4 °C.

30 Los productos de la PCR se purificaron mediante un kit de purificación QIAquick® PCR (Qiagen), se digirieron por duplicado en enzimas de restricción *Hind*III y *Nco*I, y se ligaron (Fast-Link Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) con el vector pTrcHisA digerido con *Hind*III/*Nco*I (Invitrogen, Carlsbad, CA). La mezcla de unión se usó a para transformar células de *E. coli* OneShot Top10™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los transformantes se seleccionaron en placas de agar Luria que contiene 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. El plásmido recombinante se aisló con un kit de minipreparación de plásmidos por centrifugación Qiagen HiSpeed Plasmid Midi Kit y se caracterizaron mediante electroforesis en gel de los productos digeridos con restricción con *Hind*III y *Nco*I. La secuenciación del ADN confirmó que la inserción *tdcB*se había clonado y que la inserción codificaba la secuencia de aminoácidos publicada (Genbank n.º U00096.2) (SEC ID N.º: 4 y 33). El plásmido resultante se designó como pTrcHisA *Ec tdcB*.

40 Se construyó un gen de fusión de donde los genes AHAS se colocaron detrás de *Ec tdcB* de forma que tanto TdcB como el AHAS recombinante se producirían a partir del mismo mensaje. En algunos casos, AHAS se codifica mediante dos subunidades Por ejemplo, *E. coli* AHAS III se codifica mediante dos genes *ilvI* (SEC ID N.º: 34) y *ilvH* (SEC ID N.º: 35). Para fusionar los genes AHAS III genes, *ilvIH* (SEC ID N.º: 36), a *tdcB*, *ilvIH* se amplificó a partir de la muestra de ADN genómico de *E. coli* BW25113 usando el conjunto de secuencias de cebadores definidas en SEC ID N.º: 37 y SEC ID N.º: 38, que incorporaban sitios de restricción flanqueantes para *Eco*RI en *ilvIH* durante la reacción de la PCR.  
45

50 La PCR se realizó con 25  $\mu$ l de mezcla maestra *Pfu* Ultra II Hotstart 2X (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), 1  $\mu$ l de una mezcla de los dos cebadores (10  $\mu$ moles de cada), 1  $\mu$ l de ADN genómico de *E. coli* BW25113 y 23  $\mu$ l de agua. La PCR comenzó con una incubación de dos minutos a 95 °C, seguido por dos ciclos de 20 segundos a 95 °C para desnaturalización, 20 segundos para hibridación a 55 °C, y 90 segundos a 72 °C para extensión. El producto se amplificó adicionalmente mediante 28 ciclos de 20 segundos a 95 °C para desnaturalización, 20

segundos para hibridación a 62 °C, y 90 segundos a 72 °C para extensión. Las muestras se incubaron a 72 °C durante tres minutos y después se mantuvieron a 4 °C. El producto de la PCR se purificó usando un kit de purificación QIAquick® PCR (Qiagen, Valencia, CA) y se digirió con la enzimas de restricción *EcoRI*.

5 El vector de expresión bacteriana pTrcHisA *Ec tdcB* (preparado como se ha descrito anteriormente) se digirió con *EcoRI*, y el vector digerido y el inserto se unieron entre sí con Fast-Link (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). La mezcla de unión se usó a continuación para transformar células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los plásmidos recombinantes se aislaron con un kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) y se caracterizaron mediante electroforesis en gel de los productos digeridos con restricción con *XmnI*. La secuenciación del ADN confirmó que la inserción *ilvIH* se había clonado y que la inserción codificaba la secuencia de aminoácidos publicada (*ilvI*, Swiss-Prot n.º P00893.2; *ilvH* Swiss-Prot n.º P00894.3) (SEC ID N.º: 39 y SEC ID N.º: 40, respectivamente). El plásmido resultante se designó como pTrc *Ec tdcB Ec ilvIH*.

15 El flujo de carbono hacia 2-oxobutanoato se incrementó por el uso de un AHAS III que es retroinsensible a la valina. La insensibilidad a valina se consigue, por ejemplo, sustituyendo un ácido aspártico por glicina en el decimocuarto aminoácido (G14D) of *IlvH* (SEC ID N.º: 41; Vyazmensky y col., *Biochemistry*, 35: 10339-46 (1996)). Se preparó un vector de expresión para expresar un gen *E. coli tdcB* seguido por un G14D de *E. coli ilvIH*. El decimocuarto codón de *E. coli ilvH*, GGC (que codifica glicina) se mutó a GAC (que codifica ácido aspártico) mediante mutagénesis dirigida al sitio ("SDM") (GenScript, Piscataway, NJ) usando el plásmido pTrc *Ec tdcB Ec ilvIH* como molde. La región SDM variante generada se volvió a subclonar en el molde pTrc-*Ec tdcB Ec ilvIH* original usando un sitio *AatI* de la subunidad más grande del gen de *E. coli ilvI* y un sitio *XbaI* en el sitio de multiclonación (MCS). La región SDM variante de la secuencia de ADN se proporciona como la SEC ID N.º: 42, y la correspondiente secuencia de ADN original se proporciona como la SEC ID N.º: 43. La secuenciación del ADN confirmó el producto SDM como *ilvIH* (G14D). El marco de lectura abierto (ORF) de G14D de SDM *ilvH* se presenta como la SEC ID N.º: 41. La digestión con restricción del ADN plásmido con *AflIII* confirmó la presencia de un nuevo sitio *AflIII* creado por el SDM. El plásmido resultante se designó como pTrc *Ec tdcB Ec ilvIH* G14D.

25 *E. coli* AHAS II es el producto de dos genes, *ilvG* (SEC ID N.º: 44) e *ilvM* (SEC ID N.º: 45). AHAS II no es funcionalmente activo en cepas K-12 de *E. coli* debido a una mutación en *ilvG*. Para generar AHAS II activo, se sintetizaron *ilvG* y *ilvM* según las secuencias genómicas de BL21 (DE3) (n.º de acceso GenBank CP001509.3 de la base 3840800 a la base 3842706). Se añadió un sitio *NotI* al extremo 5' de *ilvG* y se añadió un sitio *EcoRI* al extremo 3' de *ilvM*. El gen sintetizado (SEC ID N.º: 46) se ligó con pTrcHisA *Ec tdcB* en los sitios *NotI* y *EcoRI* después de *tdcB*. Tanto *tdcB* como *ilvGM* se han diseñado para transcribirse mediante el mismo promotor. La secuenciación del ADN confirmó que la inserción *ilvGM* se había clonado y que la inserción codificaba las secuencias de aminoácidos publicadas (n.º de acceso GenBank CAQ34112 (*ilvG*) y GenBank CAQ34113 (*ilvM*); SEC ID N.º: 47 y SEC ID N.º: 48, respectivamente). El plásmido resultante se designó como pTrc *Ec tdcB Ec ilvGM*.

35 Análogamente a otras enzimas AHAS, AHAS de *B. subtilis* comprende productos derivados de dos genes, *ilvB* (SEC ID N.º: 49) e *ilvH* (SEC ID N.º: 50). Los genes AHAS de *B. subtilis* se sintetizaron (GenScript, Piscataway, NJ) usando las secuencias de la cepa 168. Un sitio interno *EcoRI* está presente en el gen natural pero se elimina del gen sintético para facilitar la subclonación posterior. Se añadió un sitio *NotI* en el extremo 5' de la secuencia de *ilvB* y se añadió un sitio *EcoRI* en el extremo 3' de la secuencia de *ilvH*. Los genes sintetizados (SEC ID N.º: 51) se ligaron con pTrcHisA *Ec tdcB* en los sitios *NotI* y *EcoRI* después de *tdcB*. Tanto *tdcB* como *ilvBH* se han diseñado para transcribirse mediante el mismo promotor. La secuenciación del ADN confirmó que la inserción *ilvBH* se había clonado y que la inserción codificaba las secuencias de aminoácidos publicadas (n.º de acceso GenBank CAA99561 (*ilvB*) y Swiss-Prot n.º P37252.2 (*ilvH*); SEC ID N.º 52 y SEC ID N.º: 53, respectivamente). El plásmido resultante se designó como pTrc *Ec tdcB Bs ilvBH*.

45 Para permitir que *E. coli* se transformara con un número mayor de vectores de expresión una parte del vector *B. subtilis fabHA* marcado con polihistidina (Ejemplo 2; pBAD *Bs fabHA*+His), incluidos los genes de control de la regulación *araC* y el promotor *araBAD* (SEC ID N.º: 54), se clonó en un vector que contiene *B. subtilis bkd* (incluidos los genes *lpdV*, *bkdAA*, *bkdAB*, y *bkdB* del operón más grande *bkd*) (pZA31 *Bs bkd*).

50 El kit de clonación ClonEZ PCR (GenScript, Piscataway, NJ) se utilizó de la siguiente forma: la región diana se amplificó en primer lugar a partir del molde linealizado del plásmido pBAD *Bs fabHA*+His mediante PCR usando (i) cebador 5' (SEC ID N.º: 55) que contiene 15 pares de bases con homología de secuencia en dirección corriente abajo (e incluido) el sitio *MluI* de pZA31 *Bs bkd*, y (ii) un cebador 3' (SEC ID N.º: 56) que contiene 15 pares de bases de homología de secuencia corriente arriba (e incluido) el sitio de *MluI* de pZA31-*Bs bkd*. La PCR se realizó con 25 µl de mezcla maestra *Pfu* Ultra II Hotstart 2X master mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), 1 µl de una mezcla de los dos cebadores (10 µmoles de cada), 1 µl de ADN plásmido *Bs fabHA*+His linealizado (20 ng), y 23 µl de agua. La PCR comenzó con una incubación de dos minutos a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 20 segundos a 95 °C para desnaturalización, 20 segundos para hibridación a 62 °C, y 90 segundos a 72 °C para extensión. Las muestras se incubaron a 72 °C durante tres minutos y después se mantuvieron a 4 °C. El producto de la PCR se purificó usando un kit de purificación QIAquick® PCR (Qiagen, Valencia, CA)

- La reacción ClonEZ se configuró con 6  $\mu$ l (105 ng) de pZA31 *Bs bkd* (digestión por restricción con *Mlu*I), 8  $\mu$ l (211 ng) del inserto amplificado mediante PCR, 2  $\mu$ l de tampón 10X ClonEZ, 2  $\mu$ l de mezcla enzimática 10X ClonEZ y 2  $\mu$ l de agua destilada. La reacción continuó durante 30 minutos a 22 °C. Parte (8  $\mu$ l) de la mezcla de reacción se utilizó para transformar células *E. coli* TOP-10 competentes (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las colonias aisladas se cribaron mediante la PCR. Los plásmidos recombinantes se aislaron con un kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) y se caracterizaron mediante electroforesis en gel de los productos digeridos con restricción con *Hae*II y con *Eco*RV. La secuenciación del ADN confirmó que la inserción *Ec araC Bs fabHA* se había clonado en pZA31 *Bs bkd* y que la secuencia de la inserción se correspondía con la secuencia del molde. El plásmido resultante se designó como pZA31 *Bs bkd fabHA*.
- Se generó una cepa de *E. coli* deficiente en degradación de ácido graso (Voelker y col., *J. Bacteriology*, 176: 7320-7327 (1994)) y que puede regular la transcripción de los genes recombinantes. Se utilizó como material de partida una cepa K-12 de *E. coli* K-12 defectiva en *fadD*, por tanto que carece de la ácido graso acil-CoA sintetasa. La cepa K27 (F-, *tyrT58*(AS), *fadD88*, *mel-1*; CGSC Cepa n.º 5478) se obtuvo del *E. coli* Genetic Stock Center (New Haven, CT). Un casete de regulación genómica de la cepa DH5 $\alpha$ Z1 [*lac*<sup>f</sup>, PN25-*tetR*, Sp<sup>R</sup>, *deoR*, *supE44*,  $\Delta$ (*lacZYA-argFV169*), j80 *lacZ* $\Delta$ M15 (Expressys, Ruelzheim, Alemania)] se transdujo en la cepa huésped. El fago transductor P1<sub>vir</sub> se cargó con ADN DH5 $\alpha$ Z1 de la siguiente forma: Un cultivo en crecimiento logarítmico (5 ml de caldo LB que contiene 0,2% de glucosa y CaCl<sub>2</sub> 5 mM) de cepa donante, DH5 $\alpha$ Z1, se infectó con 100  $\mu$ l de una disolución madre de lisato de fago P1<sub>vir</sub>. El cultivo se incubó durante tres horas más para lisar las células infectadas. Los residuos se aglomeraron, y el sobrenadante se aclaró adicionalmente con una jeringa provista de unidad de filtro de 0,45  $\mu$ m. El lisato reciente se ajustó por pretratamiento de 10  $\mu$ l de diluciones en serie 1:10 de lisato en tampón TM (MgSO<sub>4</sub> 10 mM/ Tris·Cl 10 mM, pH 7,4) en una placa LB de 100 mm LB (con CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM) superpuesto con una capa cultivada de *E. coli* en la parte superior del agar LB (con CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM). El proceso se repitió usando el depósito de fago recientemente creado hasta que el título de fagos superó 10<sup>9</sup> pfu/ml.
- El depósito de fago con el título más alto se utilizó para transducir fragmentos gel genoma de DH5 $\alpha$ Z1 en una cepa receptora K27 de la siguiente forma. Un cultivo nocturno (1,5 ml) de K27 se aglomeró y se resuspendió en 750  $\mu$ l de una solución de sales P1 (CaCl<sub>2</sub> 10 mM /MgSO<sub>4</sub> 5 mM). Una alícuota (100  $\mu$ l) de las células suspendidas se inocularon con cantidades variables de lisato de donante P1<sub>vir</sub> de DH5 $\alpha$ Z1 (1, 10, y 100  $\mu$ l) en tubos de ensayo estériles. Se permitió al fago adsorberse en las células durante 30 minutos a 37 °C. El periodo de absorción finalizó por adición de 1 ml de caldo LB más 200  $\mu$ l de citrato sódico 1M, y los cultivos se incubaron adicionalmente durante 1 hora a 37 °C con aireación. Los cultivos se aglomeraron, las células se suspendieron en 100  $\mu$ l de caldo LB (más citrato sódico 0,2 M), y se diseminaron en placas de agar LB con 50  $\mu$ g/ml de espectinomicina. Las cepas resistentes a espectinomicina se aislaron, y el ADN genómico se cribó mediante PCR para determinar la presencia de *tetR*, *lac*<sup>f</sup> y *fadD88*. Uno de estos transductantes se denominó K27-Z1 y se utilizó en estudios adicionales.
- Para transformar las células K27-Z1, las células competentes se colocaron en hielo en tubos de centrifuga de fondo redondo de 14 ml previamente enfriados. Aproximadamente 30 ng de cada plásmido se incubaron con 50  $\mu$ l de células K27-Z1 químicamente competentes (Cohen y col., *Proceedings National Academy Sciences U.S.A.*, 69: 2110-4 (1972)) durante 30 minutos. Las células se sometieron a choque térmico a 42 °C durante 90 segundos e inmediatamente se colocaron sobre hielo durante dos minutos. Se añadió medio SOS (250  $\mu$ l) (Invitrogen, Carlsbad, CA) precalentado, y se dejó que las células se recuperaran a 37 °C con agitación a 125 rpm durante una hora. La mezcla de células transformadas (20  $\mu$ l) se diseminó sobre placas de agar LB selectivo con ampicilina 100  $\mu$ g/ml para seleccionar las células que tenían los plásmidos basados en pTrc-HisA. La mezcla de células transformadas (50  $\mu$ l) se diseminó sobre placas de agar LB selectivo con 34  $\mu$ g/ml de cloranfenicol para seleccionar las células que tenían el plásmido pZA31 *Bs bkd Bs fabH*. La mezcla de células transformadas (150  $\mu$ l) se diseminó sobre placas de agar LB con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 34  $\mu$ g/ml de cloranfenicol para seleccionar las células que contenían tanto el plásmido basado en pTrc-HisA como el plásmido pZA31 *Bs bkd Bs fabH*. En algunos casos, la creación de transformantes triples requirió dos transformaciones: se creó originalmente un transformante doble, se volvió competente, y se transformó mediante un tercer plásmido.
- Se repicaron colonias individuales de cada cepa y se hicieron crecer hasta la densidad de una sola colonia sobre placas de selección con antibiótico adecuadas. Una colonia individual se seleccionó para su amplificación para aislamiento del ADN plásmido con los kits QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA). El análisis de la digestión por la endonucleasa de restricción del ADN plásmido aislado con *Afl*II verificó la combinación de ADN plásmido de cada cepa.
- Los vectores de expresión resultantes se introdujeron en células huésped de *E. coli* que comprendían *B. subtilis bkd* y *fabH*, que se cultivaron en medio de glicerol M9 que comprende IPTG, tetraciclina, y arabinosa para inducir la expresión del gen recombinante. Una muestra de K27-Z1 que comprende pZA31 *Bs bkd fabHA* y pTrc *Ec tdcB Ec ilvGM* se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, el 14 de diciembre de 2010, según lo estipulado en el Tratado de Budapest para el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines del procedimiento de patentes (“Tratado de Budapest”), y se le asignó un número de acceso [XXX] en [FECHA]. También se ensayaron otros genes AHAS para determinar su mejora en la producción de ácido graso anteiso. Los ácidos grasos producidos por las células bacterianas se aislaron y se separaron. La cantidad de ácido graso anteiso producida por la bacteria modificada se comparó con la cantidad de ácido graso producido por

una cepa progenitora de *E. coli* y *E. coli* que producía Bkd y FabH de *B. subtilis*. La cantidad de cada tipo de ácido graso se dividió por la cantidad total de ácidos grasos producida. Inesperadamente, las células que expresaban *tdcB* presentaron una disminución en la producción de ácido graso anteiso. La expresión simultánea de los genes *Ec tdcB* (que codifican treonina desaminasa) y *Ec ilvIH* (que codifican AHAS III) aumentaron la producción de ácido graso anteiso C15 en la cepa de *E. coli* que tenía también *Bs fabH* y *Bs bkd*, comparada con la cepa de *E. coli* que tenía *Bs fabH Bs bkd* y que no se modificó con las enzimas de la ruta dependiente de la treonina. Se observó un aumento en la producción de ácido graso anteiso para G14D de insensible a valina *ilvIH* (Figura 27), *Ec ilvIH* (Figuras 28 y 29), el gen exógeno de *B. subtilis Bs ilvBH* (Figura 28), y *E. coli ilvGM* (Figura 30).

Los resultados de este Ejemplo demuestran que la modificaciones genéticas diseñadas para aumentar el flujo de carbono a través de la ruta dependiente de treonina mejora la producción de ácido graso anteiso.

**Ejemplo 14.** Aumentar la producción de ácido graso anteiso por aumento del flujo de carbono hacia la ruta dependiente de citramalato.

Este ejemplo describe la generación de un microbio recombinante que produce citramalato sintetasa exógena para aumentar adicionalmente la producción de ácido graso anteiso.

La secuencia codificante de la citramalato sintetasa de *Methanococcus jannaschii* natural también se mutó mediante evolución dirigida para mejorar la actividad enzimática y la contrarresistencia para crear *cimA3.7* (SEC ID N.º: 58) (Atsumi y col., *Applied and Environmental Microbiology* 74: 7802-8 (2008)). No se sabe si *E. coli* tiene actividad citramalato sintetasa, y se diseñó una cepa mediante ingeniería genética para producir citramalato sintetasa exógena a la vez que se producían en exceso varias enzimas naturales de *E. coli*: *LeuB*, *LeuC*, *LeuD*, y cada una de las varias AHAS. Citramalato sintetasa, *LeuB*, *LeuC*, *LeuD*, y *IlvIH* (G14D) median las primeras cinco conversiones químicas de la ruta del citramalato para producir ácidos grasos anteiso (Figura 17).

Para generar un gen *CimA3.7* sintético optimizado según el codón para su expresión en *E. coli*, se sintetizó un fragmento de ADN (SEC ID N.º: 57) que contiene un sitio de restricción *BspHI* (bases 1-6), un fragmento *cimA3.7* optimizado según el codón (bases 3-1118), un codón de detención TGA (bases 1119-1121), un fragmento de 52 bases desde el principio del gen de *E. coli leuB* (bases 1121-1173), y una secuencia enlazadora (bases 1174-1209) que contiene los sitios *NotI*, *PacI*, *PmeI*, *XbaI* y *EcoRI* (GenScript, Piscataway, NJ). El codón de detención de *cimA3.7* (TGA) y el codón de detención (ATG) de *leuB* se superponen en una base (A), supuestamente para permitir el acoplamiento traduccional. Este solapamiento imita el acoplamiento natural de *leuA* y *leuB* en *E. coli*. El fragmento sintetizado se digirió con *BspHI* y *EcoRI* y se clonó en pTrcHisA (Invitrogen) en los sitios *NcoI* y *EcoRI*, usando los extremos compatibles generados mediante *BspHI* y *NcoI*. El extremo del fragmento *leuB* (bases 1168-1173) también contiene un sitio *BspEI* (subrayado) para clonación de *leuBCD*. Este vector se denominó pTrcHisA *Mj cimA*.

El gen *leuB* (SEC ID N.º: 59) codifica 3-isopropilmalato deshidrogenasa. Los genes *leuC* (SEC ID N.º: 60) y *leuD* (SEC ID N.º: 61) codifican la subunidad grande y la subunidad pequeña, respectivamente, de la isopropilmalato isomerasa. Para fusionar los tres complejos génicos *leuBCD* (SEC ID N.º: 57) detrás de *Mj cimA*, el ADNc de *E. coli leuBCD* se amplificó a partir de una muestra de ADN genómico de *E. coli* BW25113 usando los cebadores de la PCR (SEC ID N.º: 63 y SEC ID N.º: 64), que incluyeron un sitio de restricción *BspEI* en *leuB* e incorporaron un sitio de restricción *NotI* en dirección 3' desde el codón de detención de *leuD* durante la reacción de la PCR. La PCR se realizó con 50 µl de mezcla maestra *Pfu* Ultra II Hotstart 2X (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), 1 µl de una mezcla de los dos cebadores (10 µmoles de cada), 1 µl de ADN genómico de *E. coli* BW25113 y 48 µl de agua. La PCR comenzó con una incubación de dos minutos a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 20 segundos a 95 °C para desnaturalización, 20 segundos para hibridación a 64 °C, y dos minutos a 72 °C para extensión. La muestra se incubó a 72 °C durante tres minutos y después se mantuvo a 4 °C. El producto de la PCR (inserción *leuBCD*) se purificó usando un kit de purificación QIAquick® PCR (Qiagen, Valencia, CA)

La inserción *leuBCD* y el vector de expresión bacteriana pTrcHisA *Mj cimA* se digirieron con *BspEI*. El vector digerido y la inserción *leuBCD* se volvieron a purificar en columnas de purificación QIAquick® PCR antes de digerirse con restricción con *NotI*. Después de la purificación en columna final, el vector digerido y el inserto se unieron mediante Fast-Link (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). La mezcla de unión se usó a continuación para transformar células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los plásmidos recombinantes se aislaron con un kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) y se caracterizaron mediante electroforesis en gel de los productos digeridos con restricción con *Afi III*. La secuenciación del ADN confirmó que la inserción *leuBCD* se había clonado y que la inserción codificaba las secuencias de aminoácidos publicadas (n.º de acceso GenBank AAC73184 (*Ec leuB*) (SEC ID N.º: 65); n.º de acceso GenBank AAC73183 (*Ec leuC*) (SEC ID N.º: 66); y n.º de acceso GenBank AAC73182 (*Ec leuD*) (SEC ID N.º: 67)). El plásmido resultante se designó como pTrc *Mj cimA Ec leuBCD*.

Los genes AHAS (*ilvIH*, *ilvIH* G14D, *ilvGM*, y *Bs ilvBH*), flanqueados por los sitios, en 5'*NotI* y en 3' por *EcoRI*, (descrito anteriormente), se clonaron en los sitios *NotI* y *EcoRI* del plásmido de expresión pTrc *Mj cimA Ec leuBCD* y se denominaron de la siguiente manera:

*E. coli* AHAS III *ilvIH* (SEC ID N.º: 36) → pTrc *Mj cimA Ec leuBCD Ec ilvIH*

*E. coli* AHAS III *ilvIH* (G14D) (SEC ID N.º: 41) ➔ pTrc *Mj cimA Ec leuBCD Ec ilvIH* (G14D)

*E. coli* BL21(DE3) AHAS II *ilvGM* (SEC ID N.º: 46) ➔ pTrc *Mj cimA Ec leuBCD Ec ilvGM*

*B. subtilis* AHAS *ilvBH* (SEC ID N.º: 51) ➔ pTrc *Mj cimA Ec leuBCD Ec ilvBH*.

5 Una muestra de K27-Z1 que comprende pZA31 *Bs bkd fabHA* y pTrc *Mj cimA Ec leuBCD Ec ilvGM* se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, el 14 de diciembre de 2010, según lo estipulado en el Tratado de Budapest para el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines del procedimiento de patentes (“Tratado de Budapest”), y se le asignó un número de acceso [XXX] en [FECHA]. La expresión de estos polinucleótidos recombinantes en un huésped *E. coli* que produce FabH y Bkd de *B. subtilis* aumenta adicionalmente la producción de ácido graso anteiso, tal como se demuestran por los ácidos grasos anteiso con longitudes de cadena de quince a diecisiete átomos de carbono (Figura 31).

Ejemplo 15: Personalizar la longitud de cadena del ácido graso anteiso con tioesterasa.

15 Este ejemplo ilustra un método para personalizar la longitud de cadena de un ácido graso anteiso usando tioesterasa. El método descrito en la presente memoria es útil para, p. ej., producir una combinación de ácidos grasos con una longitud de cadena predeterminada para aplicaciones comerciales.

Se construyó un vector de expresión (pTrc *Ec tesA*) que comprendía una secuencia de ácido nucleico que codificaba la enzima ‘TesA de *E. coli*, que tiene actividad tioesterasa (Cho y col., *J. Biological Chemistry*, 270: 4216-9 (1995)). Se creó un ADNc truncado de *E. coli tesA* (*tesA*) (SEC ID N.º: 68) mediante amplificación por PCR del gen *E. coli tesA* (n.º de acceso GenBank L06182). Se diseñó un cebador 5' (SEC ID N.º: 69) para hibridarse después del 26º codón de *tesA*, modificando el 27º codón desde alanina a metionina, y creando un sitio de restricción *NcoI*. Se diseñó un cebador 3' (SEC ID N.º: 71) para incorporar un sitio de restricción *BamHI*. La PCR se realizó con 50 µl de mezcla maestra Pfu Ultra II Hotstart 2X (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), 1 µl de una mezcla de los dos cebadores (10 µmoles de cada), 1 µl de ADN genómico de *E. coli* BW25113 y 48 µl de agua. La PCR comenzó con una incubación de dos minutos a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 20 segundos a 95 °C para desnaturalización, 20 segundos para hibridación a 58 °C, y 15 segundos a 72 °C para extensión. La muestra se incubó a 72 °C durante tres minutos y después se mantuvieron a 4 °C. El producto de la PCR (*Ec tesA*) se purificó usando un kit de purificación QIAquick® PCR (Qiagen, Valencia, CA). El vector de expresión bacteriana pTrcHisA y el producto de la PCR *tesA* se digirieron con *NcoI* y *BamHI*. El vector y la inserción digeridos se unieron con Fast-Link (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). La mezcla de unión se usó a continuación para transformar células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los plásmidos recombinantes se aislaron con un kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) y se caracterizaron mediante electroforesis en gel de los productos digeridos con restricción con *Hae*.II. La secuenciación del ADN confirmó que la inserción *tesA* se había clonado y que la inserción codificaba las secuencias de aminoácidos esperadas (SEC ID N.º: 73). El plásmido resultante se designó como pTrc *Ec tesA*.

35 Para limitar la expresión génica, el gen *E. coli tesA* truncado se subclonó en un vector de expresión bacteriana pZS21-MCS (Expressys, Ruelzheim, Alemania) con bajo número de copias. El vector de expresión pTrc *Ec tesA* era un molde para una reacción PCR que usaba un cebador 5' (SEC ID N.º: 74) diseñado para crear un sitio de restricción *XhoI* flanqueante, e incluía el promotor lac pTrcHisA (para sustituir el promotor del vector pZS21-MCS *tet*) y un cebador 3' (SEC ID N.º: 75) que incorpora un sitio de restricción *HindIII*. La PCR se realizó con 50 µl de mezcla maestra Pfu Ultra II Hotstart 2X (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), 1 µl de una mezcla de los dos cebadores (10 µmoles de cada), 1 µl de ADN plásmido pTrc *Ec tesA* (6 ng), y 48 µl de agua. La PCR comenzó con una incubación de dos minutos a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 20 segundos a 95 °C para desnaturalización, 20 segundos para hibridación a 57 °C, y 20 segundos a 72 °C para extensión. La muestra se incubó a 72 °C durante tres minutos y después se mantuvieron a 4 °C. El producto de la PCR se purificó usando un kit de purificación QIAquick® PCR (Qiagen, Valencia, CA). El vector de expresión bacteriana pZS21-MCS y el producto de la PCR *Ec tesA* se digirieron con *XhoI* y *HindIII*. El vector y el inserto digeridos se unieron con Fast-Link (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). La mezcla de unión se usó a continuación para transformar células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los plásmidos recombinantes se aislaron con un kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) y se caracterizaron mediante electroforesis en gel de los productos digeridos con restricción con *Hae*.II. La secuenciación del ADN confirmó que la inserción *tesA* se había clonado y que la inserción codificaba las secuencias de aminoácidos esperadas (SEC ID N.º: 73). El plásmido resultante se designó como pZS22 *Ec tesA*.

55 Los vectores de expresión se introdujeron en células huésped *E. coli*. Las células huésped que producen ‘TesA generaron ácidos grasos anteiso de cadena media (trece carbonos) y menos ácidos grasos con longitud de cadena (quince y diecisiete átomos de carbono) en comparación con las células huésped que no producen ‘TesA (Figura 32). La expresión de *tesA* también condujo a la producción de ácidos grasos anteiso acortados en una cepa BL21 Star (DE3) de *E. coli* (Figura 33). Sorprendentemente, la cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3) que contenía *Ec tesA*- produjo más ácidos grasos anteiso que la cepa derivada de *E. coli* K-12 que contenía *Ec tesA*.



Este ejemplo demuestra que la expresión en exceso de una tioesterasa aumenta la proporción de ácidos grasos anteiso con longitud de cadena media (p. ej., ácidos grasos anteiso de 13 carbonos de longitud) producidos por un microorganismo huésped.

Ejemplo 16. Tiamina aumenta la síntesis de ácido graso anteiso.

- 5 Tiamina (vitamina B1) es un cofactor de dos enzimas (AHAS y Bkd) responsables de la producción de ácidos grasos anteiso. Se añadió tiamina a LB (modificado para tener un contenido salino menor) y se observó un aumento en los ácidos grasos anteiso C15 y C17 (Figura 34).

Ejemplo 17. Síntesis de ácido graso anteiso en *E. coli* que produce FabH de *Listeria*.

- 10 Este ejemplo demuestra la producción de ácido graso anteiso e iso mediante un microbio diseñado mediante ingeniería genética para producir 3-cetoacil-ACP sintetasa exógena.

El gen de la 10403S 3-cetoacil-ACP sintetasa III *L. monocytogenes* (*fabH*) (n.º de acceso GenBank FJ749129.1; SEC ID N.º: 77) se optimizó según el codón para su expresión en *E. coli* y se sintetizó para incluir los sitios de restricción 5'-*Xho*I y 3'-*Pst*I (SEC ID N.º: 78). El ADN resultante, sintetizado y secuenciado, se subclonó en un vector pMA (GENEART Inc., Toronto, ON, Canadá). Para generar un plásmido de expresión donde *Listeria fabH* se fusiona con una etiqueta de polihistidina, el vector pMA que contiene el gen *fabH* de *L. monocytogenes* se digirió con *Xho*I y *Pst*I y se ligó (Fast-Link Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) con pBAD/HisA digerido con *Xho*I/*Pst*I (Invitrogen, Carlsbad, CA). La mezcla de unión se usó a continuación para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> (Invitrogen Carlsbad, CA). Se cribaron las colonias aisladas mediante la PCR usando como inóculo un fragmento en una punta de un monodientes esterilizado introducida en un tubo de reacción que solo contenía agua, seguido por adición del cóctel de la reacción de la PCR (AccuPrime<sup>TM</sup> SuperMixII, Invitrogen Carlsbad, CA) y cebadores como se ha descrito anteriormente (SEC ID N.º: 79, SEC ID N.º: 80). Los plásmidos recombinantes se aislaron y se purificaron con el QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen) y se caracterizaron mediante digestión con enzimas de restricción (*Dra*I, *Mfe*I, y *Hae*II (New England Biolabs, Beverly, MA)). Posteriormente, los plásmidos se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* BW25113 (*E. coli* Genetics Stock Center, New Haven, CT) que se ha convertido en competente utilizando el método del cloruro de calcio. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar Luria que contiene 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. El ADN plásmido se aisló y se purificó usando el kit QIAfilter<sup>TM</sup> Plasmid Midi Kit (Qiagen). El plásmido resultante que incorpora una etiqueta de polihistidina se designó como pBAD *Lm\_fabH+*. Este plásmido y pZA31 se utilizaron conjuntamente para transformar BW25113.

- 30 Las células transducidas se cultivaron en caldo Luria. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (600 nm) de 0,4-0,6, se añadió arabinosa (0,2%) para inducir la expresión de *fabH*. Se recogieron los lípidos del aglomerado celular, y se examinaron mediante cromatografía de gases, revelando picos que se corresponden con los patrones de ácido graso C15 anteiso y C15 iso. La identidad de los picos se confirmó mediante cromatografía de gases seguida por espectrometría de masas (Figura 36).

- 35 Este ejemplo demuestra la producción de ácidos grasos anteiso e iso mediante un microbio (*E. coli* cepa BW25113) que expresa la 3-cetoacil-ACP sintetasa exógena (*Listeria fabH*) y la  $\alpha$ -cetoácido ramificado deshidrogenasa exógena (*Bacillus bkd*).

Ejemplo 18. Acetohidroxiácido isomeroeductasa y dihidroxiácido deshidratasa potencian la producción de ácido graso anteiso.

- 40 Las cepas de *E. coli* que expresan *Ec tdcB* recombinante muestran una mayor producción de ácido graso C15 lineal (n-C15) (Figura 29), lo que sugiere que 2-oxobutanoato (también denominado como 2-cetobutirato) da lugar a un aumento en propionil-CoA, que se utiliza como cebador en la síntesis de ácidos grasos lineales con un número de carbonos impar (Figura 2). La producción de un AHAS recombinante disminuye los niveles de ácido graso n-C15 y aumenta los niveles de ácido graso C15 anteiso (a-C15), lo que sugiere un agotamiento de 2-oxobutanoato por AHAS (Figura 30). El mayor efecto es sobre el agotamiento de n-C15, lo que sugiere que no todo el 2-oxobutanoato se dirige a la producción de ácido graso anteiso. En una realización de la invención, *IlvC* y/o *IlvD*, las enzimas que catalizan las dos conversiones químicas posteriores a la producción de 2-oxobutanoato en la síntesis del ácido graso anteiso, se expresan en exceso para aumentar la producción de ácido graso anteiso. Para generar una fusión transcripcional de los genes de *E. coli* *ilvC* (codificado por la secuencia de ácido nucleico definida en el n.º de acceso GenBank U00096.2 de la posición 3955993 a la posición 3957468; SEC ID N.º 81) y *ilvD* (codificado por la secuencia de ácido nucleico definida en el n.º de acceso GenBank U00096.2 de la posición 3951501 a la posición 3953351; SEC ID N.º 82) que codifican respectivamente la acetohidroxiácido isomeroeductasa y dihidroxiácido deshidratasa, respectivamente, el ADN sintético optimizado según el codón está flanqueado por los sitios *Xho*I y *Mlu*I (SEC ID N.º: 83) y unido en el vector de expresión pZS22-MCS. Los genes *ilvCD* están operativamente unidos a un promotor *trc* del pTrc HisA. La inserción codifica el promotor *trc*, el operador *lac*, las secuencias antiterminación *rrnB*, el potenciador traduccional 10 del gen T7, el sitio de unión al ribosoma, las secuencias de aminoácidos publicadas para *IlvC* (n.º de acceso GenBank AAC76779) e *IlvD* (n.º de acceso GenBank AAT48208.1) (SEC ID N.º: 84 y SEC ID N.º: 85 respectivamente), y sitios de restricción únicos para *Not*I, *Pme*I, *Eco*RI, y *Xba*I.

Ejemplo 19. Atenuación de la actividad transaminasa codificada por *Ec ilvE* en la biosíntesis del ácido graso anteiso.

El flujo de carbono a través de la ruta metabólica para la producción de ácido graso anteiso se puede desviar hacia la producción de isoleucina mediante la transaminasa *IlvE* (Figura 2). Este ejemplo ilustra un método de potenciar el ácido graso anteiso atenuando la actividad *IlvE*.

5 Un mutante de delección de *ilvE*, *E. coli* JW5606-1 (*E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT), se convirtió en químicamente competente usando cloruro de calcio. Las células se transformaron con plásmidos recombinantes que contenían *bkd* de *B. subtilis*, *fabHA* de *B. subtilis*, *tdcB* de *E. coli*, y *ilvIH* de *E. coli*, o bien vectores control vacíos pZA31MCS, & pTrcHisA. Las células transformadas (40 ml) se cultivaron en medio mínimo M9 suplementado con L-isoleucina, L-valina y L-leucina, cada una a una concentración final de 0,1%. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (600 nm) de 0,4-0,6, se añadieron arabinosa (0,2%), isopropil β-D-tiogalactopiranosido (1 mM) y canhidrotetraciclina (100 ng/ml) para inducir la expresión génica. Después de aproximadamente 48 horas, se recogieron los lípidos del cultivo celular en suspensión, se hidrolizaron, se convirtieron en ésteres de metilo, y se examinaron mediante cromatografía de gases. La presencia de *Bs fabHA*, *Bs bkd*, *Ec tdcB* recombinante, y de G14D de *Ec ilvIH* llevó a una producción de ácido graso anteiso en una cepa deficiente en *Ec ilvE* (Figura 35).

15 Ejemplo 20. Construcción de un vector de expresión de enoil-ACP reductasa.

Enoil-ACP reductasa, el producto de *E. coli fabI*, cataliza una etapa limitante de la velocidad en la síntesis de ácido graso (Zheng y col., *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 875-80 (2010)). Este ejemplo proporciona un método para producir un vector de expresión que codifica una enoil-ACP reductasa. En algunas realizaciones, una construcción de expresión que codifica una enoil-ACP reductasa se introduce en un microbio que de manera natural no genera ácidos grasos ramificados, tal como *E. coli*, para potenciar la producción de ácidos grasos ramificados. En una realización, la enoil-ACP reductasa se modifica para aumentar su actividad sobre los ácidos grasos ramificados.

Para construir un vector de expresión que codifica la enoil-CoA reductasa de *B. subtilis* (codificada por *fabI* (SEC ID N.º: 92)), se preparó ADN genómico de *B. subtilis* a partir de *B. subtilis* cepa 168 (*Bacillus* Genetic Stock Center, Columbus, OH) por repicado de una colonia aislada de una placa de agar Luria, suspensión de la colonia en 41 µl de agua Milli-Q estéril, y amplificando directamente con una reacción de la PCR usando cebadores específicos de gen. Para generar un plásmido de expresión que no codifica una etiqueta polihistidina, el *B. subtilis fabI* se amplificó a partir de la muestra de ADN genómico mediante PCR usando cebadores (SEC ID N.º: 87 y SEC ID N.º: 88), que incorporaban sitios de restricción flanqueantes para *NcoI* y *PstI* en el ADN amplificado (SEC ID N.º: 89). Para generar un plásmido de expresión donde *fabI* se fusionaría con una etiqueta de polihistidina, *B. subtilis fabI* se amplificó a partir de la muestra de ADN genómico mediante PCR usando los cebadores (SEC ID N.º: 91 y SEC ID N.º: 88), que incorporaban sitios de restricción flanqueantes para *XhoI* y *PstI* en el ADN amplificado (SEC ID N.º: 90).

Se ejecutó la PCR en las muestras que tenían 41 µl de agua y una colonia suspendida de *B. subtilis* 168, 1,5 µl de una disolución madre 10 µM de cada cebador, 5 µl de mezcla de reacción 10X Pfx (Invitrogen Carlsbad, CA), y 0,5 µl de ADN polimerasa Pfx (1,25 unidades). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: las muestras se incubaron inicialmente a 95 °C durante tres minutos, seguido por 30 ciclos a 95 °C durante 30 segundos (preparación de la hebra), 58 °C durante 30 segundos (hibridación del cebador), y 68 °C para extensión del cebador durante 1,5 minutos. Tras estos ciclos, se realizó una incubación de diez minutos a 68 °C, y a continuación las muestras se guardaron a 4 °C.

Los productos de la PCR se purificaron mediante un kit de purificación QIAquick® PCR (Qiagen), se digirieron por duplicado en enzimas de restricción *XhoI/PstI* o *NcoI/PstI*, y se unieron (Fast-Link Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) a pTrc/His A digerido mediante *XhoI/PstI* o *NcoI/PstI* (Invitrogen, Carlsbad, CA). La mezcla de unión se usó a continuación para transformar células de *E. coli* DH5α™ (Invitrogen Carlsbad, CA). Se cribaron las colonias aisladas mediante la PCR usando como inóculo un fragmento en una punta de un mondadientes esterilizado introducida en un tubo de reacción que solo contenía agua, seguido por adición del cóctel de la reacción de la PCR (AccuPrime™ SuperMixII, Invitrogen Carlsbad, CA) y cebadores como se ha descrito anteriormente.

Los plásmidos recombinantes se aislaron y se purificaron con el QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) y se caracterizaron mediante digestión con enzimas de restricción (*XhoI + PstI*, *NcoI + PstI*, *DraI*, *MfeI*, y *HaeII* (Invitrogen, Carlsbad, CA o New England Biolabs, Beverly, MA)). A continuación, los plásmidos se utilizaron para transformar químicamente células BL21 STAR (DE3) competentes (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los transformantes se seleccionaron en placas de agar Luria que contiene 100 µg/ml de ampicilina. El ADN plásmido se aisló y se purificó usando el kit QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (Qiagen). La secuenciación del ADN confirmó que los insertos de *fabI* se habían clonado y que las inserciones codificaron la secuencia de aminoácidos *FabI* (SEC ID N.º: 89). El plásmido resultante que carecía de una etiqueta de polihistidina se denominó como pTrc *Bs\_fabI*- y el plásmido que incorporaba una etiqueta de polihistidina se denominó como pTrc *Bs\_fabI*+.

# ES 2 525 150 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Saunders, y col.
- <120> Ácidos grasos de cadena ramificada y producción biológica de los mismos
- 5 <130> 30766/45879  
<150> 61/289,039  
<151> 2009-12-22  
<160> 92  
<170> PatentIn versión 3.5
- 10 <210> 1  
<211> 4842  
<212> ADN  
<213> Bacillus subtilis  
<400> 1
- 15 acagacagga gtgagtcacc atggcaactg agtatgacgt agtcattctg ggcggcggtg 60  
ccggcgggta tgttgcggcc atcagagccg ctcagctcgg cttaaaaaca gccgttggtg 120  
aaaaggaaaa actcggggga acatgtctgc ataaaggctg tatcccagat aaagcgctgc 180  
ftagaagcgc agaggatatac cggacagctc gtgaagccga tcaattcgga gtggaacgg 240  
ctggcgtgtc cctcaacttt gaaaaagtgc agcagcgtaa gcaagccgtt gttgataagc 300
- 20 ttgcagcggg tgtaaatcat ttaatgaaaa aaggaaaaat tgacgtgtac accggatatg 360  
gacgtatctt tggaccgtca atcttcttc cgctgccggg aacaatttct gttgagcggg 420  
gaaatggcga agaaatgac atgctgatcc cgaacaagt gatcattgca acaggatcaa 480  
gaccgagaat gcttccgggt ctgaaagtgg acgtaagtc tgtactgact tcagatgagg 540  
cgctccaaat ggaggagctg ccacagtcaa tcatcattgt cggcggaggg gttatcggtg 600
- 25 tcgaatgggc gtctatgctt catgatlttg gcgttaaggt aacggttatt gaatacgcgg 660  
atcgcatatt gccgactgaa gatctagaga ttcaaaaaga aatggaaagt ctcttaaga 720  
aaaaaggcat ccagttcata acaggggcaa aagtgtgcc tgacacaatg acaaaaacat 780  
cagacgatat cagcatacaa gcggaaaaag acggagaaac cgttacat tctgctgaga 840  
aaatgcttgt ttcatcggc agacagggca atatcgaagg catcggccta gagaacaccg 900
- 30 atattgttac tgaaaatggc atgatttcag tcaatgaaag ctgccaaacg aaggaatctc 960  
atatttatgc aatcggagac gtaatcgggt gcctgcagtt agctcacgtt gcttcacatg 1020  
agggaattat tgcgttgtag catttgcag gtctcaatcc gcatcggctt gatccgacgc 1080  
tttgccgaa gtgcatttac tcaagccctg aagctgccag tctcggctta accgaagacg 1140  
aagcaaagc gaacgggcat aatgtcaaaa tcggcaagtt cccattatg gcgattggaa 1200
- 35 aagcgttgt atacggtgaa agcagcgggt ttgtcaaaat cgtggctgac cgagatacag 1260  
atgatattct cggcgtcat atgattgcc cgcatgtcac cgacatgatt tctgaagcgg 1320  
gtcttgcaa agtgctggac gcaacaccgt gggaggtcgg gcaaacgatt caccgcatc 1380

## ES 2 525 150 T3

caacgctttc tgaagcaatt ggagaagctg cgcttgccgc agatggcaaa gccattcatt 1440  
 tttaaaagca taaaggagg gcttgaatga gtacaaaccg acatcaagca ctagggtgta 1500  
 ctgatcagga agccgttgat atgtatagaa ccatgctggt agcaagaaaa atcgatgaaa 1560  
 gaatgtggct gftaaaccgt tctggcaaaa ttccatttgt aatctctgt caaggacagg 1620  
 5 aagcagcaca ggtaggagcg gcttccgac ttgaccgtga aatggattat gtattgccgt 1680  
 actacagaga catgggtgtc gtgctcgcgt ttggcatgac agcaaaggac ttaatgatgt 1740  
 ccgggtttgc aaaagcagca gatccgaact caggaggccg ccagatgccg ggacatttcg 1800  
 gacaaaagaa aaaccgcatt gtgacgggat catctccggt tacaacgcaa gtgccgcacg 1860  
 cagtcggtat tgcgcttgcg ggacgtatgg agaaaaagga tatcgacgcc tttgtfacat 1920  
 10 tcggggaagg gtctcaaac caaggcgatt tccatgaagg ggcaaacctt gccgctgtcc 1980  
 ataagctgcc ggttatttc atgtgtgaaa acaacaata cgcaatccta gtgccttacg 2040  
 ataagcaagt cgcattgtgag aacatttccg accgtgccat aggctatggg atgcctggcg 2100  
 taactgtgaa tggaatgat ccgctggaag tttatcaagc ggtaaagaa gcacgcgaaa 2160  
 gggcacgcag aggagaaggc ccgacattaa ttgaaacgat ttctaccgc cttacaccac 2220  
 15 attccagta tgacgatgac agcagctaca gaggccgtga agaagtagag gaagcgaaaa 2280  
 aaagtgatcc cctgcttact tatcaagctt acttaaagga aacaggcctg ctgtccgatg 2340  
 agatagaaca aaccatgctg gatgaaatta tggcaatcgt aatgaagcg acggatgaag 2400  
 cggagaacgc cccatagca gctcctgagt cagcgttga ttatgtttat gcgaagtagg 2460  
 gaggaagaac aaatgtcagt aatgtcatat attgatgcaa tcaatttggc gatgaaagaa 2520  
 20 gaaatggaac gagattctcg cgtttctgc ctggggaag atgtaggaag aaaaggcgtt 2580  
 gtgtttaaag cgacagcggg actctatgaa caatttggg aagagcgcgt tatggatacg 2640  
 ccgcttgcgt aatctgcaat cgcaggagtc ggtatcggag cggcaatgta cggaatgaga 2700  
 ccgattgctg aaatgcagtt tgctgatttc attatgccg cagtcaacca aattattct 2760  
 gaagcggcta aaatccgcta ccgagcaac aatgactgga gctgtccgat tgtcgtcaga 2820  
 25 gcgccatagc gcggaggcgt gcacggagcc ctgtatcatt ctcaatcagt cgaagcaatt 2880  
 ttcccaacc agcccggact gaaaattgtc atgccatcaa caccatagca cgcgaaaggg 2940  
 ctcttaaag ccgagttcg tgacgaagac cccgtgctgt ttttgagca caagcgggca 3000  
 taccgtctga taaaggcga ggtccggct gatgattatg tctgccaat cggcaaggcg 3060  
 gacgtaaaaa ggaaggcga cgacatcaca gtgatcacat acggcctgtg tgtccacttc 3120  
 30 gcctfacaag ctgcagaacg tctcgaaaaa gatggcattt cagcgcattt ggtggattta 3180  
 agaacagttt acccgttga taaagaagc atcatcgaag ctgctgcaa aactggaaag 3240  
 gttcttttg tcacagaaga taaaaagaa ggcagcatca tgagcgaagt agccgcaatt 3300  
 atatccgagc attgtctgt cgacttagac gcgccgatca aacggcttgc aggtcctgat 3360  
 attccggcta tgccttatgc gccgacaatg gaaaaatact ttatggtaaa ccctgataaa 3420  
 35 gtggaagcgg cgatgagaga attagcggag ttttaaagac gtaaggagg atacaatcat 3480  
 ggcaattgaa caaatgacga tgccgcagct tggagaagc gtaacagagg ggacgatcag 3540  
 caaatggctt gtcgccccg gtgataaagt gaacaaatac gatccgatcg cggagtcatt 3600

## ES 2 525 150 T3

gacagataag gtaaatgcag aggttccgctc ttctttact ggtacgataa cagagcttgt 3660  
 gggagaagaa ggccaaaccc tgcaagtcgg agaatgatt tgcaaaattg aaacagaagg 3720  
 cgcgaaatccg gctgaacaaa aacaagaaca gccacgagca tcagaagccg ctgagaaccc 3780  
 tgttgcaaaa agtgctggag cagccgatca gcccaataaa aagcgctact cgccagctgt 3840  
 5 tctccgtttg gccggagagc acggcattga cctcgatcaa gtgacaggaa ctggtgccgg 3900  
 cgggcgcatc acacgaaaag atattcagcg ctaattgaa acaggcggcg tgcaagaaca 3960  
 gaatcctgag gagctgaaaa cagcagctcc tgcaccgaag tctgcatcaa aacctgagcc 4020  
 aaaagaagag acgtcatatc ctgctgtgc agccggtgat aaagaaatcc ctgtcacagg 4080  
 tgtaagaaaa gcaattgctt ccaatatgaa gcgaagcaaa acagaaatc cgcatgctg 4140  
 10 gacgatgatg gaagtcgacg tcacaaatat ggttgcatat cgcaacagta taaaagattc 4200  
 ttttaagaag acagaaggct ttaattaac gttctcgcc tttttgtaa aagcggctgc 4260  
 tcaggcgta aaagaattcc cgcaaatgaa tagcatgtgg gcgggggaca aaattattca 4320  
 gaaaaaggat atcaatattt caattgcagt tgccacagag gattctttat ttgtccggt 4380  
 gattaaaaac gctgatgaaa aaacaattaa aggcattgag aaagacatta ccggcctagc 4440  
 15 taaaaaagta agagacggaa aactcactgc agatgacatg cagggaggca cgtttaccgt 4500  
 caacaacaca ggttcgttcg ggtctgttca gtcgatgggc attatcaact acctcaggc 4560  
 tgcgattctt caagtagaat ccatcgtcaa acgcccgggt gtcattggaca atggcatgat 4620  
 tgctgtcaga gacatggtta atctgtcct gtcattagat cacagagtgc ttgacggtct 4680  
 cgtgtgcgga cgattcctcg gacgagtgaa acaaattta gaatcgattg acgagaagac 4740  
 20 atctgtttac taaataagca aaaagagcat ttttgaagt tttgttcaa aaaatgctct 4800  
 tttctatgc ttattattc agcgatccgt atttcattt cg 4842

<210> 2

<211> 44

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 2

30 gagcatgggc ccacagacag gactgagtca ccatggcaac tgag 44

<210> 3

<211> 50

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

# ES 2 525 150 T3

<400> 3

gagaccacgc gtcgaaatga aaatacggat cgctgaataa taaagcatag 50

<210> 4

5 <211> 1425

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 4

atggcaactg agtatgacgt agcattctg ggcggcggta ccggcggfta tgtgcggcc 60

10 atcagagccg ctcagctcgg cttaaaaaca gccgtgtgg aaaaggaaaa actcggggga 120

acatgtctgc ataaaggctg tatcccgagt aaagcgtgc ttagaagcgc agaggatac 180

cggacagctc gtaagccga tcaattcga gtgaaacgg ctggcgtgc cctcaactt 240

gaaaaagtgc agcagcgtaa gcaagccgtt gttgataagc ttgcagcggg tgtaaatcat 300

ttaatgaaaa aaggaaaaat tgacgtgtac accggatatg gacgtatcct tggaccgtca 360

15 atcttctctc cgctgccggg aacaattct gttgagcggg gaaatggcga agaaaatgac 420

atgctgatcc cgaacaagt gatcattgca acaggatcaa gaccgagaat gcttccgggt 480

cttgaagtgg acggtaatg tctactgact tcagatgagg cgctccaaat ggaggagctg 540

ccacagtcaa tcatcattgt cggcggaggg gttatcggtc tcgaatgggc gtctatgctt 600

catgattttg gcgtaagggt aacggttatt gaatacgcgg atcgcattt gccgactgaa 660

20 gatctagaga ttcaaaaga aatgaaaagt cttctaaga aaaaaggcat ccagttcata 720

acaggggcaa aagtgtgcc tgacacaatg acaaaaacat cagacgatat cagcatacaa 780

gcgaaaaaag acggagaac cgttacctat tctgctgaga aatgctgtt ttccatcggc 840

agacaggcaa atatcgaagg catcggccta gagaacaccg atattgttac tgaaaatggc 900

atgatttcag tcaatgaaag ctgccaaacg aaggaatctc atatttatgc aatcggagac 960

25 gtaatcggtg gcctgcagtt agctcacgtt gctcacatg agggaattat tgctgttgag 1020

cattttgcag gtctcaatcc gcatccgctt gatccgacgc ttgtgccgaa gtgcatttac 1080

tcaagccctg aagctgccag tgctggccta accgaagacg aagcaaaggc gaacgggcat 1140

aatgtcaaaa tcggcaagtt cccatttatg gcgattggaa aagcgttgt atacggtgaa 1200

agcgacgggt ttgtcaaaat cgtggctgac cgagatacag atgatattct cggcgttcat 1260

30 atgattggcc cgcatgtcac cgacatgatt tctgaagcgg gtcttgccaa agtgctggac 1320

gcaacaccgt gggaggtcgg gcaaacgatt caccgcacat caacgcttc tgaagcaatt 1380

ggagaagctg cgcttgccgc agatggcaaa gccattcatt tttaa 1425

<210> 5

35 <211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 525 150 T3

<220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 5  
 gagacatgg ctaaagctgg aatacttggg gttggacg 38  
 5  
 <210> 6  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 6  
 cgctcctgca gtcttggtg cacctcacct 30  
 15 <210> 7  
 <211> 939  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus subtilis  
 <400> 7  
 20 atgaaagctg gaatacttgg tgttggacgt tacattcctg agaaggtttt aacaaatcat 60  
 gatcttgaaa aatgggtga aacttctgac gaggatcgt gtacaagaac aggaatagaa 120  
 gaaagaagaa tcgcagcaga tgatgtgttt tcatcacata tggctgttgc agcagcgaaa 180  
 aatgcgctgg aacaagctga agtggctgct gaggatctgg atatgatctt ggttgaact 240  
 gttacacctg atcagtcatt cctacggtc tcttgtatga ttcaagaaca actcggcgcg 300  
 25 aagaaagcgt gtgctatgga talcagcgcg gcttgtgcgg gcttcatgta cggggttgta 360  
 accggtaaac aatttattga atccggaacc tacaagcatg ttctagtgtg tgggttagag 420  
 aagctctcaa gcattaccga ctgggaagac cgcaatacag cggttctgtt tggagacgga 480  
 gcaggcgctg cggtagtcgg gccagtcagt gatgacagag gaatccttc attgaacta 540  
 ggagccgacg gcacagcgcg tcagcacttg tatctgaatg aaaaacgaca tacaatcatg 600  
 30 aatggacgag aagtttcaa atttgcagtc cgccaaatgg gagaatcatg cgtaaagtgc 660  
 attgaaaaag ccggacttc aaaagaggat gtcgactttt tgattccgca tcaggcgaac 720  
 atccgtatca tgaagctgc tcgcgagcgt ttagagcttc ctgtcgaaaa gatgtctaaa 780  
 actgttcata aataatgaaa tacttctgcc gcatccattc cgatctctct tgtagaagaa 840  
 ttggaagccg gtaaaatcaa agacggcgat gtggtcgta tggtaggggt cggcggagga 900  
 35 ctaacatggg gcgccattgc aatccgctgg ggccgataa 939  
 <210> 8

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador sintético

<400> 8

gagacgctcg agatgaaagc tggataactt ggtgttgg 38

<210> 9

10 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

15 <400> 9

cgctcctgca gtctgtgtg cacctcacct 30

<210> 10

<211> 312

20 <212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 10

Met Lys Ala Gly Ile Leu Gly Val Gly Arg Tyr Ile Pro Glu Lys Val

1 5 10 15

25

Leu Thr Asn His Asp Leu Glu Lys Met Val Glu Thr Ser Asp Glu Trp

20 25 30

Ile Arg Thr Arg Thr Gly Ile Glu Glu Arg Arg Ile Ala Ala Asp Asp

30 35 40 45

Val Phe Ser Ser His Met Ala Val Ala Ala Ala Lys Asn Ala Leu Glu

50 55 60

35 Gln Ala Glu Val Ala Ala Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Val Ala Thr

65 70 75 80



ES 2 525 150 T3

Val Thr Pro Asp Gln Ser Phe Pro Thr Val Ser Cys Met Ile Gln Glu

85 90 95

Gln Leu Gly Ala Lys Lys Ala Cys Ala Met Asp Ile Ser Ala Ala Cys

5 100 105 110

Ala Gly Phe Met Tyr Gly Val Val Thr Gly Lys Gln Phe Ile Glu Ser

115 120 125

10 Gly Thr Tyr Lys His Val Leu Val Val Gly Val Glu Lys Leu Ser Ser

130 135 140

Ile Thr Asp Trp Glu Asp Arg Asn Thr Ala Val Leu Phe Gly Asp Gly

145 150 155 160

15

Ala Gly Ala Ala Val Val Gly Pro Val Ser Asp Asp Arg Gly Ile Leu

165 170 175

Ser Phe Glu Leu Gly Ala Asp Gly Thr Gly Gly Gln His Leu Tyr Leu

20 180 185 190

Asn Glu Lys Arg His Thr Ile Met Asn Gly Arg Glu Val Phe Lys Phe

195 200 205

25 Ala Val Arg Gln Met Gly Glu Ser Cys Val Asn Val Ile Glu Lys Ala

210 215 220

Gly Leu Ser Lys Glu Asp Val Asp Phe Leu Ile Pro His Gln Ala Asn

225 230 235 240

30

Ile Arg Ile Met Glu Ala Ala Arg Glu Arg Leu Glu Leu Pro Val Glu

245 250 255

Lys Met Ser Lys Thr Val His Lys Tyr Gly Asn Thr Ser Ala Ala Ser

35 260 265 270

Ile Pro Ile Ser Leu Val Glu Glu Leu Glu Ala Gly Lys Ile Lys Asp

ES 2 525 150 T3

275 280 285

Gly Asp Val Val Val Met Val Gly Phe Gly Gly Gly Leu Thr Trp Gly

290 295 300

5

Ala Ile Ala Ile Arg Trp Gly Arg

305 310

<210> 11

10 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

15 <400> 11

gagaccatgg caaaagcaaa aattacagct atcggc 36

<210> 12

<211> 32

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 12

25 gctcctgcag ggaagaaaca tcagaagaac ag 32

<210> 13

<211> 978

<212> ADN

30 <213> Bacillus subtilis

<400> 13

atgtcaaaag caaaaattac agctatcggc acctatgcmc cgagcagacg ttaaccaat 60

gcagatttag aaaagatcgt tgatacctct gatgaatgga tcgttcagcg cacaggaatg 120

agagaacgcc ggattgcgga tgaacatcaa ttacctctg atttatgcat agaagcggtg 180

35 aagaatctca agagccgta taaaggaacg cttgatgatg tcgatatgat cctcgttgcc 240

acaaccacat ccgattacgc cttccgagt acggcatgcc gcgtagagga atatttcggc 300

tgggaaagca ccggcgcgct ggatattaat gcgacatgcm ccgggctgac atacggcctc 360

ES 2 525 150 T3

catttgcaa atggattgat cacatctggc cttcatcaaa aaattctcgt catcgccgga 420  
 gagacgttat caaaggtaac cgattatacc gatcgaacga catgctact gttcggcgat 480  
 gccgcggtg cgctgttagt agaacgagat gaagagacgc cgggatttct tgcgtctgta 540  
 caaggaacaa gcggaacgg cggcgatatt ttgtatctg cggactgcg aatgaaata 600  
 5 aacggtgtgc agctgtcgg ttccggaaaa atggtgcaaa acggacgcga ggtatataaa 660  
 tgggccgcaa gaaccgtccc tggcgaattt gaacggcttt tacataaagc aggactcagc 720  
 tccgatgac tcgattggtt tgttctcac agcgccaact tgcgcatgat cgagtcaatt 780  
 tgtgaaaaaa caccgtccc gattgaaaa acgctacta gtgtgagca ctacggaaac 840  
 acgtctcgg ttcaattgt ttggcgctc gatctcgag tgaagccgg gaagctgaaa 900  
 10 aaagatcaaa tcgtttgct ttcgggtt ggccgggat taacctatac aggattgctt 960  
 attaatggg gtagtaa 978

<210> 14

<211> 41

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 14

20 gagacgctcg agatgtcaaa agcaaaaatt acagctatcg g 41

<210> 15

<211> 35

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 15

gctcctgcag gaaggaagaa acatcagaag aacag 35

30

<210> 16

<211> 325

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

35 <400> 16

Met Ser Lys Ala Lys Ile Thr Ala Ile Gly Thr Tyr Ala Pro Ser Arg

1 5 10 15

ES 2 525 150 T3

Arg Leu Thr Asn Ala Asp Leu Glu Lys Ile Val Asp Thr Ser Asp Glu

20 25 30

5 Trp Ile Val Gln Arg Thr Gly Met Arg Glu Arg Arg Ile Ala Asp Glu

35 40 45

His Gln Phe Thr Ser Asp Leu Cys Ile Glu Ala Val Lys Asn Leu Lys

50 55 60

10

Ser Arg Tyr Lys Gly Thr Leu Asp Asp Val Asp Met Ile Leu Val Ala

65 70 75 80

Thr Thr Thr Ser Asp Tyr Ala Phe Pro Ser Thr Ala Cys Arg Val Gln

15 85 90 95

Glu Tyr Phe Gly Trp Glu Ser Thr Gly Ala Leu Asp Ile Asn Ala Thr

100 105 110

20 Cys Ala Gly Leu Thr Tyr Gly Leu His Leu Ala Asn Gly Leu Ile Thr

115 120 125

Ser Gly Leu His Gln Lys Ile Leu Val Ile Ala Gly Glu Thr Leu Ser

130 135 140

25

Lys Val Thr Asp Tyr Thr Asp Arg Thr Thr Cys Val Leu Phe Gly Asp

145 150 155 160

Ala Ala Gly Ala Leu Leu Val Glu Arg Asp Glu Glu Thr Pro Gly Phe

30 165 170 175

Leu Ala Ser Val Gln Gly Thr Ser Gly Asn Gly Gly Asp Ile Leu Tyr

180 185 190

35 Arg Ala Gly Leu Arg Asn Glu Ile Asn Gly Val Gln Leu Val Gly Ser

195 200 205

ES 2 525 150 T3

Gly Lys Met Val Gln Asn Gly Arg Glu Val Tyr Lys Trp Ala Ala Arg  
 210 215 220

Thr Val Pro Gly Glu Phe Glu Arg Leu Leu His Lys Ala Gly Leu Ser  
 5 225 230 235 240

Ser Asp Asp Leu Asp Trp Phe Val Pro His Ser Ala Asn Leu Arg Met  
 245 250 255

10 Ile Glu Ser Ile Cys Glu Lys Thr Pro Phe Pro Ile Glu Lys Thr Leu  
 260 265 270

Thr Ser Val Glu His Tyr Gly Asn Thr Ser Ser Val Ser Ile Val Leu  
 275 280 285

15 Ala Leu Asp Leu Ala Val Lys Ala Gly Lys Leu Lys Lys Asp Gln Ile  
 290 295 300

20 Val Leu Leu Phe Gly Phe Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Thr Gly Leu Leu  
 305 310 315 320

Ile Lys Trp Gly Met  
 325

25 <210> 17  
 <211> 756  
 <212> ADN  
 <213> Anas platyrhynchos  
 <400> 17

30 atggataaag ttattgcacg tccgtataaa cggcctaag cgttatgcag attgattgt 60  
 ttcccgtagg caggcggaaa ctgctcatt tcatcagat ggtgtgaagc gtttcaagc 120  
 attatcgttg tgctgtgat tgccttgct ggcagagaat gccgcgatac agaaccgttt 180  
 cctgaagata tggctgaagt cgtaaatgaa atcacgaacg ccctgctaa agatttgcaa 240  
 gaaaaaccgt ttgattgtt tggccatagc tttggatctt ttgcagcta tgcactggcg 300  
 35 gtacatctta aagaaaaaca tggattagaa ccggtccaca tgttttctc aggcagctat 360  
 ggccctcatt ctgaataact tcaattgatg tacaattgc cgaagtaga agattcacgc 420  
 ttattggaac tgattcatac acttggcggg acgccgctg aattttgca aaacgaacag 480

ES 2 525 150 T3

atcacaaaac atctgctcgc tgttctgaaa gaagatcaga aagttctgt gacgtatcct 540  
 tggcatgatg tgcgaaaaa atactttct tgcgatctga catgtttta tggctcagat 600  
 gagaaaaatc atggctcaga agcatggatt gccatcacat caggcgatac gagcatctac 660  
 tctttaccgg gaaaccattt ttacttgatg gaacctcaa acgaaacatt tctgatcaaa 720  
 5 tacatcacga aatgtattga aaacagcgat atttaa 756  
  
 <210> 18  
 <211> 756  
 <212> ADN  
 10 <213> Anas platyrhynchos  
 <400> 18  
 atggataagg tgattgcccg tccatacaaa aggccaaatg ctctctgtag gctgattgca 60  
 ttccctggg ctggaggtaa ctgtcttc tttattcgat ggtgcgaagc ctcagcagc 120  
 ataattgtag tgtccgttat aaggcttgc ggaagagaat gtcgtgatac ggagcctttt 180  
 15 ccagaagaca tggcagaagt agttaatgaa attacaaatg cttgttaaa agatctgcaa 240  
 gaaaaacat ttgattatt tggcacagt ttggatctt tegttagtta tgcactgca 300  
 gtacacttga aagagaagca cggattagag ccggtccata tgttttctc agggcatat 360  
 ggcccacata gtgaatatt tcatctgatg tacaattgc ctgaagtaga agatagtcgc 420  
 ttgctgaac ttatacacac attaggagga actcctcctg agttctgca aaatgaacaa 480  
 20 atcacaaaac atttgttacg tgttttaaaa gaagaccaga aagttctgt cacatctct 540  
 tggcacgatg taagaagaa atacttctt tgtgatctta cctgctttaa cgggtctgat 600  
 gaaaaaac atggctcaga agcctggatt gcaataacca gttgagatac ttccattac 660  
 agtctctcg gaaatcactt ttactaatg gagcctcta acgaaactt cttgataaaa 720  
 tacataacta aatgtataga aaattctgac atatga 756  
 25  
 <210> 19  
 <211> 792  
 <212> ADN  
 <213> Rattus norvegicus  
 30 <400> 19  
 atggaaacag ctgttaatgc caaatcaccg agaaacgaaa aagtgcctaa ctgctgtac 60  
 caaaaccgg atgcagttt taaactgatt tgtttcctt gggctggcgg aggcagcatt 120  
 cattttgcca aatggggaca gaaaatcaac gattctttg aagtccatgc agtacgcctg 180  
 gcgggaagag aaacacgcct tggcgaaccg ttgcaaacg atattacca aatcgagat 240  
 35 gaaatcgta cggcgtctg tctatcatc caggataaag catttgcat ttcggacat 300  
 agcttggtc ctatattgc ttaatacaca gcctgttgc tgaagaaaa atacaaatg 360  
 gaaccgttc atactttgt gtcaggcgtc agcggccctc attctacac acgtccgcaa 420

ES 2 525 150 T3

gtccctgatt tgaacgaact gacggaagaa caagtacggc atcatctttt agattttgga 480  
 gccacgccga aacatttgat cgaagatcaa gatgtcttga gaatgttat ccctttgctg 540  
 aaagcagatg cgggagttgt gaaaaaattt atctttgata aaccgtctaa agctcttctg 600  
 tcactggata ttacaggatt ttaggctca gaagatacga ttaaagatat tgaaggatgg 660  
 5 caggatctta caagcggcaa atttgatgta cacatgctgc cgggcatca ttttatctt 720  
 atgaaactcg ataacgaaaa ctttatcaaa aactacatcg cgaatgctt ggaactgtca 780  
 tcactgacgt aa 792

<210> 20  
 10 <211> 792  
 <212> ADN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 20

atggagacag cagtcaatgc taagagtccc aggaatgaaa aggttttgaa ctgtttgat 60  
 15 caaaatctg atgcagtttt caagctgatc tgcttccctt gggcaggagg cggctccatc 120  
 cattttgcca agtggggcca aaagattaac gactctctgg aagtgcctgc tgtaagactg 180  
 gctggaagag aaaccggact tggagaacct ttcgcaaatg acatctacca gatagctgat 240  
 gaaatcgtga cgcctctgt gccatcatt caggataaag ctttgcgtt tttggccac 300  
 agttttgat cctacattgc tcttattact gctctgctcc taaaggagaa atacaaaatg 360  
 20 gagccgctgc atattttgt atccggtgca tccgccctc actcaacatc cggcctcaa 420  
 gttctgatc ttaacgaatt gacagaagaa caagtcagac atcaccttct ggatttcgga 480  
 gccacgccca agcatctcat agaagaccag gatgttctga ggatgttcat tcctttgctg 540  
 aaggcagatg ctggcgttgt gaaaaaattc atctttgaca agccctcaa agctcttctc 600  
 tctctggaca taacgggctt ccttgatct gaagatacaa taaaggacat agaaggctgg 660  
 25 caagacctaa ccagtgaggaa gtttgatgc cacatgctgc caggcgacca ctttatctg 720  
 atgaagcccg acaacgagaa ctttatcaag aactacatag ccaagtgctt ggaactctcg 780  
 tcactcactt ga 792

<210> 21  
 30 <211> 993  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus subtilis  
 <400> 21

atgagtacaa accgacatca agcactaggg ctgactgatc aggaagccgt tgatattgat 60  
 35 agaaccatgc tgttagcaag aaaaatcgat gaaagaatgt ggctgttaaa ccgttctggc 120  
 aaaattccat ttgtaatctc ttgcaagga caggaagcag cacaggtagg agcggcttctc 180  
 gcactgacc gtgaaatgga ttatgtattg ccgtactaca gagacatggg tgcctgctc 240

ES 2 525 150 T3

gcgtttggca tgacagcaaa ggacttaatg atgtccgggt ttgcaaaagc agcagatccg 300  
 aactcaggag gccgccagat gccgggacat ttcggacaaa agaaaaaccg cattgtgacg 360  
 ggatcatctc cggttacaac gcaagtgccg cacgcagtcg gtattgctgct tgcgggacgt 420  
 atggagaaaa aggatatcgc agccttgtt acattcgggg aagggtcttc aaaccaaggc 480  
 5 gatttccatg aaggggcaaa cttgcccgt gtccataagc tgccggttat tttcatgtgt 540  
 gaaaacaaca aatacgaat ctacgtgcct tacgataagc aagtgcgatg tgagaacatt 600  
 tccgaccgtg ccataggcta tgggatgcct ggcgtaactg tgaatggaaa tgatccgctg 660  
 gaagttatc aagcggltaa agaagcacgc gaaagggcac gcagaggaga aggcccgaca 720  
 ttaattgaaa cgatttcta ccgcttaca ccacattcca gtgatgacga tgacagcagc 780  
 10 tacagaggcc gtaagaagt agaggaagcg aaaaaaagt atcccctgct tacttatcaa 840  
 gcttactaa aggaaacagg cctgctgtcc gatgagatag aacaacat gctggatgaa 900  
 attatggcaa tcgtaaatga agcgacggat gaagcggaga acgcccata tgcagctcct 960  
 gagtcagcgc ttgattatgt ttatgcaag tag 993

15 <210> 22  
 <211> 984  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus subtilis  
 <400> 22

20 atgtcagtaa tgcatatat tgatgcaatc aattggcga tgaaagaaga aatggaacga 60  
 gattctcgcg tttctgctc tgggaagat gtaggaagaa aaggcgggtg gttaaagcg 120  
 acagcgggac tctatgaaca atttgggaa gagcgcgta tggatacgcc gcttgctgaa 180  
 tctgcaatcg caggagtcgg tatcggagcg gcaatgtacg gaatgagacc gattgctgaa 240  
 atgcagtttg ctgatttcat tatgccgca gtcaacaaaa ttatttctga agcggctaaa 300

25 atccgctacc gcagcaacaa tgactggagc tgtccgattg tcgtcagagc gccatacggc 360  
 ggaggcgtgc acggagccct gtatcattct caatcagtcg aagcaatftt cgccaaccag 420  
 cccggactga aaattgtcat gccatcaaca ccatatgacg cgaaagggtc cttaaaagcc 480  
 gcagttcgtg acgaagacc cgtgctgttt ttgagcaca agcgggcata ccgtctgata 540  
 aagggcgagg ttccggctga tgattatgct ctgccaatcg gcaaggcgga cgtaaaaagg 600

30 gaaggcgacg acatcacagt gatcacatac ggcctgtgtg tccacttcgc cttacaagct 660  
 gcagaacgtc tcgaaaaaga tggcatttca gcgcatgtgg tggatttaag aacagtttac 720  
 ccgcttgata aagaagccat catcgaagct gcgccaataa ctggaaggt tctttggctc 780  
 acagaagata caaaagaagg cagcatcatg agcgaagtag ccgcaattat atccgagcat 840  
 tgtctgttcg acttagacgc gccgatcaaa cggcttgacg gtccctgat tccggctatg 900

35 ccttatgccc cgacaatgga aaaatacttt atggtcaacc ctgataaagt ggaagcggcg 960  
 atgagagaat tagcggagtt ttaa 984



ES 2 525 150 T3

<210> 23

<211> 1275

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

5 <400> 23

atggcaattg aacaaatgac gatgccgag ctggagaaa gcgtaacaga ggggacgac 60

agcaaatggc ttgtgcccc cggtgataaa gtgaacaaat acgatccgat cgcggaagtc 120

atgacagata aggtaaatgc agaggttccg tcttcttta ctggtacgat aacagagctt 180

gtgggagaag aaggccaaac cctgcaagtc ggagaaatga tttgcaaaat tgaacagaa 240

10 ggcgcaatc cggctgaaca aaaacaagaa cagccagcag catcagaagc cgctgagaac 300

cctgttcaa aaagtgtcg agcagccgat cagccaata aaaagcgcta ctcgccagct 360

gttctccgtt tggccgaga gcacggcatt gacctgatc aagtacagg aactggtgcc 420

ggcgggcga tcacacgaaa agatattcag cgcttaattg aaacaggcgg cgtgcaagaa 480

cagaatctg aggagctgaa aacagcagct cctgcaccga agtctgatc aaaacctgag 540

15 ccaaaagaag agacgcata tctgctgtc gcagccggtg ataaagaaat ccctgtcaca 600

ggtgtaagaa aagcaattgc ttccaatag aagcgaagca aaacagaaat tccgcatgct 660

tggacgatga tggaagtcca cgtcacaat atggttgc atcgaacag tataaagat 720

tctttaaga agacagaagg cttaattta acgttctcg cctttttgt aaaagcggtc 780

gctcaggcgt taaaagaatt cccgcaaatg aatagcatgt gggcggggga caaaattatt 840

20 cagaaaaagg atatcaatat ttcaattgca gttgccacag aggattctt atttgtccg 900

gtgattaaac acgctgatga aaaacaatt aaaggcattg cgaagacat tacggccta 960

gctaaaaaag taagagacgg aaaactcact gcagatgaca tgcagggagg cacgtttacc 1020

gtcaacaaca caggttcgtt cgggtctgtt cagtcgatgg gcattatcaa ctaccctcag 1080

gctgcgattc ttcaagtaga atccatgctc aaacgcccg ttgcatgga caatggcatg 1140

25 attgctgtca gagacatggt taatctgtc ctgtcattag atcacagagt gcttgacggt 1200

ctcgtgtgcg gacgattcct cggacgagtg aaacaaatt tagaatcgat tgacgagaag 1260

acatctgttt actaa

1275

<210> 24

30 <211> 474

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 24

Met Ala Thr Glu Tyr Asp Val Val Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly Gly

35 1 5 10 15

Tyr Val Ala Ala Ile Arg Ala Ala Gln Leu Gly Leu Lys Thr Ala Val

ES 2 525 150 T3

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

ES 2 525 150 T3

Ser Lys Glu Met Glu Ser Leu Leu Lys Lys Lys Gly Ile Gln Phe Ile

225            230            235            240

5 Thr Gly Ala Lys Val Leu Pro Asp Thr Met Thr Lys Thr Ser Asp Asp

245            250            255

Ile Ser Ile Gln Ala Glu Lys Asp Gly Glu Thr Val Thr Tyr Ser Ala

260            265            270

10

Glu Lys Met Leu Val Ser Ile Gly Arg Gln Ala Asn Ile Glu Gly Ile

275            280            285

Gly Leu Glu Asn Thr Asp Ile Val Thr Glu Asn Gly Met Ile Ser Val

15            290            295            300

Asn Glu Ser Cys Gln Thr Lys Glu Ser His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp

305            310            315            320

20 Val Ile Gly Gly Leu Gln Leu Ala His Val Ala Ser His Glu Gly Ile

325            330            335

Ile Ala Val Glu His Phe Ala Gly Leu Asn Pro His Pro Leu Asp Pro

340            345            350

25

Thr Leu Val Pro Lys Cys Ile Tyr Ser Ser Pro Glu Ala Ala Ser Val

355            360            365

Gly Leu Thr Glu Asp Glu Ala Lys Ala Asn Gly His Asn Val Lys Ile

30            370            375            380

Gly Lys Phe Pro Phe Met Ala Ile Gly Lys Ala Leu Val Tyr Gly Glu

385            390            395            400

35 Ser Asp Gly Phe Val Lys Ile Val Ala Asp Arg Asp Thr Asp Asp Ile

405            410            415

ES 2 525 150 T3

Leu Gly Val His Met Ile Gly Pro His Val Thr Asp Met Ile Ser Glu

420 425 430

Ala Gly Leu Ala Lys Val Leu Asp Ala Thr Pro Trp Glu Val Gly Gln

5 435 440 445

Thr Ile His Pro His Pro Thr Leu Ser Glu Ala Ile Gly Glu Ala Ala

450 455 460

10 Leu Ala Ala Asp Gly Lys Ala Ile His Phe

465 470

<210> 25

<211> 330

15 <212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 25

Met Ser Thr Asn Arg His Gln Ala Leu Gly Leu Thr Asp Gln Glu Ala

1 5 10 15

20

Val Asp Met Tyr Arg Thr Met Leu Leu Ala Arg Lys Ile Asp Glu Arg

20 25 30

Met Trp Leu Leu Asn Arg Ser Gly Lys Ile Pro Phe Val Ile Ser Cys

25 35 40 45

Gln Gly Gln Glu Ala Ala Gln Val Gly Ala Ala Phe Ala Leu Asp Arg

50 55 60

30 Glu Met Asp Tyr Val Leu Pro Tyr Tyr Arg Asp Met Gly Val Val Leu

65 70 75 80

Ala Phe Gly Met Thr Ala Lys Asp Leu Met Met Ser Gly Phe Ala Lys

85 90 95

35

Ala Ala Asp Pro Asn Ser Gly Gly Arg Gln Met Pro Gly His Phe Gly

100 105 110

ES 2 525 150 T3

Gln Lys Lys Asn Arg Ile Val Thr Gly Ser Ser Pro Val Thr Thr Gln  
115 120 125

5 Val Pro His Ala Val Gly Ile Ala Leu Ala Gly Arg Met Glu Lys Lys  
130 135 140

Asp Ile Ala Ala Phe Val Thr Phe Gly Glu Gly Ser Ser Asn Gln Gly  
145 150 155 160

10 Asp Phe His Glu Gly Ala Asn Phe Ala Ala Val His Lys Leu Pro Val  
165 170 175

15 Ile Phe Met Cys Glu Asn Asn Lys Tyr Ala Ile Ser Val Pro Tyr Asp  
180 185 190

Lys Gln Val Ala Cys Glu Asn Ile Ser Asp Arg Ala Ile Gly Tyr Gly  
195 200 205

20 Met Pro Gly Val Thr Val Asn Gly Asn Asp Pro Leu Glu Val Tyr Gln  
210 215 220

Ala Val Lys Glu Ala Arg Glu Arg Ala Arg Arg Gly Glu Gly Pro Thr  
225 230 235 240

25 Leu Ile Glu Thr Ile Ser Tyr Arg Leu Thr Pro His Ser Ser Asp Asp  
245 250 255

30 Asp Asp Ser Ser Tyr Arg Gly Arg Glu Glu Val Glu Glu Ala Lys Lys  
260 265 270

Ser Asp Pro Leu Leu Thr Tyr Gln Ala Tyr Leu Lys Glu Thr Gly Leu  
275 280 285

35 Leu Ser Asp Glu Ile Glu Gln Thr Met Leu Asp Glu Ile Met Ala Ile  
290 295 300

ES 2 525 150 T3

Val Asn Glu Ala Thr Asp Glu Ala Glu Asn Ala Pro Tyr Ala Ala Pro

305            310            315            320

Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Val Tyr Ala Lys

5            325            330

<210> 26

<211> 327

<212> PRT

10 <213> Bacillus subtilis

<400> 26

Met Ser Val Met Ser Tyr Ile Asp Ala Ile Asn Leu Ala Met Lys Glu

1            5            10            15

15 Glu Met Glu Arg Asp Ser Arg Val Phe Val Leu Gly Glu Asp Val Gly

20            25            30

Arg Lys Gly Gly Val Phe Lys Ala Thr Ala Gly Leu Tyr Glu Gln Phe

35            40            45

20

Gly Glu Glu Arg Val Met Asp Thr Pro Leu Ala Glu Ser Ala Ile Ala

50            55            60

Gly Val Gly Ile Gly Ala Ala Met Tyr Gly Met Arg Pro Ile Ala Glu

25 65            70            75            80

Met Gln Phe Ala Asp Phe Ile Met Pro Ala Val Asn Gln Ile Ile Ser

85            90            95

30 Glu Ala Ala Lys Ile Arg Tyr Arg Ser Asn Asn Asp Trp Ser Cys Pro

100            105            110

Ile Val Val Arg Ala Pro Tyr Gly Gly Gly Val His Gly Ala Leu Tyr

115            120            125

35

His Ser Gln Ser Val Glu Ala Ile Phe Ala Asn Gln Pro Gly Leu Lys

130            135            140

ES 2 525 150 T3

Ile Val Met Pro Ser Thr Pro Tyr Asp Ala Lys Gly Leu Leu Lys Ala

145            150            155            160

5    Ala Val Arg Asp Glu Asp Pro Val Leu Phe Phe Glu His Lys Arg Ala

          165            170            175

Tyr Arg Leu Ile Lys Gly Glu Val Pro Ala Asp Asp Tyr Val Leu Pro

          180            185            190

10

Ile Gly Lys Ala Asp Val Lys Arg Glu Gly Asp Asp Ile Thr Val Ile

          195            200            205

Thr Tyr Gly Leu Cys Val His Phe Ala Leu Gln Ala Ala Glu Arg Leu

15

          210            215            220

Glu Lys Asp Gly Ile Ser Ala His Val Val Asp Leu Arg Thr Val Tyr

225            230            235            240

20    Pro Leu Asp Lys Glu Ala Ile Ile Glu Ala Ala Ser Lys Thr Gly Lys

          245            250            255

Val Leu Leu Val Thr Glu Asp Thr Lys Glu Gly Ser Ile Met Ser Glu

          260            265            270

25

Val Ala Ala Ile Ile Ser Glu His Cys Leu Phe Asp Leu Asp Ala Pro

          275            280            285

Ile Lys Arg Leu Ala Gly Pro Asp Ile Pro Ala Met Pro Tyr Ala Pro

30

          290            295            300

Thr Met Glu Lys Tyr Phe Met Val Asn Pro Asp Lys Val Glu Ala Ala

305            310            315            320

35    Met Arg Glu Leu Ala Glu Phe

          325

ES 2 525 150 T3

<210> 27

<211> 424

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

5 <400> 27

Met Ala Ile Glu Gln Met Thr Met Pro Gln Leu Gly Glu Ser Val Thr

1 5 10 15

Glu Gly Thr Ile Ser Lys Trp Leu Val Ala Pro Gly Asp Lys Val Asn

10 20 25 30

Lys Tyr Asp Pro Ile Ala Glu Val Met Thr Asp Lys Val Asn Ala Glu

35 40 45

15 Val Pro Ser Ser Phe Thr Gly Thr Ile Thr Glu Leu Val Gly Glu Glu

50 55 60

Gly Gln Thr Leu Gln Val Gly Glu Met Ile Cys Lys Ile Glu Thr Glu

65 70 75 80

20

Gly Ala Asn Pro Ala Glu Gln Lys Gln Glu Gln Pro Ala Ala Ser Glu

85 90 95

Ala Ala Glu Asn Pro Val Ala Lys Ser Ala Gly Ala Ala Asp Gln Pro

25 100 105 110

Asn Lys Lys Arg Tyr Ser Pro Ala Val Leu Arg Leu Ala Gly Glu His

115 120 125

30 Gly Ile Asp Leu Asp Gln Val Thr Gly Thr Gly Ala Gly Gly Arg Ile

130 135 140

Thr Arg Lys Asp Ile Gln Arg Leu Ile Glu Thr Gly Gly Val Gln Glu

145 150 155 160

35

Gln Asn Pro Glu Glu Leu Lys Thr Ala Ala Pro Ala Pro Lys Ser Ala

165 170 175



ES 2 525 150 T3

Ser Lys Pro Glu Pro Lys Glu Glu Thr Ser Tyr Pro Ala Ser Ala Ala

180 185 190

5 Gly Asp Lys Glu Ile Pro Val Thr Gly Val Arg Lys Ala Ile Ala Ser

195 200 205

Asn Met Lys Arg Ser Lys Thr Glu Ile Pro His Ala Trp Thr Met Met

210 215 220

10

Glu Val Asp Val Thr Asn Met Val Ala Tyr Arg Asn Ser Ile Lys Asp

225 230 235 240

Ser Phe Lys Lys Thr Glu Gly Phe Asn Leu Thr Phe Phe Ala Phe Phe

15

245 250 255

Val Lys Ala Val Ala Gln Ala Leu Lys Glu Phe Pro Gln Met Asn Ser

260 265 270

20 Met Trp Ala Gly Asp Lys Ile Ile Gln Lys Lys Asp Ile Asn Ile Ser

275 280 285

Ile Ala Val Ala Thr Glu Asp Ser Leu Phe Val Pro Val Ile Lys Asn

290 295 300

25

Ala Asp Glu Lys Thr Ile Lys Gly Ile Ala Lys Asp Ile Thr Gly Leu

305 310 315 320

Ala Lys Lys Val Arg Asp Gly Lys Leu Thr Ala Asp Asp Met Gln Gly

30

325 330 335

Gly Thr Phe Thr Val Asn Asn Thr Gly Ser Phe Gly Ser Val Gln Ser

340 345 350

35 Met Gly Ile Ile Asn Tyr Pro Gln Ala Ala Ile Leu Gln Val Glu Ser

355 360 365

ES 2 525 150 T3

Ile Val Lys Arg Pro Val Val Met Asp Asn Gly Met Ile Ala Val Arg

370 375 380

Asp Met Val Asn Leu Cys Leu Ser Leu Asp His Arg Val Leu Asp Gly

5 385 390 395 400

Leu Val Cys Gly Arg Phe Leu Gly Arg Val Lys Gln Ile Leu Glu Ser

405 410 415

10 Ile Asp Glu Lys Thr Ser Val Tyr

420

<210> 28

<211> 251

15 <212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 28

Met Asp Lys Val Ile Ala Arg Pro Tyr Lys Arg Pro Asn Ala Leu Cys

1 5 10 15

20

Arg Leu Ile Cys Phe Pro Trp Ala Gly Gly Asn Cys Ser Phe Phe Ile

20 25 30

Arg Trp Cys Glu Ala Phe Ser Ser Ile Ile Val Val Ser Val Ile Arg

25 35 40 45

Leu Ala Gly Arg Glu Cys Arg Asp Thr Glu Pro Phe Pro Glu Asp Met

50 55 60

30 Ala Glu Val Val Asn Glu Ile Thr Asn Ala Leu Leu Lys Asp Leu Gln

65 70 75 80

Glu Lys Pro Phe Ala Leu Phe Gly His Ser Phe Gly Ser Phe Val Ser

85 90 95

35

Tyr Ala Leu Ala Val His Leu Lys Glu Lys His Gly Leu Glu Pro Val

100 105 110

ES 2 525 150 T3

His Met Phe Phe Ser Gly Ser Tyr Gly Pro His Ser Glu Tyr Phe His  
115 120 125

5 Leu Met Tyr Lys Leu Pro Glu Val Glu Asp Ser Arg Leu Leu Glu Leu  
130 135 140

Ile His Thr Leu Gly Gly Thr Pro Pro Glu Phe Leu Gln Asn Glu Gln  
145 150 155 160

10 Ile Thr Lys His Leu Leu Arg Val Leu Lys Glu Asp Gln Lys Val Leu  
165 170 175

15 Val Thr Tyr Pro Trp His Asp Val Arg Lys Lys Tyr Phe Ser Cys Asp  
180 185 190

Leu Thr Cys Phe Asn Gly Ser Asp Glu Lys Asn His Gly Ser Glu Ala  
195 200 205

20 Trp Ile Ala Ile Thr Ser Gly Asp Thr Ser Ile Tyr Ser Leu Pro Gly  
210 215 220

Asn His Phe Tyr Leu Met Glu Pro Ser Asn Glu Thr Phe Leu Ile Lys  
225 230 235 240

25 Tyr Ile Thr Lys Cys Ile Glu Asn Ser Asp Ile  
245 250

<210> 29

30 <211> 263

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 29

35 Met Glu Thr Ala Val Asn Ala Lys Ser Pro Arg Asn Glu Lys Val Leu  
1 5 10 15

Asn Cys Leu Tyr Gln Asn Pro Asp Ala Val Phe Lys Leu Ile Cys Phe

ES 2 525 150 T3

20            25            30

Pro Trp Ala Gly Gly Gly Ser Ile His Phe Ala Lys Trp Gly Gln Lys  
35            40            45

5

Ile Asn Asp Ser Leu Glu Val His Ala Val Arg Leu Ala Gly Arg Glu  
50            55            60

Thr Arg Leu Gly Glu Pro Phe Ala Asn Asp Ile Tyr Gln Ile Ala Asp  
10 65            70            75            80

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

15 Phe Phe Gly His Ser Phe Gly Ser Tyr Ile Ala Leu Ile Thr Ala Leu  
100            105            110

Leu Leu Lys Glu Lys Tyr Lys Met Glu Pro Leu His Ile Phe Val Ser  
115            120            125

20

Gly Ala Ser Ala Pro His Ser Thr Ser Arg Pro Gln Val Pro Asp Leu  
130            135            140

Asn Glu Leu Thr Glu Glu Gln Val Arg His His Leu Leu Asp Phe Gly  
25 145            150            155            160

Gly Thr Pro Lys His Leu Ile Glu Asp Gln Asp Val Leu Arg Met Phe  
165            170            175

30 Ile Pro Leu Leu Lys Ala Asp Ala Gly Val Val Lys Lys Phe Ile Phe  
180            185            190

Asp Lys Pro Ser Lys Ala Leu Leu Ser Leu Asp Ile Thr Gly Phe Leu  
195            200            205

35

Gly Ser Glu Asp Thr Ile Lys Asp Ile Glu Gly Trp Gln Asp Leu Thr  
210            215            220

ES 2 525 150 T3

Ser Gly Lys Phe Asp Val His Met Leu Pro Gly Asp His Phe Tyr Leu  
225            230            235            240

5 Met Lys Pro Asp Asn Glu Asn Phe Ile Lys Asn Tyr Ile Ala Lys Cys  
          245            250            255

Leu Glu Leu Ser Ser Leu Thr  
          260

10

<210> 30

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador sintético

<400> 30

gtgccatggc tcatattaca tacgatctgc cggttgc            37

20 <210> 31

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador sintético

<400> 31

gatcgaattc atccttaggc gtcaacgaaa cgggtgatt g            41

<210> 32

30 <211> 993

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nucleótido sintético

35 <400> 32

atggctcata ttacatacga tctgccggtt gctattgatg acattattga agcgaacaa    60

cgactggctg ggccaattta taaacaggc atgcctcgct ccaactattt tagtgaacgt    120

ES 2 525 150 T3

tgcaaagtg aaatattcct gaagtttgaa aatatgcagc gtacgggttc atttaaaatt 180  
 cgtggcgcat ttaataaatt aagttcactg accgatgctg aaaaacgcaa aggcgtgggtg 240  
 gcctgttctg cgggcaacca tgcgcaaggg gtttccctct cctgctcgat gctgggtatc 300  
 gacggtaaag tggatgacc aaaagtgctg ccaaaatcca aagtagcggc aacgtgctgac 360  
 5 tactccgcag aagtcgttct gcatggtgat aactcaacg aactatcgc taaagtgagc 420  
 gaaattgtcg aaatggaagg ccgtattttt atcccacctt acgatgatcc gaaagtgatt 480  
 gctggccagg gaacgattgg tctggaaatt atggaagatc tctatgatgt cgataacgtg 540  
 attgtgccaa ttggtggggg cggtttaatt gctggtattg cgggtggcaat taaatctatt 600  
 aacccgacca ttcgtgttat tggcgtacag tctgaaaacg ttcacggcat ggcggcttct 660  
 10 ttccactccg gagaataaac cagcaccga actaccggca cctggcgga tggttgtgat 720  
 gtctcccgcc cgggtaattt aactacgaa atcgttcgtg aattagtcga tgacatcgtg 780  
 ctggtcagcg aagacgaaat cagaaacagt atgattgcct taattcagcg caataaagtc 840  
 gtcaccgaag gcgcaggcgc tctggcatgt gctgcattat taagcggtaa attagaccaa 900  
 tatattcaaa acagaaaaac cgtcagtatt atttccggcg gcaatatcga tctttctcgc 960  
 15 gtctctcaaa tcaccggttt cgttgacgcc taa 993

<210> 33

<211> 330

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 33

Met Ala His Ile Thr Tyr Asp Leu Pro Val Ala Ile Asp Asp Ile Ile

25 1 5 10 15

Glu Ala Lys Gln Arg Leu Ala Gly Arg Ile Tyr Lys Thr Gly Met Pro

20 25 30

30 Arg Ser Asn Tyr Phe Ser Glu Arg Cys Lys Gly Glu Ile Phe Leu Lys

35 40 45

Phe Glu Asn Met Gln Arg Thr Gly Ser Phe Lys Ile Arg Gly Ala Phe

50 55 60

35

Asn Lys Leu Ser Ser Leu Thr Asp Ala Glu Lys Arg Lys Gly Val Val

65 70 75 80

ES 2 525 150 T3

Ala Cys Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ser Leu Ser Cys Ala

85 90 95

5 Met Leu Gly Ile Asp Gly Lys Val Val Met Pro Lys Gly Ala Pro Lys

100 105 110

Ser Lys Val Ala Ala Thr Cys Asp Tyr Ser Ala Glu Val Val Leu His

115 120 125

10

Gly Asp Asn Phe Asn Asp Thr Ile Ala Lys Val Ser Glu Ile Val Glu

130 135 140

Met Glu Gly Arg Ile Phe Ile Pro Pro Tyr Asp Asp Pro Lys Val Ile

15 145 150 155 160

Ala Gly Gln Gly Thr Ile Gly Leu Glu Ile Met Glu Asp Leu Tyr Asp

165 170 175

20 Val Asp Asn Val Ile Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Leu Ile Ala Gly

180 185 190

Ile Ala Val Ala Ile Lys Ser Ile Asn Pro Thr Ile Arg Val Ile Gly

195 200 205

25

Val Gln Ser Glu Asn Val His Gly Met Ala Ala Ser Phe His Ser Gly

210 215 220

Glu Ile Thr Thr His Arg Thr Thr Gly Thr Leu Ala Asp Gly Cys Asp

30 225 230 235 240

Val Ser Arg Pro Gly Asn Leu Thr Tyr Glu Ile Val Arg Glu Leu Val

245 250 255

35 Asp Asp Ile Val Leu Val Ser Glu Asp Glu Ile Arg Asn Ser Met Ile

260 265 270

ES 2 525 150 T3

Ala Leu Ile Gln Arg Asn Lys Val Val Thr Glu Gly Ala Gly Ala Leu

275 280 285

Ala Cys Ala Ala Leu Leu Ser Gly Lys Leu Asp Gln Tyr Ile Gln Asn

5 290 295 300

Arg Lys Thr Val Ser Ile Ile Ser Gly Gly Asn Ile Asp Leu Ser Arg

305 310 315 320

10 Val Ser Gln Ile Thr Gly Phe Val Asp Ala

325 330

<210> 34

<211> 1725

15 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 34

atggagatgt tgtctggagc cgagatggc gtccgatcgc ttatcgatca gggcgtaaa 60

caagtattcg gttatcccgg aggcgcagtc ctgatattt atgatgcatt gcataccgtg 120

20 ggtggtattg atcatgtatt agtctgcat gacgagcgg cggtgcatat ggccgatggc 180

ctggcgcgcg cgaccgggga agtcggcgtc gtgctggtaa cgtcgggtcc agggcgacc 240

aatgcgatta ctggcatcgc caccgcttat atggattcca ttccattagt tgcctttcc 300

gggcaggtag cgacctcgtt gataggttac gatgccttc aggagtgcga catggtgggg 360

atctcgcgac cggtggttaa acacagttt ctggttaagc aaacggaaga cattccgcag 420

25 gtgctgaaaa aggccttctg gctggcgga agtggcgcg caggaccagt agtcgttgat 480

ttaccgaaag atattcttaa tccggcgaac aaattaccct atgtctggcc ggagtcggtc 540

agtatgcgtt ctacaatcc cactactacc ggacataaag ggcaaataa gcgtgctctg 600

caaacgctgg tagcggcaaa aaaaccggtt gtctacgtag gcggtggggc aatcacggcg 660

ggctgccatc agcagttgaa agaaacggtg gaggcgttga atctgccctg tgttgctca 720

30 ttgatggggc tggggcggtt tccggcaacg catcgtcagg cactgggcat gctgggaatg 780

cacggtacct acgaagccaa tatgacgatg cataacgcgg atgtgattt gcgcgtcggg 840

gtacgattg atgaccgaac gacgaacaat ctggcaaagt actgccaaa tgccactgtt 900

ctgcatatcg atattgatcc tacttcatt tctaaaaccg tgactgcgga tatcccatt 960

gtgggggatg ctgccagggt cctcgaacaa atgcttgaac tctgtcgcga agaatccgcc 1020

35 catcaaccac tggatgagat ccgcgactgg tggcagcaaa ttgaacagtg gcgcgctcgt 1080

cagtgctga aatatgacac tcacagttaa aagattaaac cgcaggcggg gatcgagact 1140

cttggcgggt tgacgaagg agacgcttac gtgacgtccg atgtcgggca gcaccagatg 1200



ES 2 525 150 T3

ttgctgcac ttattatcc attcgacaaa ccgctgcct ggatcaattc cggggcctc 1260  
 ggcacgatgg gtttggtt acctgcggca ctggcgctca aatggcgtt gccagaagaa 1320  
 accgtggtt gcgtactgg cgacggcagt attcagatga acatccagga actgtctacc 1380  
 gcgttcaat acgagttgcc cgtactggg gtgaatctca ataaccgcta tctggggatg 1440  
 5 gtgaagcagt ggcaggacat gatctattcc ggccgtcatt cacaatcta tatgcaatcg 1500  
 ctaccgatt tcgtccgtc ggcggaagcc tatgggcatg tcgggatcca gatttctcat 1560  
 ccgcatgagc tgaaaagcaa acttagcgag gcgctggaac aggtgcgcaa taatcgctg 1620  
 gtgtttgtg atgtaccgt cgatggcagc gagcacgtct acccgatgca gattcgggg 1680  
 ggcggaatgg atgaaatggt gtaagcaaaa acggagagaaa cctga 1725  
 10  
 <210> 35  
 <211> 492  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli  
 15 <400> 35  
 atgcgccgga tattatcagt cttactcgaa aatgaatcag gcgcttacc cgcgctgatt 60  
 ggccttttt cccagcgtgg ctacaacatt gaaagcctga ccgttgcgc aaccgacgat 120  
 ccgacattat cgcgatgac catccagacc gtggcgcatg aaaaagtact tgagcagatc 180  
 gaaaagcaat tacacaaact ggtcgatgc ttgcgctga gtgagttgg gcagggcgcg 240  
 20 catgttgagc gggaaatcat gctggtgaaa attcaggcca gcggttacgg gcgtgacgaa 300  
 gtgaaacgta atacggaaat attccgtggg caaattatcg atgtcacacc ctgcctttat 360  
 accgttcaat tagcaggcac cagcgtaag ctgtatgcat ttttagcatc gattcgcat 420  
 gtggcgaaaa ttgtggaggt tgctcgtct ggtgtgctc gacttccgc cgccgataaa 480  
 ataatcggt ga 492  
 25  
 <210> 36  
 <211> 2242  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli  
 30 <400> 36  
 gaattcgagg aggcaggcca tggagatggt gtctggagcc gagatggtcg tccgatcgtc 60  
 tatgatcag ggcgttaaac aagtattcgg ttatcccga ggcgcagtc ttgatattta 120  
 tgatgattg catacctgg gtggtattga tcatgtatta gttcgtcatg agcaggcggc 180  
 ggtgcatatg gccgatggcc tggcgcgccc gaccggggaa gtcggcgctg tgctgtaac 240  
 35 gtcgggtcca gggcgacca atgcgattac tggcatcgc accgcttata tggattccat 300  
 tccattagt gtcttccg ggcaggtagc gacctcgtg ataggttacg atgccttca 360  
 ggagtgcgac atggtgggga ttccgcgacc ggtggttaaa cacagtttc tggtaagca 420

ES 2 525 150 T3

aacggaagac attccgcagg tgctgaaaaa ggctttctgg ctggcgcaaa gtggtcgccc 480  
 aggaccagta gtcgttgatt taccgaaaga tattctaat ccggcgaaca aattacccta 540  
 tgtctggccg gagtcggtca gtagcggtc ttacaatccc actactaccg gacataaagg 600  
 gcaaattaag cgtgctctgc aaacgctgt agcggcaaaa aaaccggtg tctacgtagg 660  
 5 cggtggggca atcacggcgg gctgcatca gcagtgaaa gaaacggtg aggcgtgaa 720  
 tctgccgtt gttgctcat tgatggggct gggggcgtt ccggcaacgc atcgtcaggc 780  
 actgggcatg ctgggaatgc acggtaccta cgaagccaat atgacgatgc ataacgcgga 840  
 tgtgatttc gccgtcgggg tacgattga tgaccgaacg acgaacaatc tggcaaagta 900  
 ctgcccnaat gccactgttc tgcatatcga tattgatcct acttcattt ctaaaccgt 960  
 10 gactgcggat atcccgattg tgggggatgc tcgccaggtc ctgcaacaaa tgcttgaact 1020  
 ctgtcgcga gaatccgcc atcaaccact gtagagatc cgcgactgt ggcagcaaat 1080  
 tgaacagtgg cgcgctcgtc agtgctgaa atatgacact cacagtgaag agattaaacc 1140  
 gcaggcggtg atcgagactc ttggcgggt gacgaagga gacgcttacg tgacgtccga 1200  
 tgtcgggag caccagatgt ttgctgact ttattatcca ttcgacaaac cgcgtcgtg 1260  
 15 gatcaattc ggtggcctgc gcacgatggg tttggtta cctgcggcac tgggctcaa 1320  
 aatggcgtg ccagaagaaa ccgtggttg cgtcactggc gacggcagta ttcagatgaa 1380  
 catccaggaa ctgtctaccg cgttgcaata cgagttgcc gtactggtg tgaatcaca 1440  
 taaccgctat ctggggatgg tgaagcagt gcaggacatg atctattccg gccgtcattc 1500  
 acaatctat atgcaatgc taccgattt cgtccgtctg gcggaagcct atgggcatgt 1560  
 20 cgggatccag atttctatc cgcagatgct ggaaagcaaa cttagcgagg cgctggaaca 1620  
 ggtgcgcaat aatgcctgg tttgttga tttaccgtc gatggcagcg agcagctca 1680  
 cccgatgag attcggggg gcggaatgga tgaaatgtg ttaagcaaaa cggagagaac 1740  
 ctgattatgc gccggatatt atcagtctta ctgaaaatg aatcaggcgc gttatcccgc 1800  
 gtgattggcc tttttccca gcgtggctac aacattgaaa gcctgaccgt tgcgcaacc 1860  
 25 gacgatccga cattatcgcg tatgaccatc cagaccgtg gcgatgaaaa agtacttgag 1920  
 cagatcgaag agcaattaca caaactggc gatgtcttc gcgtgagtga gttggggcag 1980  
 ggcgcgatg ttgagcggga aatcatgctg gtgaaaattc agccagcgg ttacgggctg 2040  
 gacgaagtga aacgtaatac ggaatattc cgtgggcaaa ttatcgatgt cacaccctcg 2100  
 cttataccg tcaattagc agccaccagc ggtaagctg atgcatttt agcatcgatt 2160  
 30 cgcgatgtg cgaaaattg ggaggtgct cgctctgtg tggcggact ttcgcgccc 2220  
 gataaaataa tgcgttgaat tc 2242

<210> 37

<211> 38

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 37

gatgaattcg aggaggcagg ccatggagat gttgtctg 38

5 <210> 38

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador sintético

<400> 38

ttgagaattc aacgcattat ttatcgccg c 31

<210> 39

15 <211> 574

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 39

Met Glu Met Leu Ser Gly Ala Glu Met Val Val Arg Ser Leu Ile Asp

20 1 5 10 15

Gln Gly Val Lys Gln Val Phe Gly Tyr Pro Gly Gly Ala Val Leu Asp

20 25 30

25 Ile Tyr Asp Ala Leu His Thr Val Gly Gly Ile Asp His Val Leu Val

35 40 45

Arg His Glu Gln Ala Ala Val His Met Ala Asp Gly Leu Ala Arg Ala

50 55 60

30

Thr Gly Glu Val Gly Val Val Leu Val Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr

65 70 75 80

Asn Ala Ile Thr Gly Ile Ala Thr Ala Tyr Met Asp Ser Ile Pro Leu

35 85 90 95

Val Val Leu Ser Gly Gln Val Ala Thr Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ala

ES 2 525 150 T3

100            105            110  
 Phe Gln Glu Cys Asp Met Val Gly Ile Ser Arg Pro Val Val Lys His  
 115            120            125  
 5  
 Ser Phe Leu Val Lys Gln Thr Glu Asp Ile Pro Gln Val Leu Lys Lys  
 130            135            140  
 Ala Phe Trp Leu Ala Ala Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Val Val Asp  
 10 145            150            155            160  
 Leu Pro Lys Asp Ile Leu Asn Pro Ala Asn Lys Leu Pro Tyr Val Trp  
 165            170            175  
 15 Pro Glu Ser Val Ser Met Arg Ser Tyr Asn Pro Thr Thr Thr Gly His  
 180            185            190  
 Lys Gly Gln Ile Lys Arg Ala Leu Gln Thr Leu Val Ala Ala Lys Lys  
 195            200            205  
 20 Pro Val Val Tyr Val Gly Gly Gly Ala Ile Thr Ala Gly Cys His Gln  
 210            215            220  
 Gln Leu Lys Glu Thr Val Glu Ala Leu Asn Leu Pro Val Val Cys Ser  
 25 225            230            235            240  
 Leu Met Gly Leu Gly Ala Phe Pro Ala Thr His Arg Gln Ala Leu Gly  
 245            250            255  
 30 Met Leu Gly Met His Gly Thr Tyr Glu Ala Asn Met Thr Met His Asn  
 260            265            270  
 Ala Asp Val Ile Phe Ala Val Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Thr Thr  
 275            280            285  
 35 Asn Asn Leu Ala Lys Tyr Cys Pro Asn Ala Thr Val Leu His Ile Asp  
 290            295            300

ES 2 525 150 T3

Ile Asp Pro Thr Ser Ile Ser Lys Thr Val Thr Ala Asp Ile Pro Ile

305            310            315            320

5 Val Gly Asp Ala Arg Gln Val Leu Glu Gln Met Leu Glu Leu Leu Ser

325            330            335

Gln Glu Ser Ala His Gln Pro Leu Asp Glu Ile Arg Asp Trp Trp Gln

340            345            350

10

Gln Ile Glu Gln Trp Arg Ala Arg Gln Cys Leu Lys Tyr Asp Thr His

355            360            365

Ser Glu Lys Ile Lys Pro Gln Ala Val Ile Glu Thr Leu Trp Arg Leu

15    370            375            380

Thr Lys Gly Asp Ala Tyr Val Thr Ser Asp Val Gly Gln His Gln Met

385            390            395            400

20 Phe Ala Ala Leu Tyr Tyr Pro Phe Asp Lys Pro Arg Arg Trp Ile Asn

405            410            415

Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Leu Gly

420            425            430

25

Val Lys Met Ala Leu Pro Glu Glu Thr Val Val Cys Val Thr Gly Asp

435            440            445

Gly Ser Ile Gln Met Asn Ile Gln Glu Leu Ser Thr Ala Leu Gln Tyr

30    450            455            460

Glu Leu Pro Val Leu Val Val Asn Leu Asn Asn Arg Tyr Leu Gly Met

465            470            475            480

35 Val Lys Gln Trp Gln Asp Met Ile Tyr Ser Gly Arg His Ser Gln Ser

485            490            495

ES 2 525 150 T3

Tyr Met Gln Ser Leu Pro Asp Phe Val Arg Leu Ala Glu Ala Tyr Gly

500 505 510

His Val Gly Ile Gln Ile Ser His Pro His Glu Leu Glu Ser Lys Leu

5 515 520 525

Ser Glu Ala Leu Glu Gln Val Arg Asn Asn Arg Leu Val Phe Val Asp

530 535 540

10 Val Thr Val Asp Gly Ser Glu His Val Tyr Pro Met Gln Ile Arg Gly

545 550 555 560

Gly Gly Met Asp Glu Met Trp Leu Ser Lys Thr Glu Arg Thr

565 570

15

<210> 40

<211> 163

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20 <400> 40

Met Arg Arg Ile Leu Ser Val Leu Leu Glu Asn Glu Ser Gly Ala Leu

1 5 10 15

Ser Arg Val Ile Gly Leu Phe Ser Gln Arg Gly Tyr Asn Ile Glu Ser

25 20 25 30

Leu Thr Val Ala Pro Thr Asp Asp Pro Thr Leu Ser Arg Met Thr Ile

35 40 45

30 Gln Thr Val Gly Asp Glu Lys Val Leu Glu Gln Ile Glu Lys Gln Leu

50 55 60

His Lys Leu Val Asp Val Leu Arg Val Ser Glu Leu Gly Gln Gly Ala

65 70 75 80

35

His Val Glu Arg Glu Ile Met Leu Val Lys Ile Gln Ala Ser Gly Tyr

85 90 95

ES 2 525 150 T3

Gly Arg Asp Glu Val Lys Arg Asn Thr Glu Ile Phe Arg Gly Gln Ile  
100 105 110

5 Ile Asp Val Thr Pro Ser Leu Tyr Thr Val Gln Leu Ala Gly Thr Ser  
115 120 125

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

10

Val Glu Val Ala Arg Ser Gly Val Val Gly Leu Ser Arg Gly Asp Lys  
145 150 155 160

Ile Met Arg

15

<210> 41

<211> 163

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 41

Met Arg Arg Ile Leu Ser Val Leu Leu Glu Asn Glu Ser Asp Ala Leu

25 1 5 10 15

Ser Arg Val Ile Gly Leu Phe Ser Gln Arg Gly Tyr Asn Ile Glu Ser  
20 25 30

30 Leu Thr Val Ala Pro Thr Asp Asp Pro Thr Leu Ser Arg Met Thr Ile  
35 40 45

Gln Thr Val Gly Asp Glu Lys Val Leu Glu Gln Ile Glu Lys Gln Leu  
50 55 60

35

His Lys Leu Val Asp Val Leu Arg Val Ser Glu Leu Gly Gln Gly Ala  
65 70 75 80

ES 2 525 150 T3

His Val Glu Arg Glu Ile Met Leu Val Lys Ile Gln Ala Ser Gly Tyr

85 90 95

5 Gly Arg Asp Glu Val Lys Arg Asn Thr Glu Ile Phe Arg Gly Gln Ile

100 105 110

Ile Asp Val Thr Pro Ser Leu Tyr Thr Val Gln Leu Ala Gly Thr Ser

115 120 125

10

Gly Lys Leu Asp Ala Phe Leu Ala Ser Ile Arg Asp Val Ala Lys Ile

130 135 140

Val Glu Val Ala Arg Ser Gly Val Val Gly Leu Ser Arg Gly Asp Lys

15 145 150 155 160

Ile Met Arg

20 <210> 42

<211> 1058

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 42

25 gacgtccgat gtcgggcagc accagatgtt tgctgcactt tattatccat tcgacaaacc 60

gcgtcgctgg atcaattccg gtggcctcgg cacgatgggt ttggtttac ctgcggcact 120

gggctcaaaa atggcgtgca cagaagaaac cgtggttgca gtcactggcg acggcagtat 180

tcagatgaac atccaggaac tgtctaccgc gttgcaatac gagttgcccg tactgtgtgt 240

gaatctcaat aaccgtatc tgggatggt gaagcagtg caggacatga tctattccgg 300

30 ccgtcattca caatctata tgcaatcgc acccgattc gtccgtctgg cggaagccta 360

tgggcatgca gggatccaga ttctcatcc gcatgagctg gaaagcaaac ttagcgaggc 420

gctggaacag gtgcgcaata atgcctggt gttgtgtgat gttaccgtcg atggcagcga 480

gcacgtctac ccgatgcaga ttcgcggggg cggaatggat gaaatgtggt taagcaaaac 540

ggagagaacc tgattatgca ccggatatta tcagtcttac tcgaaaatga atcagacgcg 600

35 ttatcccgcg tgattggcct ttttcccag cgtggctaca acattgaaag cctgaccgtt 660

gcgccaaccg acgatccgac atatcgcgta tgaccatcca gaccgtgggc gatgaaaaag 720

tacttgagca gatcgaaaag caattacaca aactggcga tgtcttgcgc gtgagtgagt 780



ES 2 525 150 T3

tggggcaggg cgcgcatggt gagcgggaaa tcatgctggt gaaaattcag gccagcggtt 840  
 acgggctgga cgaagtgaaa cgtaatacgg aaatattccg tgggcaaatt atcgatgca 900  
 caccctcgct ttataccgtt caattagcag gcaccagcgg taagcttgat gcattttag 960  
 catcgattcg cgatgtggcg aaaattgtgg aggttgctcg ctctggtgtg gtcggacttt 1020  
 5 cgcgcggcga taaataatg cgtgaattc gatctaga 1058  
  
 <210> 43  
 <211> 1058  
 <212> ADN  
 10 <213> Escherichia coli  
 <400> 43  
 gacgtccgat gtcgggcagc accagatggt tgctgcactt tattatccat tcgacaaacc 60  
 gcgtcgtgga atcaattccg gtggcctcgg cacgatgggt ttggtttac ctgcggcact 120  
 gggcgtcaaa atggcgtgca cagaagaaac cgtggttgca gtcactggcg acggcagtat 180  
 15 tcagatgaac atccaggaac tgtctaccgc gttgcaatac gagttgcccg tactggtggt 240  
 gaatcctaat aaccgctatc tggggatggt gaagcagtgga caggacatga tctattccgg 300  
 ccgtcatcca caatcttata tgcaatcgct acccgatttc gtccgtctgg cggaagccta 360  
 tgggcatgca gggatccaga ttctcatcc gcatgagctg gaaagcaaac ttagcgaggc 420  
 gctggaacag gtgcgcaata atcgcctggt gttgttgat gttaccgtcg atggcagcga 480  
 20 gcacgtctac ccatgacaga ttcgcggggg cggaatggat gaaatgtggt taagcaaaac 540  
 ggagagaacc tgattatgca ccggatatta tcagtcttac tcgaaaatga atcaggcgcg 600  
 ttatcccgcg tgattggcct ttttcccag cgtggctaca acattgaaag cctgaccggt 660  
 gcgccaaccg acgatccgac atatcgcgta tgaccatcca gaccgtgggc gatgaaaaag 720  
 tacttgagca gatgaaaaag caattacaca aactggtcga tgtctgccc gtagtgagat 780  
 25 tggggcaggg cgcgcatggt gagcgggaaa tcatgctggt gaaaattcag gccagcggtt 840  
 acgggctgga cgaagtgaaa cgtaatacgg aaatattccg tgggcaaatt atcgatgca 900  
 caccctcgct ttataccgtt caattagcag gcaccagcgg taagcttgat gcattttag 960  
 catcgattcg cgatgtggcg aaaattgtgg aggttgctcg ctctggtgtg gtcggacttt 1020  
 cgcgcggcga taaataatg cgtgaattc gatctaga 1058  
 30  
 <210> 44  
 <211> 1647  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli  
 35 <400> 44  
 atgaatggcg cacagtgggt ggtacatgca ttgcgggcac aggggtgtgaa caccgtttc 60  
 ggttatccgg gtggcgcaat tatgccggtt tacgatgcat tgatgacgg cggcgtggag 120

ES 2 525 150 T3

cacttgctat gccgacatga gcagggctgc gcaatggcgg ctatcggta tgctcgtgct 180  
 accggcaaaa ctggcgtatg tatcgccacg tctgggccgg gcgcaaccaa cctgataacc 240  
 gggctgctgc acgcactgtt agattccatc cctgtgttg ccatcaccgg tcaagtgtcc 300  
 gcaccgttta tcggcactga cgcatttcag gaagtggatg tctcgggatt gtcgttagcc 360  
 5 tgtaccaagc acagctttct ggtgcagtcg ctggaagagt tgccgcgcat catggctgaa 420  
 gcattcgacg ttgcctgctc aggtcgtcct ggtccggttc tggtcgatat cccaaaagat 480  
 atccagttag ccagcggatg cctggaaccg tggttcacca ccgttgaaaa cgaagtgact 540  
 ttcccacatg ccgaagtga gcaagcgcgc cagatgctgg caaaagcgcg aaaaccgatg 600  
 ctgtacgttg gcggtgccgt gggatggcgc caggcagttc cggctttgcg tgaatttctc 660  
 10 gctgccacaa aaatgcctgc cacctgtacg ctgaaagggc tgggcgcagt agaagcagat 720  
 tatccgtact atctgggcat gctgggaatg catggcacca aagcggcgaa ctctcgggtg 780  
 caggagtgcg acttctgat cgcctgggtt gcacgtttg atgaccgggt gaccggcaaa 840  
 ctgaacacct tcgaccaca cgcctgtgtt atccatattg atatcgacc gccagaaatg 900  
 aacaagctgc gtcaggcaca tgtggcatta caagtgatt taaatgctct gttaccagca 960  
 15 ttacagcagc cgtaaaatat caatgactgg cagctacact gcgcgcagct gcgtgatgaa 1020  
 catgcctggc gttacgacca tcccgtgac gctatctacg cgccgttgtt gtaaaacaa 1080  
 ctgtcagatc gtaaaccctg ggattgcctc gtgaccacag atgtggggca gcaccagatg 1140  
 tgggctgcgc agcacatcgc ccacactcgc ccggaaaatt tcatcacctc cagcggctta 1200  
 ggcacatgg gtttggtt accggcggcg gttggcgcgc aagtcgcgcg accaaacgat 1260  
 20 accgtcgtct tctatcccg tgacggctct tcatgatga atgtgcaaga gctgggcacc 1320  
 gtaaaacgca agcagttacc gttgaaaatc gtcttactcg ataaccaacg gttagggatg 1380  
 gttcgacaat ggcagcaact gttttccag gaacgatata gcgaaaccac ccttaccgat 1440  
 aaccccgatt tctcatgtt agccagcgc ttcggcatcc ctggccaaca catcacccgt 1500  
 aaagaccagg ttgaagcggc actogacacc atgctgaaca gtgatgggcc atacctgctt 1560  
 25 catgtctcaa tcgacgaact tgagaacgtc tggccgctgg tgccgcctgg tgccagtaat 1620  
 tcagaaatgt tggagaaatt atcatga 1647

<210> 45

<211> 261

30 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 45

atgcaacatc aggtcaatgt atcagctcgc ttcaatccgg aaaccttaga acgtgtttta 60  
 cgcgtgggtc gtcacgtggt tttccacgtc tgctcaatga atatggccgc cgcacagcat 120  
 35 gcacaaaata taaatatcga attgaccgtt gccagccac ggtcggctga cttactgttt 180  
 agtcagttaa ataaactggt ggacgtcgc cacgttgcca tctgccagag cacaaccaca 240  
 tcacaacaaa tccgcgctg a 261

# ES 2 525 150 T3

<210> 46

<211> 1938

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 46

```

gcggccgcag gacggggaac taactatgaa tggcgcacag tgggtggtac atgcggtgcg    60
ggcacagggg gtgaacaccg ttttcgggta tccgggtggc gcaattatgc cggtttacga    120
tgcattgtat gacggcgggc tggagcactt gctatgccga catgagcagg gtgcggcaat    180
10  ggcggctatc ggttatgctc gtgctaccgg caaaactggc gtatgtatcg ccacgtctgg    240
tccgggcgca accaacctga taaccgggct tgcggacgca ctgtagatt ccatccctgt    300
tgttgccatc accggtaag tgtccgacc gttatcggc actgacgcat ttcaggaagt    360
ggatgtcctg ggattgctg tagcctgtac caagcacagc tttctggtgc agtcgctgga    420
agagttgccg cgcatcatgg ctgaagcatt cgacgttgcc tgctcaggtc gtcctggtcc    480
15  ggttctggtc gatatccaa aagatatcca gttagccagc ggtgacctgg aaccgtggtt    540
caccaccggt gaaaacgaag tgactttccc acatgccgaa gttgagcaag cgcgccagat    600
gctggcaaaa gcgcaaaaac cgatgctgta cgttggcggg ggcgtgggta tggcgaggc    660
agtccggctc ttgcgtgaat ttctcgctgc cacaaaaatg cctgccacct gtacgctgaa    720
agggctgggc gcagtagaag cagattatcc gtactatctg ggcatgctgg gaatcatgg    780
20  caccaaagcg gcgaacttcg cgggtcagga gtgcgacttg ctgatgccg tgggtgcacg    840
tttggatgac cgggtgaccg gcaaactgaa caccttcgca ccacacgcca gtgttatcca    900
tatggatata gaccggcag aatgaacaa gctgcgtcag gcacatgtgg cattacaagg    960
tgatttaaat gctctgttac cagcattaca gcagccgta aatatcaatg actggcagct   1020
acactgocg cagctgcgtg atgaacatgc ctggcgttac gaccatcccg gtgacgctat   1080
25  ctacgcgccg ttgtgttaa aacaactgtc agatcgtaaa cctgcggatt gcgctgtgac   1140
cacagatgtg gggcagcacc agatgtgggc tgcgcagcac atcggccaca ctgcccggga   1200
aaatttcac acctccagcg gcttaggcac catgggtttt ggtttaccgg cggcggttgg   1260
cgcgcaagtc gcgcgaccaa acgataccgt cgtctgtatc tccggtgacg gctctttcat   1320
gatgaatgtg caagagctgg gcaccgtaaa acgcaagcag ttaccgttga aaatcgtctt   1380
30  actcgataac caacggttag ggatggttcg acaatggcag caactgtttt tccaggaacg   1440
atatagcгаа accaccctta ccgataacc cgaattcctc atgttagcca gcgccttcgg   1500
catccctggc caacacatca cccgtaaaga ccaggttgaa gggcactcg acaccatgct   1560
gaacagtgat gggccatacc tgcttatgtg ctcaatcgac gaactgaga acgtctggcc   1620
gctggtgccg cctggtgcca gtaatcaga aatgttgag aaattatcat gatgcaacat   1680
35  caggtaaatg taccagctcg ctcaatccg gaaaccttag aacgtgtttt acgctgggtg   1740
cgtcatctg gttccacgt ctgctcaatg aatatggccg ccgcccagca tgcacaaaat   1800
ataaatatcg aattgacctg tccagccca cggctcgtcg acttactgtt tagtcagtta   1860

```

ES 2 525 150 T3

aataaactgg tggacgtcgc acacgtgcc atctgccaga gcacaaccac atcacaacaa 1920  
atccgcgcct gagaattc 1938

<210> 47

5 <211> 548

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 47

Met Asn Gly Ala Gln Trp Val Val His Ala Leu Arg Ala Gln Gly Val

10 1 5 10 15

Asn Thr Val Phe Gly Tyr Pro Gly Gly Ala Ile Met Pro Val Tyr Asp

20 25 30

15 Ala Leu Tyr Asp Gly Gly Val Glu His Leu Leu Cys Arg His Glu Gln

35 40 45

Gly Ala Ala Met Ala Ala Ile Gly Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Thr

50 55 60

20

Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Ile Thr

65 70 75 80

Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Ile Pro Val Val Ala Ile Thr

25 85 90 95

Gly Gln Val Ser Ala Pro Phe Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Val

100 105 110

30 Asp Val Leu Gly Leu Ser Leu Ala Cys Thr Lys His Ser Phe Leu Val

115 120 125

Gln Ser Leu Glu Glu Leu Pro Arg Ile Met Ala Glu Ala Phe Asp Val

130 135 140

35

Ala Cys Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp

145 150 155 160

ES 2 525 150 T3

Ile Gln Leu Ala Ser Gly Asp Leu Glu Pro Trp Phe Thr Thr Val Glu  
165 170 175

5 Asn Glu Val Thr Phe Pro His Ala Glu Val Glu Gln Ala Arg Gln Met  
180 185 190

Leu Ala Lys Ala Gln Lys Pro Met Leu Tyr Val Gly Gly Gly Val Gly  
195 200 205

10

Met Ala Gln Ala Val Pro Ala Leu Arg Glu Phe Leu Ala Ala Thr Lys  
210 215 220

15 Met Pro Ala Thr Cys Thr Leu Lys Gly Leu Gly Ala Val Glu Ala Asp  
225 230 235 240

Tyr Pro Tyr Tyr Leu Gly Met Leu Gly Met His Gly Thr Lys Ala Ala  
245 250 255

20 Asn Phe Ala Val Gln Glu Cys Asp Leu Leu Ile Ala Val Gly Ala Arg  
260 265 270

Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Asn Thr Phe Ala Pro His Ala  
275 280 285

25

Ser Val Ile His Met Asp Ile Asp Pro Ala Glu Met Asn Lys Leu Arg  
290 295 300

30 Gln Ala His Val Ala Leu Gln Gly Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala  
305 310 315 320

Leu Gln Gln Pro Leu Asn Ile Asn Asp Trp Gln Leu His Cys Ala Gln  
325 330 335

35 Leu Arg Asp Glu His Ala Trp Arg Tyr Asp His Pro Gly Asp Ala Ile  
340 345 350

ES 2 525 150 T3

Tyr Ala Pro Leu Leu Leu Lys Gln Leu Ser Asp Arg Lys Pro Ala Asp  
355 360 365

5 Cys Val Val Thr Thr Asp Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln  
370 375 380

His Ile Ala His Thr Arg Pro Glu Asn Phe Ile Thr Ser Ser Gly Leu  
385 390 395 400

10 Gly Thr Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Val Gly Ala Gln Val Ala  
405 410 415

Arg Pro Asn Asp Thr Val Val Cys Ile Ser Gly Asp Gly Ser Phe Met  
420 425 430

15 Met Asn Val Gln Glu Leu Gly Thr Val Lys Arg Lys Gln Leu Pro Leu  
435 440 445

20 Lys Ile Val Leu Leu Asp Asn Gln Arg Leu Gly Met Val Arg Gln Trp  
450 455 460

Gln Gln Leu Phe Phe Gln Glu Arg Tyr Ser Glu Thr Thr Leu Thr Asp  
465 470 475 480

25 Asn Pro Asp Phe Leu Met Leu Ala Ser Ala Phe Gly Ile Pro Gly Gln  
485 490 495

His Ile Thr Arg Lys Asp Gln Val Glu Ala Ala Leu Asp Thr Met Leu  
500 505 510

30 Asn Ser Asp Gly Pro Tyr Leu Leu His Val Ser Ile Asp Glu Leu Glu  
515 520 525

35 Asn Val Trp Pro Leu Val Pro Pro Gly Ala Ser Asn Ser Glu Met Leu  
530 535 540

Glu Lys Leu Ser

ES 2 525 150 T3

545

<210> 48

<211> 87

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 48

Met Met Gln His Gln Val Asn Val Ser Ala Arg Phe Asn Pro Glu Thr

1 5 10 15

10

Leu Glu Arg Val Leu Arg Val Val Arg His Arg Gly Phe His Val Cys

20 25 30

Ser Met Asn Met Ala Ala Ala Ser Asp Ala Gln Asn Ile Asn Ile Glu

15 35 40 45

Leu Thr Val Ala Ser Pro Arg Ser Val Asp Leu Leu Phe Ser Gln Leu

50 55 60

20 Asn Lys Leu Val Asp Val Ala His Val Ala Ile Cys Gln Ser Thr Thr

65 70 75 80

Thr Ser Gln Gln Ile Arg Ala

85

25

<210> 49

<211> 1725

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

30 <400> 49

atggggacta atgtacaggt ggattcagca tctgccgaat gtacacagac gatgagcgga 60

gcattaatgc tgattgaatc attaaaaaaa gagaaagtag aatgatctt cggttatccg 120

ggcggggctg tgctccgat ttacgataag ctatacaatt cagggttggt acatatacctt 180

ccccgtcacg aacaaggagc aatcatgca gcggagggat acgcaagggt ctccggaaaa 240

35 ccgggtgtcg tcattgccac gtcagggccg ggagcgacaa acctgttac aggccttgct 300

gatgcatga ttgattcatt gccgttagtc gtcttacag ggcaggtagc aacctctgta 360

atcgggagcg atgcattca ggaagcagac attttagga ttacgatgcc agtaacaaaa 420

ES 2 525 150 T3

cacagctacc aggttcgcca gccggaagat ctgccgca tcattaaaga agcgttccat 480  
 attgaacaa ctggaagacc cggacctgta ttgattgata ttccgaaaga ttagcaaca 540  
 attgaaggag aattcagcta cgatcatgag atgaatcctc cgggatacca gccgacaaca 600  
 gagccgaatt atttgcagat ccgaagctt gtggaagccg tgagcagtgc gaaaaaaccc 660  
 5 gtgatcctgg cgggtgcggg cgtactgcac ggaaaagcgt cagaagaatt aaaaaattat 720  
 gctgaacagc agcaaatccc tgtggcacac acccttttgg ggctcggagg cttcccgct 780  
 gaccatccgc ttttctagg gatggcggga atgcacggta cttatacagc caatatggcc 840  
 cttcatgaat gtgatctatt aatcagtatc ggcgcccgtt ttgatgaccg tgtcacagga 900  
 aacctgaaac actttgccag aaacgcaaag atagcccaca tcgatattga tccagctgaa 960  
 10 atcggaaaaa tcatgaaaac acagattcct gtagtcggag acagcaaat tgcctgcag 1020  
 gagctgatca aacaagacgg caaacaagc gattcaagcg aatggaaaa acagctcgca 1080  
 gaatgaaag aagagtatcc gctctggtat gtagataatg aagaagaagg ttttaacct 1140  
 cagaaattga ttgaatata tcatcaattt acaaaaggag aggccattgt cgcaacggat 1200  
 gtaggccagc atcaaatgtg gtcagcgcaa tttatccgt tcaaaaagc agataaatgg 1260  
 15 gtcacgtcag cgggacttgg aacgatggga ttcggtctc cggcggcgat cggcgcacag 1320  
 ctggccgaaa aagatgctac tgtgtcgcg gttgtcggag acggcggatt ccaaatgacg 1380  
 cttcaagaac tcgatgttat tcggaatta aatcttccgg tcaaggtagt gattttaa 1440  
 aacgctgtc tcggaatgtt cagacagtgg caggaaattt tctatgaaga acgttattca 1500  
 gaatctaat tcgcttca gcctgacttc gtcaaattgt ccgaagcata cggcattaaa 1560  
 20 ggcatcagaa tttcatcaga agcgggaagca aaggaaaagc tggaagaggc attaatca 1620  
 agagaacctg ttgcattga cgtgcgggtt gccagcgaag aaaaagtatt cccgatggtg 1680  
 gctccgggga aagggtgca tgaatggtg ggggtgaaac ctga 1725  
  
 <210> 50  
 25 <211> 519  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus subtilis  
 <400> 50  
 ttgaaaagaa ttatcacatt gactgtggtg aaccgctccg ggggtgtaaa ccggtacc 60  
 30 ggtctattca caaaaaggca ttacaacatt gaaagcatta cagttggaca cacagaaaca 120  
 gccggcgttt ccagaatcac ctctcgtt catgttgaag gtgaaaatga tttgaacag 180  
 ttaacgaaac agctcaaca acagattgat gtgctgaaag tcacagacat cacaatcaa 240  
 tcgattgtcc agagggagct gcccttaac aaggtgtct ccgcacctc aacaagaaca 300  
 gagattaatg gaatcataga accgtttaga gcctctgtc ttgatgtcag cagagacagc 360  
 35 atcgtgttc aggtgacag tgaatctaac aaaattgaag cgctattga gttataaaa 420  
 ccttatggca ttaaagaaat cgcgagaaca ggtacaacgg cttttcgag ggaaccag 480  
 caaaggcgt catccaataa acaatatct attgataa 519



ES 2 525 150 T3

<210> 51

<211> 2270

<212> ADN

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 51

gcggccgcaa aaggaggaac taaaatggg actaatgtac aggtggattc agcatctgcc 60  
 gaatgtacac agacgatgag cggagcatta atgctgattg aatcattaaa aaaagagaaa 120  
 gtagaaatga tcttcggtta tccgggagg gctgtgcttc cgatttacga taagctatac 180  
 10 aatcagggtg tggtagatata ccttccccgt cacgaacaag gagcaattca tgcagcggag 240  
 ggatagcga gggctcccg aaaaccgggt gtcgtcattg ccacgtcagg gccgggagcg 300  
 aaaaaccttg ttacaggcct tgctgatgcc atgattgatt cattgccgtt agtcgtcttt 360  
 acagggcagg tagcaacctc tgtaatcggg agcgatgcat ttcaggaagc agacatttta 420  
 gggattacga tgccagtaac aaaacacagc taccagggtc gccagccgga agatctgccg 480  
 15 cgcatacatta aagaagcgtt ccatattgca acaactggaa gaccgggacc tgtattgatt 540  
 gatattccga aagatgtagc aacaattgaa ggagagtca gctacgatca tgagatgaat 600  
 ctccccggat accagccgac aacagagccg aattatttgc agatccgcaa gcttgtggaa 660  
 gccgtgagca gtgcgaaaaa accggtgatc ctggcgggtg cgggcgtact gcacggaaaa 720  
 gcgtcagaag aattaaanaa ttatgtgaa cagcagcaaa tccctgtggc acacaccctt 780  
 20 ttggggctcg gaggctccc ggctgacat ccgctttcc tagggatggc gggaatgcac 840  
 ggtacttata cagccaatat ggccctcat gaatgtgatc tattaatcag tatcggcgcc 900  
 cgtttgatg accgtgtcac aggaaacctg aaacacttg ccagaaacgc aaagatagcc 960  
 cacatcgata ttgatccagc tgaaatcggg aaaatcatga aaacacagat tctgtagtc 1020  
 ggagacagca aaattgtcct gcaggagctg atcaaaacag acggcaaaca aagcgattca 1080  
 25 agcgaatgga aaaaacagct cgcagaatgg aaagaagagt atccgctctg gtatgtagat 1140  
 aatgaagaag aaggttttaa acctcagaaa ttgattgaat atattcatca attacaaaa 1200  
 ggagaggcca ttgtcgcaac ggatgtaggc cagcatcaaa tgggtcagc gcaattttat 1260  
 ccgttcaaaa aagcagataa atgggtcacg tcaggcggac ttggaacgat gggattcggg 1320  
 ctccggcggc cgatcggcgc acagctggcc gaaaaagatg ctactgtgtg cgcggtgtc 1380  
 30 ggagacggcg gattccaaat gacgctcaa gaactcgatg ttattcgca attaaatctt 1440  
 ccggtcaagg tagtgatttt aaataacgct tgtctcggaa tggcagaca gtggcaggaa 1500  
 atttctatg aagaacgta ttcagaatct aaattogctt ctcagcctga cttcgtcaaa 1560  
 ttgtccgaag catacggcat taaaggcatc agaattcat cagaagcggg agcaaaggaa 1620  
 aagctggaag aggcattaac atcaagagaa cctgtgtca ttgacgtgcg ggttccagc 1680  
 35 gaagaaaaag tattcccgat ggtggctccg gggaaagggc tgcataaat ggtgggggtg 1740  
 aaacctgaa aagaattatc acattgactg tggtaaccg ctccgggggtg taaaccgga 1800  
 tcaccggtct attcaaaaa aggcattaca acattgaaag cattacagtt ggacacacag 1860

ES 2 525 150 T3

aaacagccgg cgftccaga atcacctcg tcgtcatgt tgaagtgaa aatgatgtg 1920  
 aacagtaac gaaacagctc aacaaacaga ttgatgtgct gaaagtcaca gacatcaca 1980  
 atcaatcgat tgtccagagg gagctggcct taatcaaggt tgtctccgca cctcaaca 2040  
 gaacagagat taatggaatc atagaaccgt ttagagcctc tgtcgtgat gtcagcagag 2100  
 5 acagcatcgt tgttcaggtg acaggtgaat ctaacaaaat tgaagcgctt attgagttat 2160  
 taaaacctta tggcattaaa gaaatcgca gaacaggtac aacggcttt gcgaggggaa 2220  
 cccagcaaaa ggcgtcatcc aataaaacaa tatctattgt ataagaattc 2270

<210> 52

10 <211> 574

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 52

Met Gly Thr Asn Val Gln Val Asp Ser Ala Ser Ala Glu Cys Thr Gln

15 1 5 10 15

Thr Met Ser Gly Ala Leu Met Leu Ile Glu Ser Leu Lys Lys Glu Lys

20 25 30

20 Val Glu Met Ile Phe Gly Tyr Pro Gly Gly Ala Val Leu Pro Ile Tyr

35 40 45

Asp Lys Leu Tyr Asn Ser Gly Leu Val His Ile Leu Pro Arg His Glu

50 55 60

25

Gln Gly Ala Ile His Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Val Ser Gly Lys

65 70 75 80

Pro Gly Val Val Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val

30 85 90 95

Thr Gly Leu Ala Asp Ala Met Ile Asp Ser Leu Pro Leu Val Val Phe

100 105 110

35 Thr Gly Gln Val Ala Thr Ser Val Ile Gly Ser Asp Ala Phe Gln Glu

115 120 125

ES 2 525 150 T3

Ala Asp Ile Leu Gly Ile Thr Met Pro Val Thr Lys His Ser Tyr Gln

130 135 140

Val Arg Gln Pro Glu Asp Leu Pro Arg Ile Ile Lys Glu Ala Phe His

5 145 150 155 160

Ile Ala Thr Thr Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile Pro Lys

165 170 175

10 Asp Val Ala Thr Ile Glu Gly Glu Phe Ser Tyr Asp His Glu Met Asn

180 185 190

Leu Pro Gly Tyr Gln Pro Thr Thr Glu Pro Asn Tyr Leu Gln Ile Arg

195 200 205

15

Lys Leu Val Glu Ala Val Ser Ser Ala Lys Lys Pro Val Ile Leu Ala

210 215 220

Gly Ala Gly Val Leu His Gly Lys Ala Ser Glu Glu Leu Lys Asn Tyr

20 225 230 235 240

Ala Glu Gln Gln Gln Ile Pro Val Ala His Thr Leu Leu Gly Leu Gly

245 250 255

25 Gly Phe Pro Ala Asp His Pro Leu Phe Leu Gly Met Ala Gly Met His

260 265 270

Gly Thr Tyr Thr Ala Asn Met Ala Leu His Glu Cys Asp Leu Leu Ile

275 280 285

30

Ser Ile Gly Ala Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Asn Leu Lys His

290 295 300

Phe Ala Arg Asn Ala Lys Ile Ala His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu

35 305 310 315 320

Ile Gly Lys Ile Met Lys Thr Gln Ile Pro Val Val Gly Asp Ser Lys

ES 2 525 150 T3

325 330 335  
Ile Val Leu Gln Glu Leu Ile Lys Gln Asp Gly Lys Gln Ser Asp Ser  
340 345 350  
5  
Ser Glu Trp Lys Lys Gln Leu Ala Glu Trp Lys Glu Glu Tyr Pro Leu  
355 360 365  
Trp Tyr Val Asp Asn Glu Glu Glu Gly Phe Lys Pro Gln Lys Leu Ile  
10 370 375 380  
Glu Tyr Ile His Gln Phe Thr Lys Gly Glu Ala Ile Val Ala Thr Asp  
385 390 395 400  
15 Val Gly Gln His Gln Met Trp Ser Ala Gln Phe Tyr Pro Phe Gln Lys  
405 410 415  
Ala Asp Lys Trp Val Thr Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Phe Gly  
420 425 430  
20  
Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Gln Leu Ala Glu Lys Asp Ala Thr Val  
435 440 445  
Val Ala Val Val Gly Asp Gly Gly Phe Gln Met Thr Leu Gln Glu Leu  
25 450 455 460  
Asp Val Ile Arg Glu Leu Asn Leu Pro Val Lys Val Val Ile Leu Asn  
465 470 475 480  
30 Asn Ala Cys Leu Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Glu Ile Phe Tyr Glu  
485 490 495  
Glu Arg Tyr Ser Glu Ser Lys Phe Ala Ser Gln Pro Asp Phe Val Lys  
500 505 510  
35  
Leu Ser Glu Ala Tyr Gly Ile Lys Gly Ile Arg Ile Ser Ser Glu Ala  
515 520 525

Glu Ala Lys Glu Lys Leu Glu Glu Ala Leu Thr Ser Arg Glu Pro Val  
530 535 540

5 Val Ile Asp Val Arg Val Ala Ser Glu Glu Lys Val Phe Pro Met Val  
545 550 555 560

Ala Pro Gly Lys Gly Leu His Glu Met Val Gly Val Lys Pro  
565 570

10

<210> 53  
<211> 172  
<212> PRT  
<213> Bacillus subtilis

15

<400> 53  
Met Lys Arg Ile Ile Thr Leu Thr Val Val Asn Arg Ser Gly Val Leu  
1 5 10 15

20

Asn Arg Ile Thr Gly Leu Phe Thr Lys Arg His Tyr Asn Ile Glu Ser  
20 25 30

Ile Thr Val Gly His Thr Glu Thr Ala Gly Val Ser Arg Ile Thr Phe  
35 40 45

25

Val Val His Val Glu Gly Glu Asn Asp Val Glu Gln Leu Thr Lys Gln  
50 55 60

Leu Asn Lys Gln Ile Asp Val Leu Lys Val Thr Asp Ile Thr Asn Gln  
65 70 75 80

30

Ser Ile Val Gln Arg Glu Leu Ala Leu Ile Lys Val Val Ser Ala Pro  
85 90 95

35

Ser Thr Arg Thr Glu Ile Asn Gly Ile Ile Glu Pro Phe Arg Ala Ser  
100 105 110

Val Val Asp Val Ser Arg Asp Ser Ile Val Val Gln Val Thr Gly Glu

ES 2 525 150 T3

115            120            125  
 Ser Asn Lys Ile Glu Ala Leu Ile Glu Leu Leu Lys Pro Tyr Gly Ile  
 130            135            140  
 5  
 Lys Glu Ile Ala Arg Thr Gly Thr Thr Ala Phe Ala Arg Gly Thr Gln  
 145            150            155            160  
 Gln Lys Ala Ser Ser Asn Lys Thr Ile Ser Ile Val  
 10            165            170  
 <210> 54  
 <211> 2393  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Nucleótido sintético  
 <400> 54  
 atgcataatg tgctgtcaa atggacgaag cagggattct gcaaacccta tgctactccg    60  
 20 tcaagccgtc aattgtctga ttggtacca attatgacaa ctgacggct acatcattca    120  
 cttttcttc acaaccggca cggaaactgc tcgggctggc cccggtgcat ttttaaata    180  
 cccgcgagaa atagagtga tcgtcaaac caacattgcg accgacggtg gcgataggca    240  
 tccgggtggt gtcmetaaag agcttcgct ggctgatacg ttgtcctcg cgccagctta    300  
 agacgcta at cctaactgc tggggmetaa gatgtgacag acgcgacggc gacaagmetaa    360  
 25 catgctgtgc gacgctggcg atatacaaat tgctgtctgc caggtgatcg ctgatgtact    420  
 gacaagcctc gcgtaccgca ttatccatcg gtggatggag cgactcgta atcgcttcca    480  
 tgcgccgag taacaattgc tcaagcagat ttatcgccag cagctccgaa tagcgcctt    540  
 ccccttgccc ggcgttaatg atttgccaa acaggtcgt gaaatcggc tgggtgcctt    600  
 catccgggcg aaagaacccc gtattggcaa atattgacgg ccagttaagc cattcatgcc    660  
 30 agtaggcgcg cggacgaaag taaaccact ggtgatacca ttcgagacc tccgatgac    720  
 gaccgtagtg atgaatctc cctggcggga acagmetaa atcaccggc cgmetaa    780  
 attctctcc ctgattttc accaccctt gaccgcaat ggtgagattg agaatatac    840  
 ctttcattcc cagcggctcg tcgatametaa aatcgagata accgttgcc tcaatcggcg    900  
 ttaaacccgc caccagatgg gcatmetaa agtatccgg cagcagggga tcattttgcg    960  
 35 cttcagccat actttcata ctccgcca tcaagmetaa aaccaattgt ccatattgca    1020  
 tcagacattg ccgtactgc gtctttact ggctctctc gtaacmetaa ccgtaacc    1080  
 cgcttataa aagcattctg taacaagcg ggacmetaa catgacmetaa acgcgtaaca    1140

## ES 2 525 150 T3

aaagtgtcta taatcacggc agaaaagtcc acattgatta ttgcacggc gtcacacttt 1200  
gctatgccat agcattttta tccataagat tagcggatcc tacctgacgc ttttatcgc 1260  
aactctctac tgtttctcca taccggttt ttgggctaac aggaggaatt aacctgggg 1320  
ggttctcatc atcatcatca tcatggtatg gctagcatga ctggtggaca gcaaattggg 1380  
5 cgggatctgt acgacgatga cgataaggat cgatggggat ccgagctcga gatgaaagct 1440  
ggaatactgt gtgttgacg ttacattcct gagaaggttt taacaaatca tgatctttaa 1500  
aaaatgggtg aaactctga cgagtggatt cgtacaagaa caggaataga agaaagaaga 1560  
atcgacgag atgatgtgtt ttcatcacat atggctgtg cagcagcga aaatgcgctg 1620  
gaacaagctg aagtggctgc tgaggatctg gatatgatct tgggtgcaac tgttacacct 1680  
10 gatcagtcat tccctacggt ctctgtatg attcaagaac aactcggcgc gaagaaagcg 1740  
tgtgctatgg atatcagcgc ggctgtgctg ggcttcatgt acgggggtgt aaccggtaaa 1800  
caattattg aatccggaac ctacaagcat gttctagtgt ttggtgtaga gaagctctca 1860  
agcattaccg actggaaga cgcaataca gccgttctgt ttgagacgg agcaggcgct 1920  
gcggtatgctg ggccagttag tgatgacaga ggaatccttt catttgaact aggagccgac 1980  
15 ggcacaggcg gtcagcactt gtatctgaat gaaaaacgac atacaatcat gaatggacga 2040  
gaagtttca aattgacgt ccgcaaatg ggagaatcat gcgtaaatgt cattgaaaaa 2100  
gccggacttt caaaagagga tgtcgcattt ttgattccgc atcaggcga catccgtatc 2160  
atggaagctg ctcgcgagcg tttagagctt cctgtcgaaa agatgtctaa aactgttcat 2220  
aaatatgaa atactctgc cgcattcatt ccgatctctc ttgtagaaga attggaagcc 2280  
20 ggtaaaatca aagacggcga tgtggtcgtt atggtagggt tcggcggagg actaacatgg 2340  
ggcgccattg caatccgctg gggccgataa aaaaagggtga ggtgcacaca aga 2393

<210> 55

<211> 48

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 55

30 cgtattttca ttgcagcgc tatgcataat gtgcctgtca aatggacg 48

<210> 56

<211> 51

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

ES 2 525 150 T3

<400> 56

atttgatgcc tctagcacgc gttctgtgt gcacctcacc tttttatc g 51

<210> 57

5 <211> 1209

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

10 <400> 57

tcatgatggg gcgcatttt gataccacgc tgcgtgacgg tgaacagacg ccgggcgta 60

gcctgacgcc gaacgataaa ctgaaattg ccaaaaaact ggatgaactg ggcgtgacg 120

tcatcgaagc cggtagcgca gtgacctta aaggcgaacg cgaaggattt aaactgatca 180

cгааагаagg cctgaatgcc gaaattgct ctttcgttcg tgcactgccg gtcgatattg 240

15 acgcgccct ggaatgtgat gttgacacgc tccatctggt ggttccgacc tctccgatcc 300

acatgaaata taaactcgt aaaaccgaag atgaagtgt ggttacggct ctgaaagcgg 360

ttgaatacgc caaagaacag ggtctgattg tcgaactgtc agccaagat gcaacgcgct 420

cggacgtgaa ctttctgac aaactgtca atgaaggcga aaaagttggt gcagatcgtg 480

tctgctgtg tgacaccgtt ggcgtcctga cgcgcagaa atcacaagaa ctgtcaaga 540

20 aaattaccga aaactgaaat ctgcccgtgt cggttcattg ccacaacgat ttcggtatgg 600

cgaccgaaa tgcgtgcagc gcggtgctgg gcggtgcggt tcaatgtcat gtcacggtga 660

acggcatcgg tgaacgcgct ggcaatgca gctggaaga agtcgtggca gctcctcaaaa 720

ttctgtatgg ttacgatacc aaaatcaaaa tggaaaaact gtacgaagtc agtcgcattg 780

tgtcccgtct gatgaaactg ccggtcccgc cgaacaaagc tatcgtgggc gataatgctt 840

25 ttgcgatga agcgggcatt cacgtggacg gtctgatcaa aaacaccgaa acgtatgaac 900

cgattaaacc gaaatgggt ggcaatcgtc gccgtattat cctgggcaaaa cactctggtc 960

gtaaagcgt gaaatacaaaa ctggatctga tgggtattaa cgtagtgac gaacaactga 1020

acaaaatcta tgaacgtgtg aaagaattg gcgatctggg taaatacatt agcgtgccc 1080

acctgctggc aatcgtcgtg gaagtaccg gtaaactgtg atgtcgaaga attaccatat 1140

30 tgccgtattg ccgggggacg gtattgtcc ggagcggccg ctaattaag ttaaactct 1200

agagaattc 1209

<210> 58

<211> 372

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>



ES 2 525 150 T3

<223> Polipéptido sintético

<400> 58

Met Met Val Arg Ile Phe Asp Thr Thr Leu Arg Asp Gly Glu Gln Thr

1 5 10 15

5

Pro Gly Val Ser Leu Thr Pro Asn Asp Lys Leu Glu Ile Ala Lys Lys

20 25 30

Leu Asp Glu Leu Gly Val Asp Val Ile Glu Ala Gly Ser Ala Val Thr

10 35 40 45

Ser Lys Gly Glu Arg Glu Gly Ile Lys Leu Ile Thr Lys Glu Gly Leu

50 55 60

15 Asn Ala Glu Ile Cys Ser Phe Val Arg Ala Leu Pro Val Asp Ile Asp

65 70 75 80

Ala Ala Leu Glu Cys Asp Val Asp Ser Val His Leu Val Val Pro Thr

85 90 95

20

Ser Pro Ile His Met Lys Tyr Lys Leu Arg Lys Thr Glu Asp Glu Val

100 105 110

Leu Val Thr Ala Leu Lys Ala Val Glu Tyr Ala Lys Glu Gln Gly Leu

25 115 120 125

Ile Val Glu Leu Ser Ala Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Val Asn Phe

130 135 140

30 Leu Ile Lys Leu Phe Asn Glu Gly Glu Lys Val Gly Ala Asp Arg Val

145 150 155 160

Cys Val Cys Asp Thr Val Gly Val Leu Thr Pro Gln Lys Ser Gln Glu

165 170 175

35

Leu Phe Lys Lys Ile Thr Glu Asn Val Asn Leu Pro Val Ser Val His

180 185 190

ES 2 525 150 T3

Cys His Asn Asp Phe Gly Met Ala Thr Ala Asn Ala Cys Ser Ala Val

195 200 205

5 Leu Gly Gly Ala Val Gln Cys His Val Thr Val Asn Gly Ile Gly Glu

210 215 220

Arg Ala Gly Asn Ala Ser Leu Glu Glu Val Val Ala Ala Ser Lys Ile

225 230 235 240

10

Leu Tyr Gly Tyr Asp Thr Lys Ile Lys Met Glu Lys Leu Tyr Glu Val

245 250 255

Ser Arg Ile Val Ser Arg Leu Met Lys Leu Pro Val Pro Pro Asn Lys

15 260 265 270

Ala Ile Val Gly Asp Asn Ala Phe Ala His Glu Ala Gly Ile His Val

275 280 285

20 Asp Gly Leu Ile Lys Asn Thr Glu Thr Tyr Glu Pro Ile Lys Pro Glu

290 295 300

Met Val Gly Asn Arg Arg Arg Ile Ile Leu Gly Lys His Ser Gly Arg

305 310 315 320

25

Lys Ala Leu Lys Tyr Lys Leu Asp Leu Met Gly Ile Asn Val Ser Asp

325 330 335

Glu Gln Leu Asn Lys Ile Tyr Glu Arg Val Lys Glu Phe Gly Asp Leu

30 340 345 350

Gly Lys Tyr Ile Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ala Ile Val Arg Glu Val

355 360 365

35 Thr Gly Lys Leu

370

ES 2 525 150 T3

<210> 59

<211> 1092

<212> ADN

<213> Escherichia coli

5 <400> 59

atgtcgaaga attaccatat tgccgtattg ccgggggacg gtattgtcc ggaagtgatg 60  
 acccaggcgc tgaagtgtct gtagcctgtg cgcaaccgct ttgcatgctg catcaccacc 120  
 agccattacg atgtaggcgg cgcagccatt gataaccacg ggcaaccact gccgcctgcg 180  
 acggtgaag gttgtgagca agccgatgcc gtgctgttg gctcggtagg cggcccgaag 240  
 10 tgggaacatt taccaccaga ccagcaacca gaacgcggcg cgctgctgcc tctgcgtaag 300  
 cactcaaat tattagcaa cctgcccgcg gcaaaactgt atcaggggct ggaagcattc 360  
 tgtccgctgc gtgcagacat tgccgaaac ggcttcgaca tcctgtgtgt gcgcgaactg 420  
 accggcggca tctatttcgg tcagcaaaaa ggccgcaag gtagcggaca atatgaaaaa 480  
 gccttgata ccgaggtgta tcaccgtttt gagatcgaac gtatgcccc catcgcgttt 540  
 15 gaatctgctc gcaagcgtcg ccacaaagtg acgtcgtatc ataaagccaa cgtgctgcaa 600  
 tcctctattt tatggcggga gatcgttaac gagatcgcca cggaataccc gtagtgcgaa 660  
 ctggcgcata tgtacatcga caacgccacc atgcagctga ttaaagatcc atcacagttt 720  
 gacgttctgc tgtgctcaa cctgtttggc gacattctgt ctgacgagtg cgcaatgatc 780  
 actggctcga tggggatgtt gcctccgcc agcctgaacg agcaaggttt tggactgtat 840  
 20 gaaccggcgg gcggtcgcgc accagatcgc gcaggcaaaa acatcgccaa cccgattgca 900  
 caaatccttt cgctggcact gctgctgctg tacagcctgg atgccgatga tgcggcttgc 960  
 gccattgaac gcgccattaa ccgcgcatta gaagaaggca ttcgaccggg ggatttagcc 1020  
 cgtggcgtg ccgccgtag taccgatgaa atgggcgata tcattgcccg ctatgtagca 1080  
 gaaggggtgt aa 1092

25

<210> 60

<211> 1401

<212> ADN

<213> Escherichia coli

30 <400> 60

atggctaaga cgttatacga aaaattgttc gacgctcacg ttgtgtacga agccgaaaac 60  
 gaaaccccac tgttatatat cgaccgccac ctggtgcatg aagtacctc accgcaggcg 120  
 ttcatggttc tgcgcgcccc cggctgcccc gtacgtcagc cgggcaaaaac cttcgtacc 180  
 atggatcaca acgtctctac ccagacaaaa gacattaatg cctgcgggtga aatggcgcgt 240  
 35 atccagatgc aggaactgat caaaaactgc aaagaatttg gcgtcgaact gtatgacctg 300  
 aatcaccctg atcaggggat cgtccacgta atggggccgg aacagggcgt caccttgccc 360  
 gggatgacca ttgtctcggg cgactcgcac accgccacc acggcgcgtt tggcgcactg 420

ES 2 525 150 T3

gcctttggta tcggcacttc cgaagttgaa cacgtactgg caacgcaaac cctgaaacag 480  
 ggccgcgcaa aaaccatgaa aattgaagtc cagggcaaag ccgcgccggg cattaccgca 540  
 aaagatatcg tgctggcaat tatcggtaaa accggtagcg cagggcgcac cgggcatgtg 600  
 gtggagtttt gcggcgaagc aatccgtgat ttaagcatgg aaggctgat gaccctgtgc 660  
 5 aatatggcaa tcgaaatggg cgaaaagcc ggtctggtg caccggacga aaccaccttt 720  
 aactatgta aaggccgtct gcatgcgccg aaaggcaaag atttcgacga cgccgttgcc 780  
 tactggaaaa cctgcaaac cgacgaagc gcaacttgc ataccgtgt cactctgcaa 840  
 gcagaagaaa ttaccgca ggtcacctgg ggcaccaatc ccggccaggt gattccgtg 900  
 aacgacaata ttccgatcc ggcttcgtt gccgatccg ttgaacgcgc gtcggcagaa 960  
 10 aaagcgtgg cctatatggg gctgaaaccg ggtattccg tgaccgaagt ggctatcgac 1020  
 aaagtgtta tcggttctg taccaactcg cgcattgaag atttacgcgc ggcagcggag 1080  
 atcccaaag ggcgaaaagt cgcgccagc gtgcaggcac tgggtgtcc cggctctggc 1140  
 ccggtaaaag ccagcgga agcgggaagt ctggataaaa tctttattga agccggttt 1200  
 gaatggcgt tcctggctg ctcaatgtg ctggcgatga acaacgaccg tctgaatccg 1260  
 15 ggcgaacgt gtgcctccac cagcaaccgt aacttgaag gccgccagg ggcgcccggg 1320  
 cgcacgcatc tggtcagccc ggcaatggct gccgctgctg ctgtgaccgg acatttcgcc 1380  
 gacattcgca acattaaata a 1401

<210> 61

20 <211> 606

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 61

atggcagaga aatttatcaa acacacaggc ctgggtggtc cgctggatgc cgccaatgct 60  
 25 gataccgatg caatcatccc gaaacagtt ttgcagaaag tgaccctac gggttttggc 120  
 gcgcatctgt ttaacgactg cgttttctg gatgaaaaag gccaacagcc aaaccggac 180  
 ttcgtgctga actcccga gtaacagggc gttccattt tgctggcagc agaaaacttc 240  
 ggctgtggct ctgcgctga gcacgcgcc tgggcattga ccgactacgg ttttaaagt 300  
 gtgattgcgc cgagtttgc tgacatctc tacggcaata gctttaacaa ccagctgctg 360  
 30 ccggtgaaat taagcgtgc agaagtgac gaactgttg cgctggtgaa agctaatccg 420  
 gggatccatt tcgacgtgga tctggaagcg caagaggta aagcgggaga gaaaacctat 480  
 cgctttacca tcgatgcctt ccgccccac tgcatgatga acggtctgga cagtattggg 540  
 cttacctgc agcacgacga cgccattgcc gcttatgaag caaaacaacc tgcgtttatg 600  
 aattaa 606

35

<210> 62

<211> 3119

# ES 2 525 150 T3

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 62

```

atgtcgaaga attaccatat tgccgtattg ccgggggacg gtattgtcc ggaagtgatg    60
5  acccaggcgc tgaagtgtct ggatgccgtg cgcaaccgct ttgcgatgcg catcaccacc    120
   agccattacg atgtaggcgg cgcagccatt gataaccacg ggcaaccact gccgcctgcg    180
   acggttgaag gttgtgagca agccgatgcc gtgctgttg gctcgttagg cggcccgaag    240
   tgggaacatt taccaccaga ccagcaacca gaacgcggcg cgctgctgcc tctgcgtaag    300
   cactcaaat tattcagcaa cctgcgcccg gcaaaactgt atcaggggct ggaagcattc    360
10  tgtccgctgc gtcagacat tgccgcaaac ggcttcgaca tcctgtgtgt gcgcgaactg    420
   accggcggca tctatttcg tccagcaaaa ggccgcgaag gtagcggaca atatgaaaaa    480
   gccttgata ccgaggtgta tcaccgtttt gagatcgaac gtatgcccc catcgcgttt    540
   gaatctgctc gcaagcgtcg ccacaaagtg acgtcgtatg ataaagccaa cgtgctgcaa    600
   tcctctattt tatggcggga gatcgttaac gagatcgcca cggaataccc ggatgtcgaa    660
15  ctggcgcata tgtacatcga caacgccacc atgcagctga ttaaagatcc atcacagttt    720
   gacgttctgc tigtctcaa cctgtttggc gacattctgt ctgacgagtg cgcaatgatc    780
   actggctcga tggggatgtt gcctccgcc agcctgaacg agcaaggttt tggactgtat    840
   gaaccggcgg gcggctcggc accagatcgc gcaggcaaaa acatcgccaa cccgattgca    900
   caaatccttt cgctggcact gctgctgctg tacagcctgg atgccgatga tgcggcttgc    960
20  gccattgaac gcgccattaa ccgcgcatta gaagaaggca ttcgcaccgg ggatttagcc    1020
   cgtggcgtg cgcgcgtagg tacgatgaa atgggcgata tcattgcccg ctatgtagca    1080
   gaaggggtgt aatcatggct aagacgttat acgaaaaatt gttcgacgct cacgttgtgt    1140
   acgaagccga aaacgaaacc ccaactgtat atatcgaccg ccacctggtg catgaagtga    1200
   cctcaccgca ggcgttcgat ggtctgcgcg cccacggtcg cccggtactg cagccgggca    1260
25  aaaccttgc taccatggat cacaacgtct ctaccagac caaagacatt aatgcctgcg    1320
   gtgaaatggc gcgtatccag atgcaggaac tgatcaaaaa ctgcaaagaa tttggcgtcg    1380
   aactgtatga cctgaatcac ccgatcagg ggatcgtcca cgtaatgggg ccggaacagg    1440
   gcgtcacctt gccggggatg accattgtct gcggcgactc gcataccgcc acccacggcg    1500
   cgtttggcgc actggccttt ggtatcggca cttccgaagt tgaacacgta ctggcaacgc    1560
30  aaaccctgaa acagggccgc gcaaaaacca tgaaaattga agtccagggc aaagccgcgc    1620
   cgggcattac cgcaaaagat atcgtgctgg caattatcgg taaaaccggt agcgcaggcg    1680
   gcaccgggca tgtggtggag ttttgcggcg aagcaatccg tgatttaagc atggaaggtc    1740
   gtatgacctt gtgcaatag gcaatcgaaa tgggcgcaaa agccggtctg gttgcaccgg    1800
   acgaaaccac cttaactat gcaaaaggcc gtctgcatgc gccgaaaggc aaagatttcg    1860
35  acgacgccgt tgccctactg aaaaccctgc aaaccgacga aggcgcaact ttcgataccg    1920
   ttgtcactct gcaagcagaa gaaatttcac cgcaggtcac ctggggcacc aatcccggcc    1980
   aggtgatttc cgtgaacgac aatattcccg atccggcttc gtttccgat ccggttgaac    2040

```

ES 2 525 150 T3

gcgcgctggc agaaaaagcg ctggcctata tggggctgaa accgggtatt ccgctgaccg 2100  
aagtggctat cgacaaagtg ttatcggtt cctgtaccaa ctgcgcatt gaagattac 2160  
gcgcggcagc ggagatcgcc aaagggcgaa aagtcgcgcc aggcgtgcag gcactggtgg 2220  
ttcccgctc tggcccggta aaagcccagg cggaagcgga aggtctggat aaaatcttta 2280  
5 ttgaagccgg tttgaaatgg cgcttgctg gctgctcaat gtgtctggcg atgaacaacg 2340  
accgtctgaa tccggcgaa cgttgtgct ccaccagcaa ccgtaactt gaaggccgcc 2400  
aggggcgcg cgggcgacg catctgtca gcccgcaat ggctgccgct gctgctgta 2460  
ccggacattt cgccgacatt cgcaacatta aataaggagc acaccatggc agagaaattt 2520  
atcaaacaca caggcctggt ggttccgctg gatgcccca atgtcgatac cgatgcaatc 2580  
10 atcccgaac agttttgca gaaagtgacc cgtacgggtt ttggcgcga tctgtttaac 2640  
gactggcgtt ttctgatga aaaaggcaa cagccaaacc cggactcgt gctgaactt 2700  
ccgcagtatc agggcgctc cattttgctg gcacgagaaa acttcggctg tggctcttcg 2760  
cgtgagcag cgccctggc attgaccgac tacggttta aagtggatg tgcgccgagt 2820  
ttgctgaca tctctacgg caatagctt aacaaccagc tgctgccgtt gaaattaagc 2880  
15 gatgcagaag tggacgaact gttgctgctg gtgaaagcta atccggggat ccatttcgac 2940  
gtggatctgg aagcgaaga ggtgaaagcg ggagagaaaa cctatcgctt taccatcgat 3000  
gcctccgcc gccactgat gatgaacggt ctggacagta ttggcttac cttgcagcac 3060  
gacgacgcca ttgccgcta tgaagcaaaa caacctgctt ttatgaatta agcggccgc 3119

20 <210> 63  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

25 <223> Cebador sintético  
<400> 63  
ttgtccgga agtcatgacc caggc 25

<210> 64

30 <211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador sintético

35 <400> 64  
tatgtcggc cgcttaattc ataaacgag gttgtttgc ttc 43

ES 2 525 150 T3

<210> 65

<211> 363

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5 <400> 65

Met Ser Lys Asn Tyr His Ile Ala Val Leu Pro Gly Asp Gly Ile Gly

1 5 10 15

Pro Glu Val Met Thr Gln Ala Leu Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Asn

10 20 25 30

Arg Phe Ala Met Arg Ile Thr Thr Ser His Tyr Asp Val Gly Gly Ala

35 40 45

15 Ala Ile Asp Asn His Gly Gln Pro Leu Pro Pro Ala Thr Val Glu Gly

50 55 60

Cys Glu Gln Ala Asp Ala Val Leu Phe Gly Ser Val Gly Gly Pro Lys

65 70 75 80

20

Trp Glu His Leu Pro Pro Asp Gln Gln Pro Glu Arg Gly Ala Leu Leu

85 90 95

Pro Leu Arg Lys His Phe Lys Leu Phe Ser Asn Leu Arg Pro Ala Lys

25 100 105 110

Leu Tyr Gln Gly Leu Glu Ala Phe Cys Pro Leu Arg Ala Asp Ile Ala

115 120 125

30 Ala Asn Gly Phe Asp Ile Leu Cys Val Arg Glu Leu Thr Gly Gly Ile

130 135 140

Tyr Phe Gly Gln Pro Lys Gly Arg Glu Gly Ser Gly Gln Tyr Glu Lys

145 150 155 160

35

Ala Phe Asp Thr Glu Val Tyr His Arg Phe Glu Ile Glu Arg Ile Ala

165 170 175

ES 2 525 150 T3

Arg Ile Ala Phe Glu Ser Ala Arg Lys Arg Arg His Lys Val Thr Ser  
180 185 190

5 Ile Asp Lys Ala Asn Val Leu Gln Ser Ser Ile Leu Trp Arg Glu Ile  
195 200 205

Val Asn Glu Ile Ala Thr Glu Tyr Pro Asp Val Glu Leu Ala His Met  
210 215 220

10 Tyr Ile Asp Asn Ala Thr Met Gln Leu Ile Lys Asp Pro Ser Gln Phe  
225 230 235 240

Asp Val Leu Leu Cys Ser Asn Leu Phe Gly Asp Ile Leu Ser Asp Glu  
15 245 250 255

Cys Ala Met Ile Thr Gly Ser Met Gly Met Leu Pro Ser Ala Ser Leu  
260 265 270

20 Asn Glu Gln Gly Phe Gly Leu Tyr Glu Pro Ala Gly Gly Ser Ala Pro  
275 280 285

Asp Ile Ala Gly Lys Asn Ile Ala Asn Pro Ile Ala Gln Ile Leu Ser  
290 295 300

25 Leu Ala Leu Leu Leu Arg Tyr Ser Leu Asp Ala Asp Asp Ala Ala Cys  
305 310 315 320

Ala Ile Glu Arg Ala Ile Asn Arg Ala Leu Glu Glu Gly Ile Arg Thr  
30 325 330 335

Gly Asp Leu Ala Arg Gly Ala Ala Ala Val Ser Thr Asp Glu Met Gly  
340 345 350

35 Asp Ile Ile Ala Arg Tyr Val Ala Glu Gly Val  
355 360



ES 2 525 150 T3

<210> 66

<211> 466

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5 <400> 66

Met Ala Lys Thr Leu Tyr Glu Lys Leu Phe Asp Ala His Val Val Tyr

1 5 10 15

Glu Ala Glu Asn Glu Thr Pro Leu Leu Tyr Ile Asp Arg His Leu Val

10 20 25 30

His Glu Val Thr Ser Pro Gln Ala Phe Asp Gly Leu Arg Ala His Gly

35 40 45

15 Arg Pro Val Arg Gln Pro Gly Lys Thr Phe Ala Thr Met Asp His Asn

50 55 60

Val Ser Thr Gln Thr Lys Asp Ile Asn Ala Cys Gly Glu Met Ala Arg

65 70 75 80

20

Ile Gln Met Gln Glu Leu Ile Lys Asn Cys Lys Glu Phe Gly Val Glu

85 90 95

Leu Tyr Asp Leu Asn His Pro Tyr Gln Gly Ile Val His Val Met Gly

25 100 105 110

Pro Glu Gln Gly Val Thr Leu Pro Gly Met Thr Ile Val Cys Gly Asp

115 120 125

30 Ser His Thr Ala Thr His Gly Ala Phe Gly Ala Leu Ala Phe Gly Ile

130 135 140

Gly Thr Ser Glu Val Glu His Val Leu Ala Thr Gln Thr Leu Lys Gln

145 150 155 160

35

Gly Arg Ala Lys Thr Met Lys Ile Glu Val Gln Gly Lys Ala Ala Pro

165 170 175

ES 2 525 150 T3

Gly Ile Thr Ala Lys Asp Ile Val Leu Ala Ile Ile Gly Lys Thr Gly

180 185 190

5 Ser Ala Gly Gly Thr Gly His Val Val Glu Phe Cys Gly Glu Ala Ile

195 200 205

Arg Asp Leu Ser Met Glu Gly Arg Met Thr Leu Cys Asn Met Ala Ile

210 215 220

10

Glu Met Gly Ala Lys Ala Gly Leu Val Ala Pro Asp Glu Thr Thr Phe

225 230 235 240

Asn Tyr Val Lys Gly Arg Leu His Ala Pro Lys Gly Lys Asp Phe Asp

15

245 250 255

Asp Ala Val Ala Tyr Trp Lys Thr Leu Gln Thr Asp Glu Gly Ala Thr

260 265 270

20 Phe Asp Thr Val Val Thr Leu Gln Ala Glu Glu Ile Ser Pro Gln Val

275 280 285

Thr Trp Gly Thr Asn Pro Gly Gln Val Ile Ser Val Asn Asp Asn Ile

290 295 300

25

Pro Asp Pro Ala Ser Phe Ala Asp Pro Val Glu Arg Ala Ser Ala Glu

305 310 315 320

Lys Ala Leu Ala Tyr Met Gly Leu Lys Pro Gly Ile Pro Leu Thr Glu

30

325 330 335

Val Ala Ile Asp Lys Val Phe Ile Gly Ser Cys Thr Asn Ser Arg Ile

340 345 350

35 Glu Asp Leu Arg Ala Ala Ala Glu Ile Ala Lys Gly Arg Lys Val Ala

355 360 365

ES 2 525 150 T3

Pro Gly Val Gln Ala Leu Val Val Pro Gly Ser Gly Pro Val Lys Ala

370 375 380

Gln Ala Glu Ala Glu Gly Leu Asp Lys Ile Phe Ile Glu Ala Gly Phe

5 385 390 395 400

Glu Trp Arg Leu Pro Gly Cys Ser Met Cys Leu Ala Met Asn Asn Asp

405 410 415

10 Arg Leu Asn Pro Gly Glu Arg Cys Ala Ser Thr Ser Asn Arg Asn Phe

420 425 430

Glu Gly Arg Gln Gly Arg Gly Gly Arg Thr His Leu Val Ser Pro Ala

435 440 445

15

Met Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr Gly His Phe Ala Asp Ile Arg Asn

450 455 460

Ile Lys

20 465

<210> 67

<211> 201

<212> PRT

25 <213> Escherichia coli

<400> 67

Met Ala Glu Lys Phe Ile Lys His Thr Gly Leu Val Val Pro Leu Asp

1 5 10 15

30 Ala Ala Asn Val Asp Thr Asp Ala Ile Ile Pro Lys Gln Phe Leu Gln

20 25 30

Lys Val Thr Arg Thr Gly Phe Gly Ala His Leu Phe Asn Asp Trp Arg

35 40 45

35

Phe Leu Asp Glu Lys Gly Gln Gln Pro Asn Pro Asp Phe Val Leu Asn

50 55 60

ES 2 525 150 T3

Phe Pro Gln Tyr Gln Gly Ala Ser Ile Leu Leu Ala Arg Glu Asn Phe

65            70            75            80

5 Gly Cys Gly Ser Ser Arg Glu His Ala Pro Trp Ala Leu Thr Asp Tyr

85            90            95

Gly Phe Lys Val Val Ile Ala Pro Ser Phe Ala Asp Ile Phe Tyr Gly

100            105            110

10

Asn Ser Phe Asn Asn Gln Leu Leu Pro Val Lys Leu Ser Asp Ala Glu

115            120            125

Val Asp Glu Leu Phe Ala Leu Val Lys Ala Asn Pro Gly Ile His Phe

15            130            135            140

Asp Val Asp Leu Glu Ala Gln Glu Val Lys Ala Gly Glu Lys Thr Tyr

145            150            155            160

20 Arg Phe Thr Ile Asp Ala Phe Arg Arg His Cys Met Met Asn Gly Leu

165            170            175

Asp Ser Ile Gly Leu Thr Leu Gln His Asp Asp Ala Ile Ala Ala Tyr

180            185            190

25

Glu Ala Lys Gln Pro Ala Phe Met Asn

195            200

<210> 68

30 <211> 566

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 68

catgccatgg cggacacggt attgattctg ggtgatagcc tgagcgccgg gtatcgaatg 60

35 tctgccagcg cggcctggcc tgcctgttg aatgataagt ggcagagtaa aacgtcggta 120

gttaatgcc a gcatcagcgg cgacacctg caacaaggac tggcgcgcct tccggctctg 180

ctgaaacagc atcagccgcg ttgggtgctg gttgaactgg gcggaatga cggtttcgct 240

ES 2 525 150 T3

ggtttcagc cacagcaaac cgagcaaacg ctgcgccaga tttgcagga tgtaaagcc 300  
 gccaacgctg aaccattgtt aatgcaaata cgtctgcctg caaactatgg tcgccgttat 360  
 aatgaagcct ttagcgccat ttacccaaa ctcgcaaag agttgatgt tccgctgctg 420  
 cccttttta tgaagaggt ctacctcaag ccacaatgga tgcaggatga cggattcat 480  
 5 cccaaccgcg acgccagcc gttattgcc gactggatgg cgaagcagtt gcagcctta 540  
 gtaaatcatg atcataagg atccgc 566

<210> 69

<211> 32

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 69

15 catgccatgg cggacacggt attgattctg gg 32

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 70

Met Ala Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly

25 1 5

<210> 71

<211> 36

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 71

gcggatcctt atgagtcatg atttactaaa ggctgc 36

35

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5 <400> 72

Ser Asp His Asn Val Leu Pro Gln Leu

1 5

<210> 73

10 <211> 183

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 73

Met Ala Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr

15 1 5 10 15

Arg Met Ser Ala Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Lys Trp

20 25 30

20 Gln Ser Lys Thr Ser Val Val Asn Ala Ser Ile Ser Gly Asp Thr Ser

35 40 45

Gln Gln Gly Leu Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro

50 55 60

25

Arg Trp Val Leu Val Glu Leu Gly Gly Asn Asp Gly Leu Arg Gly Phe

65 70 75 80

Gln Pro Gln Gln Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val

30 85 90 95

Lys Ala Ala Asn Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala

100 105 110

35 Asn Tyr Gly Arg Arg Tyr Asn Glu Ala Phe Ser Ala Ile Tyr Pro Lys

115 120 125

ES 2 525 150 T3

Leu Ala Lys Glu Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu

130 135 140

Val Tyr Leu Lys Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn

5 145 150 155 160

Arg Asp Ala Gln Pro Phe Ile Ala Asp Trp Met Ala Lys Gln Leu Gln

165 170 175

10 Pro Leu Val Asn His Asp Ser

180

<210> 74

<211> 33

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 74

20 cactactcga ggcactccc gttctggata atg 33

<210> 75

<211> 34

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 75

gggaagctta tgagtcataa ttactaaag gctg 34

30

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 76

ES 2 525 150 T3

Ser Asp His Asn Val Leu Pro Gln Leu

1 5

<210> 77

5 <211> 939

<212> ADN

<213> *Listeria monocytogenes*

<400> 77

atgaacgcag gaattttagg agtaggtaaa tacgtacctg aaaaaatagt aactaacttt 60  
 10 gatttagaaa aaattatgga tacatctgat gagtggattc gaactcgaac tggatcgaag 120  
 gaaagaagaa ttgctcgtga tgacgaatat acgcatgatt tagcatatga agcagcaaag 180  
 gtagccatta agaatgctgg tcttacacca gatgatatcg actgtttat cgttgcaact 240  
 gttacacaag aagcgacatt tccttcagtt gctaataata tccaagaccg ttaggagcg 300  
 aaaaatgctg ccggtatgga cgttgaggca gctgtgctg gtttacttt tggagtagtg 360  
 15 actgcagcac aattcattaa aacaggtgca tataaaaata tcgtagttgt cggcgaggat 420  
 aaattatcta aaactactaa ctgggatgat cgcaaacag ccgtattatt cgggatgga 480  
 gcagggtgctg tagttatggg gccagtttct gatgatcatg gtttactttc attgactta 540  
 gggtcagatg gatcagggtg taataacttg aatttagatg aaaataaaaa gatttatatg 600  
 aatggtcgtg aagtgtccg tttgcagtt cgccaaatgg gagaagcttc actacgagta 660  
 20 ctggaacgtg ctggtctga gaaagaagac ttgacttac taattcctca ccaagcaaat 720  
 attcgtatca tgaagcttc tcgtgagcgt ttgaatttac cagaagaaaa actgatgaaa 780  
 acagtacaca aatattgtaa tacttcatcc tcttcaatcg cacttgcgct agttgatgca 840  
 gtggaagaag gacgtattaa agataatgat aacgttctgc ttgtaggctt tggcggcgga 900  
 ctaacatggg ggcgccctaat cattcgttgg ggtaagtaa 939

25

<210> 78

<211> 951

<212> ADN

<213> *Listeria monocytogenes*

30 <400> 78

ctcgagatga atgcaggtat tctgggtgtt ggtaaataatg tgccggaaaa aatcgtgacc 60  
 aactcgtac tggaaaaaat tatggatacc agcgacgaat ggattcgtac ccgtaccggt 120  
 attgaagaac gtcgtattgc acgtgatgat gaatataccc atgatctggc atatgaagca 180  
 gcaaaagtg caattaaata tgcaggctcg acaccggatg atattgacct gtttattgtt 240  
 35 gcaaccgta cccaagaagc aaccttccg agcgttgcaa atattattca ggatcgtctg 300  
 ggtgcaaaaa atgcagcagg tatggatgtt gaagcagcat gtgcaggttt taccttgggt 360  
 gttgttaccg cagcccagtt tattaaaacc ggtgcctata aaaacatcgt tgttgggtgt 420



ES 2 525 150 T3

gcagataaac tgagcaaaat taccaattgg gatgatcgta ccaccgcagt tctgtttggt 480  
gatggtgccg gtgcagttgt tatgggtccg gttagtgatg atcatggtct gctgtcatt 540  
gatctgggta gtgatgtag cggtggtaaa tatctgaatc tggacgagaa taaaaaatt 600  
tatatgaatg gtcgcgaagt gtttcgttt gcagttcgtc agatgggtga agcaagcctg 660  
5 cgtgttctgg aacgtgcagg tctggaaaa gaggatctgg atctgctgat tccgcatcag 720  
gcaaatattc gtattatga agcaagcctg gaacgtctga atctgccgga agaaaaactg 780  
atgaaaaccg tgcataaata tggcaatacc agcagcagca gcattgcact ggcactggtt 840  
gatgcagttg aagaaggtcg cattaaagat aatgataacg ttctgctggt tggttttggt 900  
ggtggtctga cctgggggtc actgattatt cgttggggta aataactgca g 951

10  
<210> 79  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador sintético  
<400> 79  
atgccatagc attttatcc 20

20 <210> 80  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

25 <223> Cebador sintético  
<400> 80  
tctgattaa tctgtatcag g 21

<210> 81

30 <211> 1476  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli  
<400> 81  
atggctaact actcaatac actgaatctg cgccagcagc tggcacagct gggcaaatgt 60  
35 cgctttatgg gccgcgatga attcggcagat ggccgagct accctcaggg taaaaaagta 120  
gcatcgtcg gctgtggcgc acagggctg aaccagggcc tgaacatgcg tgattctggt 180  
ctcgatatct cctacgctct gcgtaaagaa gcgattgccg agaagcgcgc gtcctggcgt 240

ES 2 525 150 T3

aaagcgaccg aaaatggttt taaagtgggt acttacgaag aactgatccc acaggcggat 300  
ctggtgatta acctgacgcc ggacaagcag cactctgatg tagtgcgcac cgtacagcca 360  
ctgatgaaag acggcgcgcc gctgggctac tcgcacggft tcaacatcgt cgaagtgggc 420  
gagcagatcc gtaaagatat caccgtagtg atggttcgcg cgaaatgccc aggcaccgaa 480  
5 gtgctggaag agtacaacg tgggttcggc gtaccgacgc tgattgccgt tcaccggaa 540  
aacgatccga aaggcgaagg catggcgatt gccaaagcct gggcggtgc aaccggtggt 600  
caccgtcggg gtgtgctgga atcgtcctc gttgcggaag tgaatctga cctgatgggc 660  
gagcaacca tctgtgctg tatgttcag gctggctctc tgctgtgctt cgacaagctg 720  
gtggaagaag gtaccgatcc agcatacgc gaaaaactga ttcagttcgg ttgggaacc 780  
10 atcaccgaag cactgaaaca gggcggcatc accctgatga tggaccgtct cttaaccgg 840  
gcgaaactgc gtgctatgc gcttctgaa cagctgaaag agatcatggc acccctgttc 900  
cagaaacata tggacgacat catctccggc gaattctctt ccggtatgat ggcggactgg 960  
gccaacgatg ataagaaact gctgacctg cgtgaagaga ccggcaaac cgcgtttgaa 1020  
accgcccgc agtatgaagg caaaatcggc gagcaggagt acttcgataa aggcgtactg 1080  
15 atgattcga tggtaaacg gggcgttgaa ctggcgttcg aaaccatggt cgattccggc 1140  
atcattgaag agtctcata ttatgaatca ctgcacgagc tgccgctgat tgccaacacc 1200  
atcgcgccga agcgtctgta cgaatgaac gtggttatct ctgataccgc tgagtacggt 1260  
aactatctgt tctctacgc ttgtgccc ttgctgaaac cgttatggc agagctgcaa 1320  
ccggcgacc tggtaaacg tattccgaa ggcgcgtag ataacggca actgctgat 1380  
20 gtgaacgaag cgattcgag ccatcgatt gagcaggtag gtaagaaact gcgcgctat 1440  
atgacagata tgaacgtat tgctgttcg ggttaa 1476

<210> 82

<211> 1851

25 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 82

atgcctaagt accgtccgc caccaccact catggtcgtg atatggcggg tgctcgtcgc 60  
ctgtggcgcg ccaccggaat gaccgacgcc gatttcgta agccgattat cgcggttg 120  
30 aactcgtca cccaattgt accgggtcac gtccatctgc gcatctcgg taaactggtc 180  
gccgaacaaa tgaagcggc tggcggcgtt gccaaagagt tcaacacat tgcggtggat 240  
gatgggattg ccatgggcca cggggggatg ctttattcac tgccatctcg cgaactgatc 300  
gctgattccg ttgagtatat ggtaacgcc cactgcgccc acgccatggt ctgcatctct 360  
aactcgcaca aaatcaccgc ggggatgctg atggcttccc tgcgcctgaa tattccggtg 420  
35 atctttgtt ccggcggccc gatggaggcc gggaaaacca aacttccga tcagatcatc 480  
aagctcgtac tggttgatgc gatgatccag ggcgcagacc cgaagatc tgactcccag 540  
agcgtcagg tgaacgttc cgcgtgtccg acctcgggtt cctgctccgg gatgttacc 600

ES 2 525 150 T3

gctaactcaa tgaactgcct gaccgaagcg ctgggcctgt cgcagccggg caacggctcg 660  
 ctgctggcaa cccacgccga ccgtaagcag ctgttcctta atgctggtaa acgcattgtt 720  
 gaattgacca aacgttatta cgagcaaac gacgaaagt cactgccgag taatcgcgc 780  
 agtaaggcgg cgttgaaaa cgccatgacg ctggatatcg cgatgggtgg atcgactaac 840  
 5 accgtacttc acctgctggc ggcggcgag gaagcggaaa tcgactcac catgagtgat 900  
 atcgataagc ttcccgcga ggtccacag ctgtgtaaag ttgcgccgag caccagaaa 960  
 taccatatgg aagatgttca ccgtgctggt ggtgttatcg gtattctcgg cgaactggat 1020  
 cgcgcggggt tactgaaccg tgatgtgaaa aacgtacttg gcctgacgtt gccgcaaacg 1080  
 ctggaacaat acgacgttat gctgaccag gatgacgagg taaaaatat gttccgagca 1140  
 10 ggtcctgcag gcattcgtac cacacaggca ttctcgcaag attgccgttg ggatacgtg 1200  
 gacgacgatc gcgcaatgg ctgtatccg tcgctggaac acgcctacag caaagacggc 1260  
 ggctggcgg tgctctacgg taactttcgg gaaaacggct gcatcgtgaa aacggcaggc 1320  
 gtcgatgaca gcatctcaa atccaccgc ccggcgaaag tgtacgaaag ccaggacgat 1380  
 gcggtagaag cgattctcgg cggtaaagtt gtcgccggag atgtgtagt aattcgctat 1440  
 15 gaaggcccga aaggcggtcc ggggatgag gaaatgctct acccaaccag ctctctgaaa 1500  
 tcaatgggtc tcggcaaacg ctgtgcgctg atcaccgacg gtcgtttctc tggggcacc 1560  
 tctggtcttt ccatcggcca cgtctaccg gaagcggcaa gcggcggcag cattggcctg 1620  
 attgaagatg gtgacctgat cgctatcagc atcccgaacc gtggcattca gttacaggtg 1680  
 agcgtatgcc aactggcggc gcgtcgtgaa gcgcaggacg ctcgaggtga caaagcctgg 1740  
 20 acgccgaaaa atcgtgaacg tcaggtctcc ttgcccctgc gtgcttatgc cagcctggca 1800  
 accagcggcg acaaaggcgc ggtgcgcat aaatcgaaac tgggggggta a 1851

<210> 83

<211> 3682

25 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 83

ctgagcgc caccccctt ggataatgt ttgcccgc acatcataac ggttctggca 60  
 aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatccggct cgtataatgt gtggaattgt 120  
 30 gagcggataa caattcaca caggaaacag cgccgctgag aaaaagcga gcggcactgc 180  
 tcttaacaa ttatcagac aatctgtgtg ggcactcagc cggaattatc gtttaacttt 240  
 attattaaaa attaaagagg tatatattaa tgtatcgatt aaataaggag gaataaacca 300  
 tggctaacta cttaacacc ctgaacctgc gtcagcaact ggctcaactg ggcaaatgtc 360  
 gttttatggg ccgtgatgaa ttgcccgatg gtgctcata tctgcaaggc aaaaagtgg 420  
 35 ttattgtggg ttgcgggtgc cagggcctga accaaggctt gaatatgctg gatcaggtc 480  
 tggacatttc gtatgcactg cgcaagaag ccatcgcaga aaaacgtgca tcgtggcgca 540  
 aagctaccga aataggcttt aaagtgggta cgtatgaaga actgattccg cagcgggatc 600

ES 2 525 150 T3

tggatgacaa cctgacccc gataaacagc atagtacgt cgtgcgtacg gttcaaccgc 660  
 tgatgaaaga tggcgcggcc ctgggttatt cccacggctt taatattgtc gaagtgggtg 720  
 aacagattcg caaagacatc accgttgca tggtgccgc gaaatgtccg ggcacggaag 780  
 ttcgtgaaga atacaaacgc ggcttcggtg tcccgacct gattgccgtg catccgaaa 840  
 5 acgatccgaa aggcgagggt atggctatcg caaaagcctg ggcagctgcg accggcggtc 900  
 accgtgcagg tgtgtggaa agctcttcg ttccgaagt caaaagcgt ctgatggcg 960  
 aacagacat tctgtcgggt atgtgcaag ccggctctct gctgtgttt gataaactgg 1020  
 ttgaagaagg tacggaccgc gcctatgctg aaaaactgat tcagttcggc tgggaaacca 1080  
 tcacggaagc gctgaaacaa ggcggtatta cctgatgat ggatcgtctg agtaatccgg 1140  
 10 caaaactgcg tgcatacgcc ctgtccgaac agctgaaaga aatcatggca ccgctgttcc 1200  
 aaaaacatat ggatgacatc atctccggtg aatttagcag cggcatgatg gcagattggg 1260  
 ctaacgatga caaaaaactg ctgacctggc gcgaagaac cggcaaaacg gcgttgaaa 1320  
 cggccccgca gtatgaaggc aaaatcgggtg aacaagaata ctcgataaa ggtgttctga 1380  
 tgatcgaat ggtgaaagct ggcgtgaaac tggccttga aaccatggtg gatagcggta 1440  
 15 ttatcgaaga aagcgcatac tacgaatctc tgcataaact gccgctgatt gcgaacacca 1500  
 tcgcccgtaa acgctgtac gaaatgaac tggttatctc agatacggca gaatatggca 1560  
 actacctgt ttcgtacgt tgcgtgccg tgcgtgaaacc gttcatggcg gaactgcaac 1620  
 cggcgacct gggtaaagcg atcccgaag gtgccgttga taacggccag ctgcgtgacg 1680  
 tcaatgaagc aattgcagc cagctatcg aacaagtggg taaaaactg cgtggctaca 1740  
 20 tgacggatat gaaacgtatt gcggttcggt gctgatcatg ccgaaatc gctctgctac 1800  
 gacgacgcat ggccgaata tggctggtgc tcgctctg tggcgtgcta cgggatgac 1860  
 ggatgctgat ttggcaaac cgattatcg ggtggtgaa agctttacc agttcgtccc 1920  
 gggccatgt cacctgcgtg atctgggtaa actggtggcc gaacagatcg aagcggccgg 1980  
 cgggtggca aaagaattta ataccatcg tttgatgac ggcattgca tgggtcatgg 2040  
 25 cggatgctg tattcgtgc cgagccgtga actgattgcc gattcgggtg aatacatggt 2100  
 gaacgcacac tgtctgacg cgatggttg tatcagcaat tgcgataaaa ttaccccggt 2160  
 tatgctgatg gcctccctgc gcctgaacat cccggttatt ttgtctcag gcggtccgat 2220  
 ggaagcaggc aaaacgaaac tgagcgacca gattatcaa ctggacctgg tggatgcat 2280  
 gatccaaggt cgatccga aagtgcgca ctctcagagt gatcaagttg aacgtccgc 2340  
 30 atgcccgacc tgtgctct gctcaggcat gttaccgct aactcaatga atgcctgac 2400  
 ggaagcgtg ggtctgtct agccgggtaa cggtagtctg ctggccacc atgcagatcg 2460  
 taaacaactg ttctgaatg cgggtaaagc tattgtgaa ctgacgaaac gctattacga 2520  
 acagaacgac gaatctgcc tgcgcgcaa tatcgaagt aaagcagctt ttgaaaacgc 2580  
 tatgacctg gatattgca tggcgggtc caccaatcag gtgctgcacc tgcggcggc 2640  
 35 ggcacaggaa gccgaaatg attcacat gtccgacatt gataaactgt cacgtaaagt 2700  
 cccgacgtg tgtaaagtgg gcggcagc caaaaatat catatggaag atgtcaccg 2760  
 tgccggcgggt gtcattgca tctgggtga actggacctg gcaggcctgc tgaaccgca 2820

ES 2 525 150 T3

tgtgaaaaat gttctgggtc tgaccctgcc gcagacgctg gaacaatacg atgtcatgct 2880  
 gacccaggat gacgcagtga aaaacatggt ccgtgctggc ccggcgggta tccgcaccac 2940  
 gcaggcgttc tctcaagact gtcgttggga tacgctggat gacgatcgtg ctaatggctg 3000  
 cattcgctcg ctggaacatg cgtatagcaa agatggcggg ctggccgttc tgtacggcaa 3060  
 5 cttgcagaa aatggttga tcgtgaaaac cgctggcgtg gatgattcta ttctgaaatt 3120  
 cacgggtccg gcgaaagttt atgaaagta ggacgatgcc gtcgaagcaa tcctgggcgg 3180  
 taaagtcgtg gcgggcgatg ttgtcgtgat tcgttatgaa ggcccgaag gcggtccggg 3240  
 tatgcaggaa atgctgtacc cgacctgtt tctgaaaagc atgggcctgg gtaaagcctg 3300  
 cgactgatc accgatggc gcttctcggg cggtagctct ggctgagta ttggtcacgt 3360  
 10 gtcaccgaa gctgcgtccg gcggtcaat cggcctgatt gaagacggtg atctgattgc 3420  
 gatcgacatt ccgaaccgcg gcaatcagct gcaagtctct gatgccgaac tggcagcacg 3480  
 tcggaagct caggacgcg gcgtgataa agcctggacc ccgaaaaatc gtgaacgcca 3540  
 agtgagttt gactgcgcg cttatcgag tctggcgacg agtgccgaca aaggtgctgt 3600  
 gcgtgataa tccaaactgg gtggctaaga tctgcagctg gtaccgggc cgcgtttaa 3660  
 15 cgaattctag aagcttacg gt 3682

<210> 84

<211> 491

<212> PRT

20 <213> Escherichia coli

<400> 84

Met Ala Asn Tyr Phe Asn Thr Leu Asn Leu Arg Gln Gln Leu Ala Gln

1 5 10 15

25 Leu Gly Lys Cys Arg Phe Met Gly Arg Asp Glu Phe Ala Asp Gly Ala

20 25 30

Ser Tyr Leu Gln Gly Lys Lys Val Val Ile Val Gly Cys Gly Ala Gln

35 40 45

30

Gly Leu Asn Gln Gly Leu Asn Met Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ser

50 55 60

Tyr Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ile Ala Glu Lys Arg Ala Ser Trp Arg

35 65 70 75 80

Lys Ala Thr Glu Asn Gly Phe Lys Val Gly Thr Tyr Glu Glu Leu Ile

ES 2 525 150 T3

	85	90	95
	Pro Gln Ala Asp Leu Val Ile Asn Leu Thr Pro Asp Lys Gln His Ser		
	100	105	110
5	Asp Val Val Arg Thr Val Gln Pro Leu Met Lys Asp Gly Ala Ala Leu		
	115	120	125
	Gly Tyr Ser His Gly Phe Asn Ile Val Glu Val Gly Glu Gln Ile Arg		
10	130	135	140
	Lys Asp Ile Thr Val Val Met Val Ala Pro Lys Cys Pro Gly Thr Glu		
	145	150	155
	Val Arg Glu Glu Tyr Lys Arg Gly Phe Gly Val Pro Thr Leu Ile Ala		
15	165	170	175
	Val His Pro Glu Asn Asp Pro Lys Gly Glu Gly Met Ala Ile Ala Lys		
	180	185	190
20	Ala Trp Ala Ala Ala Thr Gly Gly His Arg Ala Gly Val Leu Glu Ser		
	195	200	205
	Ser Phe Val Ala Glu Val Lys Ser Asp Leu Met Gly Glu Gln Thr Ile		
25	210	215	220
	Leu Cys Gly Met Leu Gln Ala Gly Ser Leu Leu Cys Phe Asp Lys Leu		
	225	230	235
	Val Glu Glu Gly Thr Asp Pro Ala Tyr Ala Glu Lys Leu Ile Gln Phe		
30	245	250	255
	Gly Trp Glu Thr Ile Thr Glu Ala Leu Lys Gln Gly Gly Ile Thr Leu		
	260	265	270
35	Met Met Asp Arg Leu Ser Asn Pro Ala Lys Leu Arg Ala Tyr Ala Leu		
	275	280	285

ES 2 525 150 T3

Ser Glu Gln Leu Lys Glu Ile Met Ala Pro Leu Phe Gln Lys His Met

290 295 300

5 Asp Asp Ile Ile Ser Gly Glu Phe Ser Ser Gly Met Met Ala Asp Trp

305 310 315 320

Ala Asn Asp Asp Lys Lys Leu Leu Thr Trp Arg Glu Glu Thr Gly Lys

325 330 335

10

Thr Ala Phe Glu Thr Ala Pro Gln Tyr Glu Gly Lys Ile Gly Glu Gln

340 345 350

Glu Tyr Phe Asp Lys Gly Val Leu Met Ile Ala Met Val Lys Ala Gly

15 355 360 365

Val Glu Leu Ala Phe Glu Thr Met Val Asp Ser Gly Ile Ile Glu Glu

370 375 380

20 Ser Ala Tyr Tyr Glu Ser Leu His Glu Leu Pro Leu Ile Ala Asn Thr

385 390 395 400

Ile Ala Arg Lys Arg Leu Tyr Glu Met Asn Val Val Ile Ser Asp Thr

405 410 415

25

Ala Glu Tyr Gly Asn Tyr Leu Phe Ser Tyr Ala Cys Val Pro Leu Leu

420 425 430

Lys Pro Phe Met Ala Glu Leu Gln Pro Gly Asp Leu Gly Lys Ala Ile

30 435 440 445

Pro Glu Gly Ala Val Asp Asn Gly Gln Leu Arg Asp Val Asn Glu Ala

450 455 460

35 Ile Arg Ser His Ala Ile Glu Gln Val Gly Lys Lys Leu Arg Gly Tyr

465 470 475 480

ES 2 525 150 T3

Met Thr Asp Met Lys Arg Ile Ala Val Ala Gly

485 490

<210> 85

5 <211> 616

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 85

Met Pro Lys Tyr Arg Ser Ala Thr Thr Thr His Gly Arg Asn Met Ala

10 1 5 10 15

Gly Ala Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Met Thr Asp Ala Asp Phe

20 25 30

15 Gly Lys Pro Ile Ile Ala Val Val Asn Ser Phe Thr Gln Phe Val Pro

35 40 45

Gly His Val His Leu Arg Asp Leu Gly Lys Leu Val Ala Glu Gln Ile

50 55 60

20

Glu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Glu Phe Asn Thr Ile Ala Val Asp

65 70 75 80

Asp Gly Ile Ala Met Gly His Gly Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser

25 85 90 95

Arg Glu Leu Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Cys

100 105 110

30 Ala Asp Ala Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly

115 120 125

Met Leu Met Ala Ser Leu Arg Leu Asn Ile Pro Val Ile Phe Val Ser

130 135 140

35

Gly Gly Pro Met Glu Ala Gly Lys Thr Lys Leu Ser Asp Gln Ile Ile

145 150 155 160



ES 2 525 150 T3

Lys Leu Asp Leu Val Asp Ala Met Ile Gln Gly Ala Asp Pro Lys Val

165 170 175

5 Ser Asp Ser Gln Ser Asp Gln Val Glu Arg Ser Ala Cys Pro Thr Cys

180 185 190

Gly Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys Leu Thr

195 200 205

10

Glu Ala Leu Gly Leu Ser Gln Pro Gly Asn Gly Ser Leu Leu Ala Thr

210 215 220

His Ala Asp Arg Lys Gln Leu Phe Leu Asn Ala Gly Lys Arg Ile Val

15 225 230 235 240

Glu Leu Thr Lys Arg Tyr Tyr Glu Gln Asn Asp Glu Ser Ala Leu Pro

245 250 255

20 Arg Asn Ile Ala Ser Lys Ala Ala Phe Glu Asn Ala Met Thr Leu Asp

260 265 270

Ile Ala Met Gly Gly Ser Thr Asn Thr Val Leu His Leu Leu Ala Ala

275 280 285

25

Ala Gln Glu Ala Glu Ile Asp Phe Thr Met Ser Asp Ile Asp Lys Leu

290 295 300

Ser Arg Lys Val Pro Gln Leu Cys Lys Val Ala Pro Ser Thr Gln Lys

30 305 310 315 320

Tyr His Met Glu Asp Val His Arg Ala Gly Gly Val Ile Gly Ile Leu

325 330 335

35 Gly Glu Leu Asp Arg Ala Gly Leu Leu Asn Arg Asp Val Lys Asn Val

340 345 350

Leu Gly Leu Thr Leu Pro Gln Thr Leu Glu Gln Tyr Asp Val Met Leu

355 360 365

Thr Gln Asp Asp Ala Val Lys Asn Met Phe Arg Ala Gly Pro Ala Gly

5 370 375 380

Ile Arg Thr Thr Gln Ala Phe Ser Gln Asp Cys Arg Trp Asp Thr Leu

385 390 395 400

10 Asp Asp Asp Arg Ala Asn Gly Cys Ile Arg Ser Leu Glu His Ala Tyr

405 410 415

Ser Lys Asp Gly Gly Leu Ala Val Leu Tyr Gly Asn Phe Ala Glu Asn

420 425 430

15

Gly Cys Ile Val Lys Thr Ala Gly Val Asp Asp Ser Ile Leu Lys Phe

435 440 445

Thr Gly Pro Ala Lys Val Tyr Glu Ser Gln Asp Asp Ala Val Glu Ala

20 450 455 460

Ile Leu Gly Gly Lys Val Val Ala Gly Asp Val Val Val Ile Arg Tyr

465 470 475 480

25 Glu Gly Pro Lys Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu Tyr Pro Thr

485 490 495

Ser Phe Leu Lys Ser Met Gly Leu Gly Lys Ala Cys Ala Leu Ile Thr

500 505 510

30

Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ser Ile Gly His Val

515 520 525

Ser Pro Glu Ala Ala Ser Gly Gly Ser Ile Gly Leu Ile Glu Asp Gly

35 530 535 540

Asp Leu Ile Ala Ile Asp Ile Pro Asn Arg Gly Ile Gln Leu Gln Val

ES 2 525 150 T3

545            550            555            560

Ser Asp Ala Glu Leu Ala Ala Arg Arg Glu Ala Gln Asp Ala Arg Gly

565            570            575

5

Asp Lys Ala Trp Thr Pro Lys Asn Arg Glu Arg Gln Val Ser Phe Ala

580            585            590

Leu Arg Ala Tyr Ala Ser Leu Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala Val

10            595            600            605

Arg Asp Lys Ser Lys Leu Gly Gly

610            615

15 <210> 86

<211> 258

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 86

20 Met Asn Phe Ser Leu Glu Gly Arg Asn Ile Val Val Met Gly Val Ala

1            5            10            15

Asn Lys Arg Ser Ile Ala Trp Gly Ile Ala Arg Ser Leu His Glu Ala

20            25            30

25

Gly Ala Arg Leu Ile Phe Thr Tyr Ala Gly Glu Arg Leu Glu Lys Ser

35            40            45

Val His Glu Leu Ala Gly Thr Leu Asp Arg Asn Asp Ser Ile Ile Leu

30            50            55            60

Pro Cys Asp Val Thr Asn Asp Ala Glu Ile Glu Thr Cys Phe Ala Ser

65            70            75            80

35 Ile Lys Glu Gln Val Gly Val Ile His Gly Ile Ala His Cys Ile Ala

85            90            95

ES 2 525 150 T3

Phe Ala Asn Lys Glu Glu Leu Val Gly Glu Tyr Leu Asn Thr Asn Arg  
100 105 110

5 Asp Gly Phe Leu Leu Ala His Asn Ile Ser Ser Tyr Ser Leu Thr Ala  
115 120 125

Val Val Lys Ala Ala Arg Pro Met Met Thr Glu Gly Gly Ser Ile Val  
130 135 140

10 Thr Leu Thr Tyr Leu Gly Gly Glu Leu Val Met Pro Asn Tyr Asn Val  
145 150 155 160

15 Met Gly Val Ala Lys Ala Ser Leu Asp Ala Ser Val Lys Tyr Leu Ala  
165 170 175

Ala Asp Leu Gly Lys Glu Asn Ile Arg Val Asn Ser Ile Ser Ala Gly  
180 185 190

20 Pro Ile Arg Thr Leu Ser Ala Lys Gly Ile Ser Asp Phe Asn Ser Ile  
195 200 205

Leu Lys Asp Ile Glu Glu Arg Ala Pro Leu Arg Arg Thr Thr Thr Pro  
210 215 220

25 Glu Glu Val Gly Asp Thr Ala Ala Phe Leu Phe Ser Asp Met Ser Arg  
225 230 235 240

30 Gly Ile Thr Gly Glu Asn Leu His Val Asp Ser Gly Phe His Ile Thr  
245 250 255

Ala Arg

<210> 87

35 <211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 525 150 T3

<220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 87  
 gagacatgg atgaatttt cacttgaagg ccgtaac 37  
 5  
 <210> 88  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 88  
 gagagcgtgc agttagcggg cagtgatatg gaaaccagaa tcaacg 46  
 15 <210> 89  
 <211> 789  
 <212> ADN  
 <213> Listeria monocytogenes  
 <400> 89  
 20 ccatggatga attttact tgaaggcct aacattgtg tgatgggggt agccaacaaa 60  
 cgcagcatcg cctggggcat tgcgcgtct tcatatgaag cgggtgcacg ttgatttc 120  
 acatacgtg gtgaacgcct ggagaaatcc gttcacgagc tgcccgaac attagaccgc 180  
 aacgattcca tcatcctccc ttgcgatgtt acaaacgacg cagaaatcga aactgcttc 240  
 gcaagcatta aggagcaggt cgggtgaatc cacggtatcg cgcattgat cgcgtttgcc 300  
 25 aacaaagaag agctgtcgg cgagtactta aacacaaatc gtgacggctt cctttggct 360  
 cataacatca gctcatattc tctgactgct gttgtcaaag cggcacgtcc gatgatgact 420  
 gaaggcggaa gcattgtcac ttgacgtac ctggcggag agcttggat gccaaactac 480  
 aacgtcatgg gtgtagcaaa agcttctct gatgcaagtg tgaaatatt agctgctgac 540  
 ttaggaaaag aaaatatccg cgtcaacagc atttctgccg gccgatcag aacattatct 600  
 30 gctaaaggca tcagcgattt caactctatc taaaagaca tcgaagagcg tgcaccgctt 660  
 cgccgcacga caacacctga agaagtgggc gatacagctg cgttctgtt cagcgatatg 720  
 tcccgcggga ttacaggtga aaatctcac gttgattctg gttccatat cactgcccgc 780  
 taactgcag 789  
 35 <210> 90  
 <211> 789  
 <212> ADN

ES 2 525 150 T3

<213> Listeria monocytogenes

<400> 90

ctcgagatga attttctact tgaaggccgt aacattgtg tgatgggggt agccaacaaa 60  
 cgcagatcg cctggggcat tgcgcttct ttacatgaag cgggtgcacg ttgatttc 120  
 5 acatacgtg gtgaacgcct ggagaaatcc gttcacgagc ttgccggaac attagaccgc 180  
 aacgattcca tcatctccc ttgcatggtt acaaacgacg cagaaatga aactgcttc 240  
 gcaagcatta aggagcaggt cgggtgaatc cacggtatcg cgcattgat cgcgtttgcc 300  
 aacaaagaag agctgtcgg cgagtactta aacacaaatc gtgacggcct cctttggct 360  
 cataacatca gctcatattc tctgactgct gttgtcaaag cggcacgtcc gatgatgact 420  
 10 gaaggcggaa gcattgtcac ttgacgtac ctggcggag agcttggat gccaaactac 480  
 aacgtcatgg gtgtagcaaa agcttctct gatgcaagtg tgaaatatt agctgctgac 540  
 ttaggaaaag aaaatatccg cgtaacagc atttctgccg gcccgatcag aacattatct 600  
 gctaaaggca tcagcgattt caactctatc ttaaagaca tcgaagagcg tgcaccgctt 660  
 cgccgcacga caacacctga agaagtgggc gatacagctg cgttctgtt cagcgatatg 720  
 15 tcccgggga ttacaggtga aaatctcac gttgattctg gttccatat cactgcccgc 780  
 taactgcag 789

<210> 91

<211> 39

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 91

25 gagacgctcg agatgaattt ttcactgaa ggccgtaac 39

<210> 92

<211> 258

<212> PRT

30 <213> Escherichia coli

<400> 92

Met Asn Phe Ser Leu Glu Gly Arg Asn Ile Val Val Met Gly Val Ala

1 5 10 15

35 Asn Lys Arg Ser Ile Ala Trp Gly Ile Ala Arg Ser Leu His Glu Ala

20 25 30

ES 2 525 150 T3

Gly Ala Arg Leu Ile Phe Thr Tyr Ala Gly Glu Arg Leu Glu Lys Ser

35 40 45

Val His Glu Leu Ala Gly Thr Leu Asp Arg Asn Asp Ser Ile Ile Leu

5 50 55 60

Pro Cys Asp Val Thr Asn Asp Ala Glu Ile Glu Thr Cys Phe Ala Ser

65 70 75 80

10 Ile Lys Glu Gln Val Gly Val Ile His Gly Ile Ala His Cys Ile Ala

85 90 95

Phe Ala Asn Lys Glu Glu Leu Val Gly Glu Tyr Leu Asn Thr Asn Arg

100 105 110

15

Asp Gly Phe Leu Leu Ala His Asn Ile Ser Ser Tyr Ser Leu Thr Ala

115 120 125

Val Val Lys Ala Ala Arg Pro Met Met Thr Glu Gly Gly Ser Ile Val

20 130 135 140

Thr Leu Thr Tyr Leu Gly Gly Glu Leu Val Met Pro Asn Tyr Asn Val

145 150 155 160

25 Met Gly Val Ala Lys Ala Ser Leu Asp Ala Ser Val Lys Tyr Leu Ala

165 170 175

Ala Asp Leu Gly Lys Glu Asn Ile Arg Val Asn Ser Ile Ser Ala Gly

180 185 190

30

Pro Ile Arg Thr Leu Ser Ala Lys Gly Ile Ser Asp Phe Asn Ser Ile

195 200 205

Leu Lys Asp Ile Glu Glu Arg Ala Pro Leu Arg Arg Thr Thr Thr Pro

35 210 215 220

Glu Glu Val Gly Asp Thr Ala Ala Phe Leu Phe Ser Asp Met Ser Arg

ES 2 525 150 T3

225            230            235            240

Gly Ile Thr Gly Glu Asn Leu His Val Asp Ser Gly Phe His Ile Thr

245            250            255

5

Ala Arg



## REIVINDICACIONES

1. Un método para producir ácido graso anteiso, comprendiendo el método cultivar una célula que comprende al menos un polinucleótido expresado en exceso, en donde un polinucleótido expresado en exceso es un polinucleótido en donde un polinucleótido expresado en exceso es un polinucleótido natural para la célula, cuyo producto se genera en mayor cantidad del que se encuentra normalmente en la célula, o un polinucleótido exógeno, comprendiendo dicho polinucleótido exógeno o expresado en exceso una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que cataliza al menos una de las siguientes reacciones:
  - (aa) conversión de piruvato a citramalato;
  - (bb) conversión de citramalato a citraconato;
  - 10 (cc) conversión de citraconato a  $\beta$ -metil-D-malato;
  - (dd) conversión de  $\beta$ -metil-D-malato a 2-oxobutanoato; o
  - (ee) conversión de treonina a 2-oxobutanoato

bajo condiciones que permitan la expresión del polinucleótido o polinucleótidos y la producción de ácido graso anteiso, en donde la célula produce más ácidos grasos anteiso que una célula por otra parte similar que no comprende el polinucleótido o polinucleótidos.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además extraer del cultivo el ácido graso anteiso o un producto derivado de ácido graso anteiso.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la célula comprende además al menos un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que cataliza al menos una de las siguientes reacciones:
  - (ff) conversión de 2-oxobutanoato a 2-aceto-2-hidroxi-butirato,
  - (gg) conversión de 2-aceto-2-hidroxi-butirato a 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato, o
  - (hh) conversión de 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato a 2-ceto-3-metilvalerato, y, opcionalmente, la célula se modifica para atenuar la actividad de aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en donde la célula comprende polinucleótidos exógenos o expresados en exceso que codifican polipéptidos que catalizan las reacciones (ee) y (ff).
5. El método de la reivindicación 4, en donde la célula comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una treonina desaminasa y un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una acetohidroxiácido sintetasa.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en donde la treonina desaminasa es *E. coli* TdcB y/o la acetohidroxiácido sintetasa es *E. coli* IlvIH, *E. coli* IlvIH (G14D), *E. coli* IlvGM, o *B. subtilis* IlvBH.
7. El método de la reivindicación 3, en donde la célula además comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una acil transferasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una enoil-ACP reductasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una tioesterasa, o una de sus combinaciones.
- 35 8. El método de la reivindicación 7, en donde la célula además comprende un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa, y opcionalmente, un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una tioesterasa.
- 45 9. Una célula que comprende:
  - (i) un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una treonina desaminasa o un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que codifica una citramalato sintetasa;
- 50

- (ii) un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, y
  - (iii) un polinucleótido exógeno o expresado en exceso que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una 3-cetoacil-ACP sintetasa,
- 5 en donde un polinucleótido expresado en exceso es un polinucleótido natural para la célula, cuyo producto se genera en mayor cantidad del que se encuentra normalmente en la célula, y
- en donde los polinucleótidos se expresan y la célula produce más ácido graso anteiso que una célula por otra parte similar que no comprende el polinucleótido o polinucleótidos.
- 10 10. La célula de la reivindicación 9, en donde (i) la treonina desaminasa es *E. coli* TdcB o la citramalato sintetasa es CimA derivada de *M. jannaschii*, (ii) la  $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa es *B. subtilis* Bkd y (iii) la 3-cetoacil-ACP sintetasa es *B. subtilis* FabH.

Figura 1: Rutas de biosíntesis de ácidos graso de cadena ramificada anteiso e iso

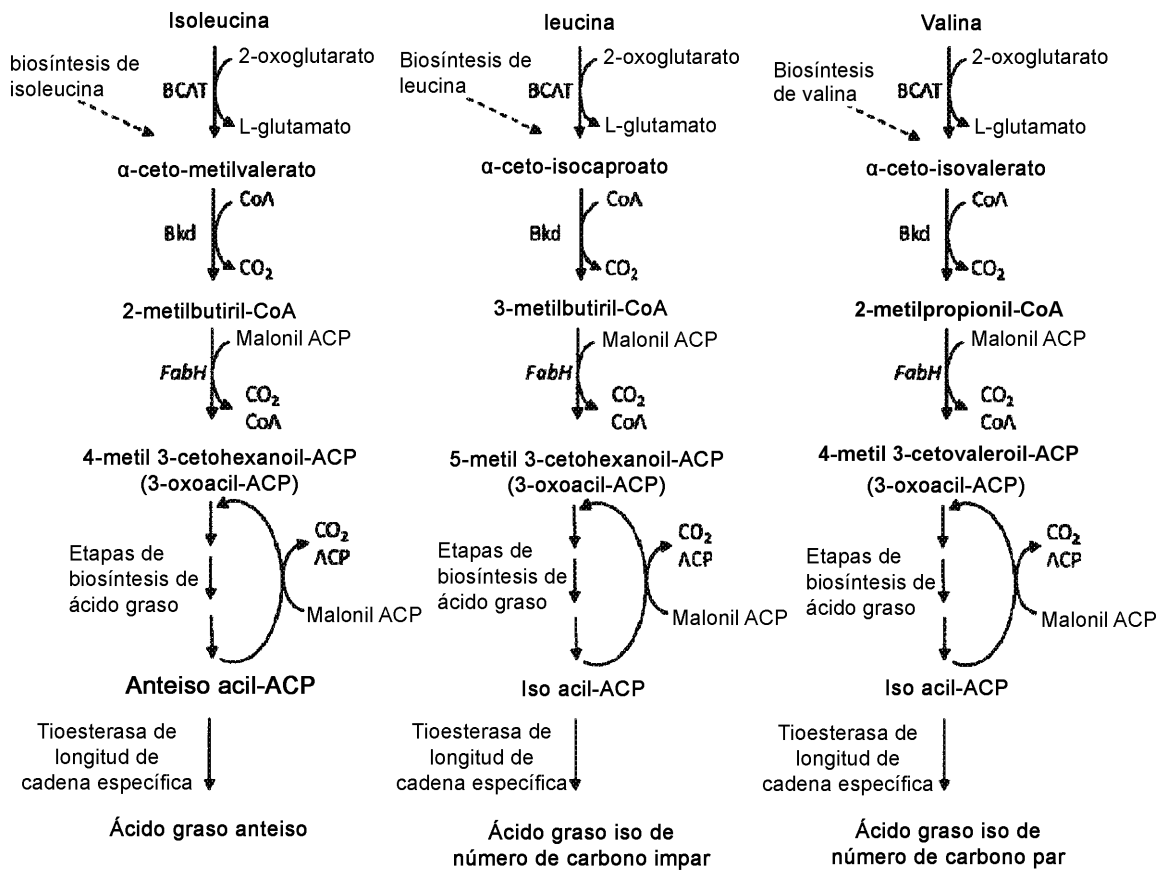


Figura 2: Ruta de biosíntesis de ácidos grasos anteíso dependiente de treonina

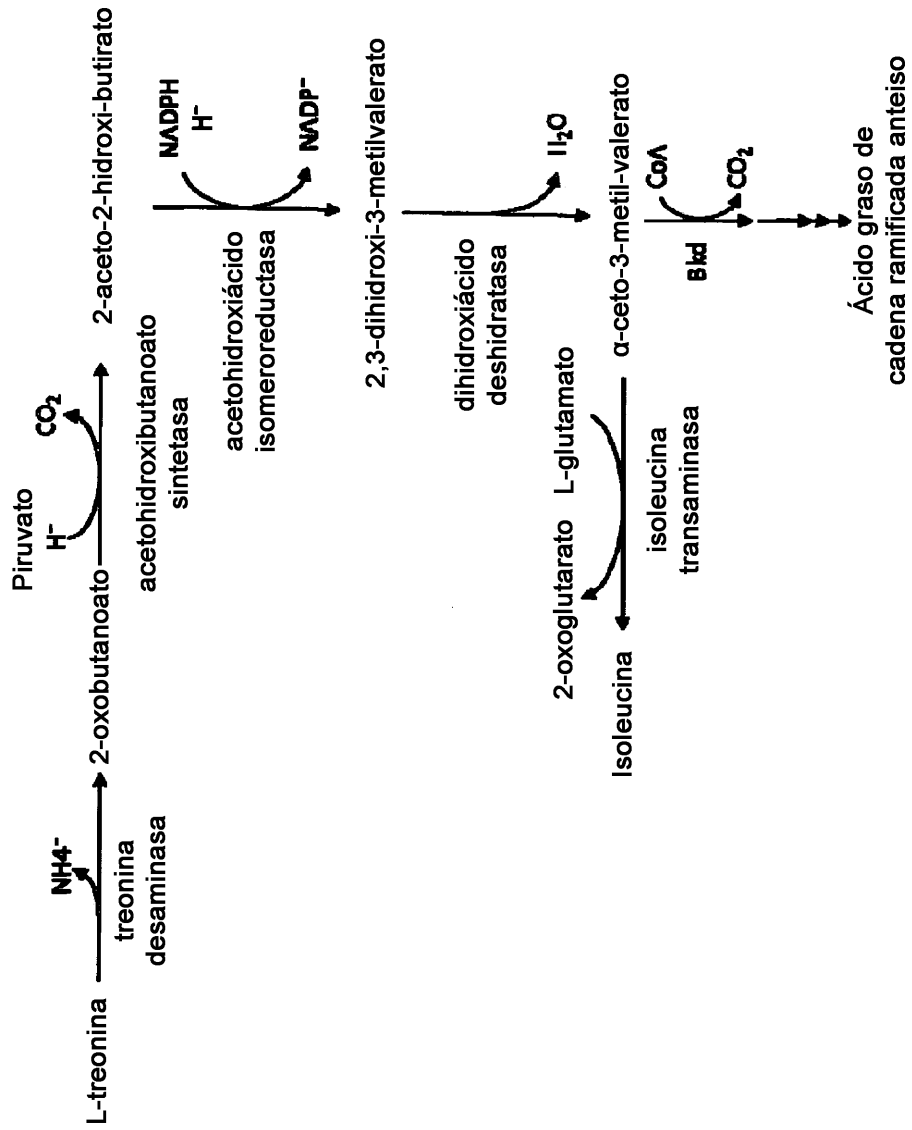


Figura 3: secuencia de ADN del operón bkd amplificado (SEC ID N.º: 1)

acagcagggagctgagctcccaaggcaactgagctatgacgtagctcattctggggggggaacggggcttatgcttgggggcaacagagccgctcagct  
cggcttcaaaaacagccgttctggaaaaggaaaaactcggggggaacatgtctgcatbaagggctgtaaccgagtaaaagcgcgcttagagagccgagga  
gtaaacgggacagctcgtgaaagccgaacaaatcgggagtggaagccgctgggctgtccctcaacttggaaaagctggcagcagcttagcaagccgctt  
ttgataagcttgcaggggggtgtaaatcatttaattgaaaaggaaaatggcgtgtaacccggatagggcgtatctttggagccgtcaactctctc  
tcggctgcccgggaacaaatctctgttggaggggaaatggcgaagaaaatgacatgctgataccggaacaaagtgatcatggcaacaggatcaagacc  
agaaatgctccgggtcttggaaatggagcgttaagctctgactgacttccagatggagggcctcccaaatggagggagctggcacaagctcaactcaatctgctg  
gcccgggggttctcggtaaccgaatggggcctcfaagctccatgattttggggtlaaggttaacgggtlattgaaatcggcggatccgcatattgcccagctga  
agatctagagatctcaaaaagaatggaaagcttctctaaagaaaaggacacagctccataacggggcacaagtgctggctgacacaaatgacaaaa  
acatacagcagatctcagcacaacagcgggaaaaagcgggaaacccgttaactatctctgctgagaaaatgctctgttccatcggcagagcagcccaat  
tcgaaaggcatcggcttagagaaacccgataattgttactgaaaatggcagatgattccagtcacatgaaaagctgcaaaacgaaagaaatcccaatattatg  
aatcggagagcgttaactggggccttggcagtttagctcagcttggcttccatgagggaaatatttggctgttggagcaatttggcaggtctcaactccgcaatccg  
cttgaatccgagcgttggcggagagtgcaatttactcaagccctgaagctgcccagctgtctggcttaaccgagagatgaagcaaaagggcaaaagggcaaa  
tcaaaaacggcaagttcccaattatggcagatgggaaaagcgttggatagggtgaaaagcagcgttctggctcaaaaatcggctgagcaagcagcagca  
tgatattctcgggcttcaatgatttggcccagctgtaacccgcatgatttctgaaagcgggtcttggcaaaatgctggagcgaacaacccgttggaggtc  
ggcacaacgatacgaacccgcatcccaacgcttctgaaagcaatgggagagcgtggcgttggcagcagggagcaaaagcgttccatcttcaaaaagcaaa  
gaggggcttgaatgagtaacaacccgacatcaagcactagggctgactgataaggaagccgttgaatgataagaaccatgctgttagcaaaagaaaat  
cgaatgaaagaaatgctggctgttaaaacggcttctggcaaaaatcccatcttgaatctctctgcaagggacaggaagcagcagcagcttagggagcggcttctcga  
cttggccgctgaaatggatctgctattggccttactcagagagacatggggctgctggctggcgttggcaatgacagcaaaagcaatcaagatgctcgggt  
ttggcaaaagcagcagatccgaactcagggagcctccagatgcccgggacatctcgggacaagaaaacccgcaatttggagcgggactcaactcgggttac  
aaacgaagtgccgcaacgagctgggtattggccttggcggagcgttaggagaaaagagataccgcaacatgatttccatccgggggagggcttctcaaac  
caagggcagatttccatgaaagggcaaaccttggcggctgctcaatagcctgcccgttatttctcaatgctgaaacaacaacaatccgcaatctcagctgctt  
acgataaagcaagctccgactgtagaaacatttccgacggctgcaacagggctatgggagctgctggcgttaacgtgaaatggaaatgataccgctggaggtt  
tcaagcggcttaaggaagcagcggaaagggcagcagagggagggccgcaacttaattgaaaagcaattcttccgcttcaaccccaattccagtgat  
gacgatgacagcagcacaagggccgtgaaagcagcagaggaagcgaaaaagctgactccctgcttaattatcaagcttacttaaaaggaacagggcc  
tgcctgcccagatgagatagaacaacaacatgctggatgaaatccagcccaatogtaaaatgaaagcagcggatgaaagcgggaaaccccaatctgcaagctc  
tgagctcagcgttggatctatgcttctcggaaagtagggaggaagcaacaatgctcagtaattgcaatattgataattgataagcaatcttgggagaaagga  
aatggaaagcagatctcggcgttctcgtcttggggagagatgtaggaagaaaagggcgtgcttcaaaagcagcagcgggactctatgaaacaatctggg  
gaaagcggcgttattgatacggcggcttgcctgaaatctgcaatccgcaagggctcggtaaccggagcggcaatgtagcgaatgagacagatctgctgaaatcc  
agtttgcctgatttccatctgcccggcagtcacaacaatatttccgaaagcggctaaaatccgctaccgcaagcaacaatgactggagcttccgactgct  
cgtcagagcggcactcagcgggagggcctgcaacggagccctgtatcaattctcaactcagctcgaagcaatcttccgcaacccagcggcagctgaaatctg  
atgcaatcaaccccaatgacccgcaaaagggctctcaaaaagcggcagctcgtgacaggaagccccgctgctgttcttggagcaaacggggcgaatccgct  
tgaataaagggcagggctcggcctgagatattgctctgcaaatccgcaagggcggagctgaaaagggaaagggcagcagcagatccagctgatacacaacgg  
cctgctgttccactcggccttcaaaagctgcaagaaactcggcaaaaagatggcaattcagcccaatgctggggcaattgagggcaattgagggcaattgagca  
aaagaaagcctcaatcgaagcctcggctcaaaaacttggaaaggttctcttggctcaagaaagatcaaaaagaaagggcaagcagctgagcgaagctagc  
ttatattcggagcattgcttctgctgacttagagcggcggcaaaaagggcttggaggtcctgataattccggctatgctcttctgcccagcaatggaaaa  
atacctttagtgcacaacctgataaagtggaagcggcagatgagagaaatcagcggaggttcaaaagcgttaagggaggaatacaactcaatggcaatgaaaca  
aatgacgatgcccggcagctgggaaagggctaaacagaggggagcagatcagcaaaatggcttggctcccccggctgataaagtgaaacaatccgctcagatc  
gcccgaagctatgacagatcaaggtaaatgacagaggttccgctctcttctcaactggtagcaaaagagcctgctgggagaaagggcacaacccctgcaag  
tcgggaaatagatttgcgaactggaacagagggcgcgaatccggctgcaaaaacacagcaacagccagcagcacaagagcctgctgagaaacccctg  
tgcaaaaggtcctgggagcagccgactcagcccaataaaaagcgtctactcggcagctgtctctcggcttggcgggagagcaacggcattgacctcagatca  
gtgacaggaactggtgcccggcggggcctcaacagaaaagatattcagggcttaattgaaacagggcggcgtgcaagaaacagaaatccctgagggagctga  
aaacagcagctcctgcccgaagctctgcaatcaaaaactgagccaaaagagagagcctcaatctctgctctgcaagccggctgataaaagaaatccctgt  
cagcaggtgtaagaaagggcaatgcttcccaatgaaagcgaagcgaacaaacagaaatccgcaatgcttggagcaatgagggagctcagcgtcaacaatg  
gttgcataatcgcacaagctataaaagatctctttaaagaaacagaaagggcttcaatttaacgctctctcggcttcttggtaaaagcggctcggctcagggct  
taaaagaaatcccgcaaatgaaatggcagcttggcgggggggcaaaaatctctcagaaaaaaggaatcaatatttcaattggcgttggcagcagaggtct  
tttatttggctcggctgactaaaacagctgataaaacaaatcaaaagcaattcggaaaagacaatcaacggcctagctcaaaaaggtgaaagcaggaagaa  
ctcaactgcaagatgacatgcaagggagggcagcttcaacgtcaaaaacagagctcgttcgggtctgctcaagctgagtgggcattatcaactcctcaggg  
ctgagatctctcaagtagaaatcccaacgtcaaaaacggggcttctcaatggcaaatggcaatgattgctgctcagagacatgggttaactctgctcgtctgct  
agatacagagctgctgagcggctcgtgctggggcagatctctcggcagctgaaacaaatcttagaaatcagatgcaagaaagcaatctgttctactaa  
ataagcaaaaagagcaatcttctgaggtcttggcttcaaaaatgctcctcttctcaatgctcttaattcaagcagatccgtaatttcaattctg

Figura 4: cebadores BKD

BKD1 (SEQ ID NO: 2) 5' GAG CAT GGG CCC ACA GAC AGG AGT GAG TCA  
CCA TGG CAA CTG AG 3'

BKD2 (SEQ ID NO: 3) 5' GAG ACC ACG CGT CGA AAT GAA AAT ACG GAT  
CGC TGA ATA ATA AAG CAT AG 3',

Figura 5: secuencia de ADN del gen del *lpdV* del operón *bkd* (SEC ID N.º: 4)

atggcaactgagtatgacgtagtcattctctgggcgccgtaccggcggttatggttgcggcc  
atcagagccgctcagctcggcttaaaaaacagccgttgtggaaaaggaaaaactcggggga  
acatgtctgcataaaagcctgtatcccagagtaaaagcctgcttagaagcgcagaggtatac  
cggacagctcgtgaagccgatcaattcggagtggaacggctggcgtgtccctcaacttt  
gaaaaagtgcagcagcgttaagcaagccgttgttgataagcttgcagcgggtgtaaatcat  
ttaatgaaaaaaggaaaaattgacgtgtcaccggataaggacgtatccttggaccgtca  
atottctctccgctgcgggaaacaatttctgttgagcggggaatggcgaagaaaatgac  
atgctgatcccgaaascaagtgatcattgcaacaggatcaagaccgagaatgcttccgggt  
cttgaagtggacggtaagtctgtaactgacttcagatgagggcctccaaatggaggagctg  
ccacagtcfaatcatatgtcggcggagggttatcggatcgaatggcgtctatgctt  
catgatcttggcggttaaggtaacgggtattgaatacgggatcgcataattgcccactgaa  
gatctagagatttcaaaagaaatggaaagtcttcttaagaaaaaggcaaccagttcata  
acagggggcaaaagtgtgctgactgacacaatgacaaaaacatcagacgatatcagcatacaa  
gggaaaaaagacgggagaaacggttacctattctgctgagaaaaatgcttgtttccatcggc  
agacagggcaaatatcgaaggcatcggcctagagaacaccgatattgttactgaaaaatggc  
atgatctcagtcfaatgaaagctgccaacgaaggaaatctcatatttatgcaatcggagac  
gtaatcgggtggcctgcagttagctcagcttgccttccatgaggggaattatgctgttgag  
cattttgcaggtctcaatccgcatccgcttgatccgacgcttgtgcccgaagtgcatttac  
tcaagccctgaagctgcccagtgctggcttaaccgaagcgaagcaaaaggcgaacggcct  
aatgtcasaatcggcaagttcccatttatggcgattggaaaagcgttgtatcaggtgaa  
agcgcaggttttgtcaaaatcgtggctgacccagatcacagatgatattctcggcgttcat  
atgatggcccgcatgtcaccgacatgatttctgaagcgggtcttgccaaagtgtggac  
gcaacaccgtgggaggtcgggcaaacgattcaccgcataccaacgcttctggaagcaatt  
ggagaagctgcgcttgcggcagatggcaaaagccattcatttttaa

Figura 6: cebadores FabHA

- Bs\_939\_fabHA\_nco\_U38: (SEC ID N.º:5)  
 o 5' -- GAGACCATGGCTAAAGCTGGAATACTTGGTGTGGACG -- 3'
- Bs\_939\_fabHA\_pst\_L30: (SEC ID N.º:6)  
 o 5' -- CGCTCCTGCAGTCTTGTGTGCACCTCACCT -- 3'
- Bs\_939\_fabHA\_xho\_U38: (SEC ID N.º:8)  
 o 5' -- GAGACGCTCGAGATGAAAGCTGGAATACTTGGTGTGG -- 3'
- Bs\_939\_fabHA\_pst\_L30: (SEC ID N.º:9)  
 o 5' -- CGCTCCTGCAGTCTTGTGTGCACCTCACCT -- 3'

Figura 7: Secuencia de ADN de fabHA de *Bacillus subtilis* (SEC ID N.º:7)

```
ATGAAAGCTGSAATACCTGGTGTGGACCTTACATTCCTGAGAAAGGTTTAAACAATCAT
GRCTTTGAAAAATGGTTGAAACTTCTGACGAGTGGATTCCGTACAAGAACAGCAATAGAA
GAAGAGAGARTGGCAGCAGATGATGTGTTTTCATCACATATCGCTTCTGCAGCAGGAAA
AATGGCCTGGARCAAGCTGAAGTGGCTGGCTGAGCACTCTGATATGATCTTGGTTGCCAAT
GTTACACCTGATCAGTCAATTCCTACGGTCTCTTGTATGATCAAGAACAACCTCGGCCG
AACAAGCCGTGTCTATGCAATACAGCCGGCTTGTGGGGCTTCATGTAAGGGGTGTA
ACCGTAAACAATTTATGAAATCCGGAACCTACAGCATGTTCTAGTTGTTGGTGTAGAG
AAGCTTCAAGCATTAACCACTGGGAAGACCCGCAATACAGCCGTTCTGTTGGAGACGGA
GCAGGCGCTGCGGTASTCGGGCCASTCAGTGTACAGAGGAACTCCTTCAATTTGAACTA
GGAGCCGACCGCACAGSCGGTCAACACTTGTATCTGAAATGAAAAACGACATBCAATCATG
AATCGAGSAGAAATTTCAAATTTGCAATTCAGTCCGCAAAATGGGAGATCATGCTAAATCTC
ATTGAAAAAGCCCGACTTTCAAAGAGGATGTGACTTTTGTATCCGCATCAGGGCAAC
ATCCGTATCATGGAGCTGCTCCGAGCGTTTAGAGCTTCCCTGTGAAAAAGATGTCFAAA
ACTGTTCAATAAATATGSAATACTTCTGCCCATCCATTCGGATCTCTCTTGTAGAAAGAA
TTGGAAGCCGTAATAATCAAGACCGCAATCTGCTCTTATGGTAGCGTTCCGGGAGCA
CTAACATGGCCCGCATTTGCAATCCGCTGGGCCGATAA
```

Figura 8: Secuencia de aminoácidos de FabHA de *Bacillus subtilis* (SEC ID N.º:10)

```
MKAGILGVGRYIPEKVLFNHDLKEMVETSDEWIRTRTGIERRIAADDFVSSHMAVAAK
NALEQAEVAEDELDMILVATVTPDQSFPTVSCMIQEQLGAKKACAMDISAACAGFMYGVV
TGRQPIESGTYKHVVLVGVVEKLSIITDWDNRNTAVLFGDGAGAAVVGVPVSDDRGILSFEL
GADGTGGQHLVLYLNEKRHTIMNGREVFKFAVRQMGESCVNVIEKAGLSKEDVDPLIPHQAN
IRIMEAAREERLELPVEHMSKTVHKYGNFSAASIPISLVEELEAGKIKDGDVVVMVGFGGG
LITWGAIAIRWGR*
```

Figura 9: cebadores FabHA

RC\_Bs\_978\_fabHB\_nco\_U36: (SEC ID N.º: 11)  
 ○ 5' – GAGACCATGGCAAAAAGCAAAAATTACAGCTATCGGC – 3'

RC\_Bs\_978\_fabHB\_pst\_L32: (SEC ID N.º: 12),  
 ○ 5' – GCTCCTGCAGGGAAGAAACATCAGAAGAACAG – 3'

RC\_Bs\_978\_fabHB\_xho\_U41: (SEC ID N.º: 14)  
 ○ 5' – GAGACGCTCGAGATGTCAAAAAGCAAAAATTACAGCTATCGG – 3'

RC\_Bs\_978\_fabHB\_pst\_L35: (SEC ID N.º: 15)  
 ○ 5' – GCTCCTGCAGGGAAGGAAGAAACATCAGAAGAACAG – 3'

Figura 10: Secuencia de ADNc de fabHB de *Bacillus subtilis* (SEC ID N.º:13)

ATGTCAAAAGCAAAAATTACAGCTATCGGCACCTATGGCCGAGCAGACGTTAAACCAATGCCGATTAC  
 AAARGATCGTTGATACCTCTGATGAAATGGATCGTTCAGGACACAGGAATGAGAGNACGCGGATTCGCGA  
 TGAACATCAATTTACCTCTGATTTATGCAATGCAAGCGGTGAAAGAAATCTCAGACGCGGTTATTAAGGAAACG  
 CTTGATGATGTCGATATGATCCCTGGTTCGACACACACATCCGATACCGCTTTCCGACGACGGCATGCC  
 GCGTACAGGAATATTTGGCTGGGAAAGCACCGGCGCGCTGGATATTAATGGACATGCGCGCGGCTGAC  
 ATACGGCTCCATTTGGCAAAATGATTTGATCAGCTCTGGCCCTTCAATCAAAAATTTCTCGTCTTGGCGGA  
 GAGACCTTATCAAGGTAACCGATTATACCGATGAAACGACATGGTACTGTTGGCGGATGCGCGGGTGC  
 CGCTGTATGATGAGACGAGATGAAAGAGACCGCGGATTTCTTGCCTCTGACAGGAACAGCGGGAACGG  
 DGGCGATATTTCTATCGTCCGCACTGCGAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAAT  
 ATGCTGCAAAAACCGACCGCAGCTTATATAATGGGCGCAAGACGCTCCCTGGGCAATTTGACGCGCTTT  
 TACATAAGCAGGACTCAGCTCCGATGATCTCGATTGGTTTTGTTCTCACAGGCGCAACTTGGCATGAT  
 CCAGCTCAATTTCTCAAAAACCGCTTCCGATGAAAAAACCGCTCAGTACTGTTGAGCCTACGGAAAC  
 ACCCTTCCGCTTCAATTCGTTTTGGCGCTCGATCTCCACTGAAAGCCGGGAAGCTCAAAAAGATCAAA  
 TCGTTTTCCTTTTGGGTTTGGCGCGGATTAACCTTACAGGATGCTTATTATATGCGGGATGTA

Figura 11: Secuencia de aminoácidos de FabHB de *Bacillus subtilis* (SEC ID N.º:16).

MSKAKITAIQTYAFERRLTNADLEKIVDTSDEWI VQRTGMREERIADENQFTSEDLCEAV  
 KNLKSRVKTSLDQVDMILVATTTEDYAFPSTAGRVQENYFGWESGALDINATCAGLTPYGL  
 HLANGLITSGLRQKILVIAGEYLSKVTDYFORTTCVLFQDAAGALLVERDEETPGFLASV  
 QSTSGNGDILYRAGLRMEINGVQLVSGKMYQNGHEVYKWAARTVPSEFERLLHKAGLS  
 SEDLQWFPVPHSANLHMIESICEKTPPIERTLTSVEHYGNVSSVSLVALDLAVKAGLKK  
 KDQLVLLPFGGGLTYTGLIRKGM\*



Figura 12: Secuencia de ADN de ácido graso de cadena media tioesterasa en medio de Mallard optimizada para el codón (SEC ID N.º: 17)

```

ATGGATAAAGTTATTGCACGTCCTTAAACGGCCTAATGCGTTATGCAGATTGATTTGTTTTCCGTGGGCRGGGGA
AACTGCTCAFTTTTCATCAGATGGTGTGAAGCGTTTTCAAGCATTATCGTTGTGCTGTGATTCGCCCTTGCCTGGCAGAGA
ATGCCCGGATACAGABCCGFTTCTGGAAGATATGGGTGAAGTCGTAATGAANTCAGAACGCCCTGCTTAAAGATPTGC
AAGAAAACCCGTTTGCATTTGTTGGCCATAGCTTTGGATCTTTTGTGACGCTATGCCACTGGCGGTACATCTTAAAGAAAA
CATGGATTAGAACCCTCCACATGTTTTCTCAGGCAGCTATGGCCCTCATTTGAACTACTTTCATTTGATGTAGAAAT
CCCCGAAGTAGAAGATTACCCCTTATTGCAACTGATTCATACACTTGCCTGCAACGCCCTGAATTTTCCAAAACGAAC
AGATCACAACACATCTGCTTCGCTTCTGAAAGAAATCAGAAAGTTCTTGTGACSTATCCTTGGCATGATGGCGGAAA
AAATACTTTTCTTCCGATCTGACATGTTTTAATGGTTCAGATGAGAAAAATCATGSCCTCAGAAGCATGGATTGCCATCAC
ATCAGCGGATACCGCATCTACTCTTTACCCGGAAACCAATTTTACTTGCATGGAACCTTCAAACGAACATTTCTGATCA
AATACATCACGAAATGTATTGAAAACAGCGATTTAA
    
```

Figura 13: Alineación del marco de lectura abierto (ORF) optimizado SEC ID N.º: 17) con la secuencia original (SEC ID N.º: 18)

```

Optimizado  1  ATGGATAAAGTTATTGCACGTCCTGATATAAACGGCCTAATGCGTTATGCGAGATTGATTTGT
Original     1  ATGGATAAGGTGATGSCCCCTCCATACAAAAGGCCAAATGCTCTCTGTAGGCTGATTTCG
Optimizado  61  TTCCCTGGGSCAGGCGGAAACTGGCTCAATTTTCATCAGATGGTGTGAAGCGTTTCAAGC
Original     61  TTCCCTGGGCTGGAGGTAAGTCTTCTTTATTGCGATGGTGGGAAAGCCTTCAGCAGC
Optimizado 121  ATTATCGTTGTGTCTGTGATTCGCTTCTGCTGGCAGAGAATGCCGGGATACAGAACCGT
Original    121  ATBATTGTAGTCTCCCTTATAAGGCTTCTGCGAAGAGAATGTCGCGATACGGAGCCTTT
Optimizado 181  CCTGAAGATATGGCTGAAGTCGTAATGAAATCAGGAACGCCCTGCTTAAAGATTGCA
Original    181  CCAGAAGACATGGCAGAGTAGTFAATGAAATACAAATGCTTTGTTAAAGATCTGCAA
Optimizado 241  GAAAAACCGTTTGCATTTGTTGGCCATAGCTTTGGATCTTTTGTGCGAGCTATGCACTGGCG
Original    241  GAAAAACCATTTGCATTTATTTGGTCACAGTTTGGATCTTTGCGTAGTTATGCACTTGCA
Optimizado 301  GTACATCTTAAAGAAAACATGGATTAGAACCAGGTCACATGTTTTTCTCAGGCAGCTAT
Original    301  GTACACTTGAAAGAGAAGCAGGATTAGACCCGCTCCATATGTTTTTCTCAGGGTCATAT
Optimizado 361  GGCCCTCATTTCTGAATACTTTTCATTTGATGTACAAATGCGGAACTGAGAGATTACGC
Original    361  GGCCACATAGTGAATATTTTCATCTGATGTACAAATGCGTGAAGTGAAGATAGTGC
Optimizado 421  TTATTGGAAGTATTACATCACTTGGCGGAACCCGCTGAATTTTGCAAAACSAACAG
Original    421  TTGCTTGAAGTTATACACACATTAGGAGGAACCTCCTCCTGAGTTTCTGCAAAATSAACAA
Optimizado 481  ATCACAAAACATCTGCTTCGTGTTCTGAAAGAAGATCAGAAAGTCTTGTGACGTATCCT
Original    481  ATCACCAAACATTTGTTACGTGTTTTTAAAGAAGACCAGAAAGTCTTGTGCACATATCCT
Optimizado 541  TGGCATGATGTGGGAAAAAATACTTTTCTTGGCATCTGACATGTTTTAATGGCTCAGAT
Original    541  TGGCAGATGTBAGAAAGAAATACCTTCTTGTGATCTTACCTGCTTTAAGGGTCTGAT
Optimizado 601  GAGAAAATCATGCTCAGAACCATGGATTGCCATCACATCAGGGGATACGAGCATCTAC
Original    601  GAAAAAAACCATGCTCAGAACCTGGATTGCAATAACAGTGGAGATACTTCCATTAC
Optimizado 661  TCTTTACCGGGAABCCATTTTACTTGGATGGAACCTTCAAAACGAAACATTTCTGATCAA
Original    661  AGTCTTCTCGAAATCACTTTTATCTAATGGAGCCTTCTACGAAACTTCTTGATAAAA
Optimizado 721  TACATCAGGAATGTATTGAAACAGCGATATTTAA
Original    721  TACATAACTAATGTATAGAAAATCTGACATATGA

```

Figura 14: Secuencia de ADN de ácido graso de cadena media tioesterasa en medio de mama de rata optimizada para el codón (SEC ID N.º: 19)

```
ATGGAAACAGCTGTAAATGCCAAATCACCCAGAAACGAAAAAGTGCCTTAACTCCTGTACCAAAACCCCGATGCMGT  
TTTAAACAGATTGTTTTCCCTGGGCTGGCGGAGGCAGCATTTCATTTGCCAAATGGGGACAGAAAATCAACGATTCTTT  
GGAAATCCATGCAGTACGCCCTGGCGGGAAGAGAAACACCCCTTGGCGAACCGTTTGGGAACGATATTACCAAATCGCAC  
ATGAAATCGTTACGGCGCTGCTTCCATCATCCAGGATAAAGCATTTCATTTTTGGGACATAGCTTGGCTCTTATATT  
GCTTTAATCACAGCCTTGTGGCTGAAAGRAAAAATACAAAATGGAAACCGTTGCATATCTTTGTGTACAGGCGCTAGCGCC  
TCATTCACATCAGCTCCGCAAGTCCCTGATTTGAACGAACTGACGGAAAGCAAGTACCGCATCATCTTTAGATTTG  
GAGGCACGCCGAAACATTTGATCGAAGATCAGATGTCTTGAGAAATGTTATCCCTTTGCTGAAAGCAGATGGCGGAGTT  
GTGAAAAAATTTATTTGATAAADCCTTAAAGCTCTTCTGTCACTGGATATTACAGGATTTTGGCTCAGAGATAC  
CATTAAGATATTGAAGATGGCAGGATCTTAAAGCGGCAATTTGATGTACACATGCTGGCGGGCATCAATTTTATC  
TTATGAAACCTGATAACGAAACCTTTATCAAAAATACATCGGAAATGCTTGGAACTGTCACTGACGTAA
```

Figura 15: Alineación del ORF optimizado (SEC ID N.º: 19) con la secuencia original (SEC ID N.º: 20)

```

Optimizado 1 ATGGAAACAGCTGTTAATGCCAAATCACCGAGAAACGAAAAGTGCCTAARCTGCTTGTAC
Original 1 ATGGAGACAGCAGTCAATGCTAAGAGTCCCAGGAATGAAAAGGTTTGAACGTGTTTGTAT

Optimizado 61 CAAAACCCGGATCAGTTTTTAAACTGATTTGTTTTCCCTGGGCTGGCGGAGGCAGCATY
Original 61 CAAAATCCTGATCAGTTTTCAAGCTGATCTGCTTCCCTGGGCGAGGAGGGCTCCATC

Optimizado 121 CATTGTGCCAAATGGGGACAGAAAATCAACGATTCCTTTGGAAGTCCATGCAGTACGCCITG
Original 121 CATTGTGCCAAGTGGGGCCAAAAGATTAACGACTCTCTGGAAGTGCATGCTGTAAGACTG

Optimizado 181 GCGGGAAGAGAAACACGCTTGGCGAACCGTTTGGGAACGATATTTACCAAATCCGAGAT
Original 181 GCTGGAAGAGAAAACCCGACTTGGGAAACCTTTCGCAAAATGACATCTACCAGATAGCTGAT

Optimizado 241 GAAATCGTTACGGCGCTGCTTCCATCATCCAGGATAAAGCATTGTCATTTTTCCGGACAT
Original 241 GAAATCGTGACCGCCCTGTTGCCATCATTCAGGATAAAGCTTTTGGCGTTTTTGGCCAC

Optimizado 301 ACCTTTGGCTCTTATATTGCTTTAATCACAGCCTTGTGCTGAAAGAAAAATACAAAATG
Original 301 AGTTTTGGATCCTACATTGCTCTTATTACTGCTCTGCTCCTAAAGGAGAAAATACAAAATG

Optimizado 361 GAACCGTTGCATATCTTTGTGTACGGCGCTAGCGCCCTCATTCTACATCAGTCCGCCAA
Original 361 GAGCCGCTGCATATTTTTGTATCCGGTGCATCCGCCCTCACATCAACATCCCGGCCCTCAA

Optimizado 421 GTCCCTGATTTGAAACSAACGTACGGGAGAACAAAGTACGGCATCATCTTTTAGATTTTGGA
Original 421 GTTCTGATCTTAAACSAATTGACAGBAGAACAAAGTACAGACATCACCTTCTGGATTTCGGA

Optimizado 481 GGCACGCCCAAGCATCTCATAGAAGACCAGGATGTTCTGAGGATGTTTATCCCTTTGCTG
Original 481 GGCACGCCCAAGCATCTCATAGAAGACCAGGATGTTCTGAGGATGTTTATCCCTTTGCTG

Optimizado 541 AAAGCAGATGCGGGAGTTGTGAAAAAATTTATCTTTGATAAACCGTCTAAAGCTCTTCTG
Original 541 AAGGCAGATGCTGCGCTTGTGAAAAAATTCATCTTTGACAAGCCCTCCAAAGCTCTTCTC

Optimizado 601 TCACTGGATATTACAGGATTTTAGECTCAGAAAGATACGATTAAGATATTGAAGGATGG
Original 601 TCTCTGGACATAACGGGCTTCTTGGATCTGAAAGATAAATAAAGGACATAGAAGGCTGG

Optimizado 661 CAGGATCTTACAAGCGGCAAAATTTGATGTACACATGCTGCCGGCGGATCATTTTTATCTT
Original 661 CAAGACCTAACCAGTGGGAAGTTTGTATGTCCACATGCTGCCAGGGGACCACCTTTTATCTG

Optimizado 721 ATGAAACCTGATACGAAAACCTTTATCAAAAATACATCGCGAAATGCTTGGAACTGTCA
Original 721 ATGAAACCTGATACGAAAACCTTTATCAAAAATACATAGCCAAAGTCTTGGAACTGTCC

Optimizado 781 TCACTGACGTAA
Original 781 TCACTCACTTGA
    
```

Figura 16: Efecto del suplemento de isoleucina sobre la producción de ácido graso anteiso.

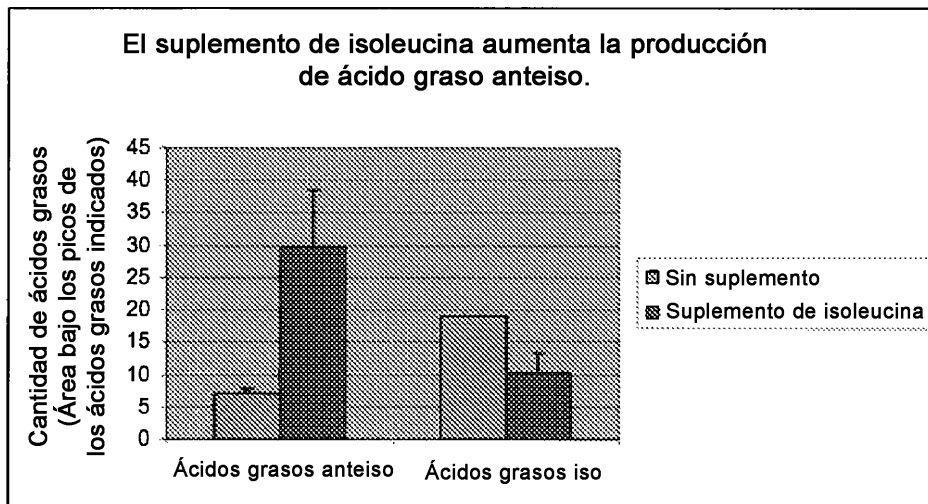
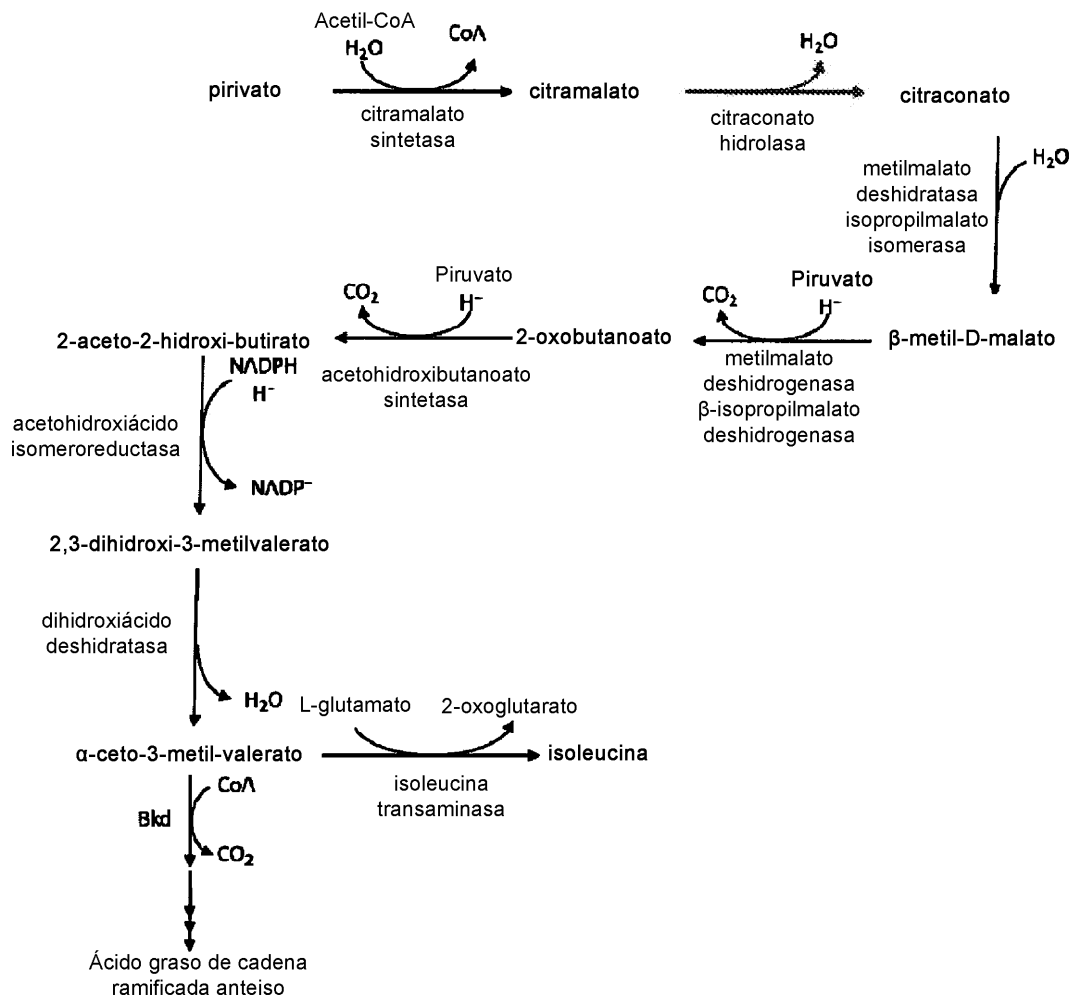


Figura 17: Ruta de síntesis de ácidos graso anteiso independiente de treonina



**Figura 18: Secuencia de ADN del gen bkdAA del operón bkd (SEC ID N.º: 21)**

atgagtacaaaaccgacatcaagcactagggctgactgactcagggaagccgttgatatgtat  
 agaaccatgctgttagcaagaaaaatcgatgaaagaatgtggctgttaaaccgttctggc  
 aaaattccatttgaatctcttgtcaaggacaggaagcagcacaggtaggagcggcttcc  
 gcacttgaccgtgaaatggattatgtattgocgtactacagagacatgggtgtcgtgctc  
 gcggttggcatgacagcaaaaggacttaatgatgtccgggttggcaaaagcagcagatccg  
 aactcaggagggccagatgcccggacatttccgacaaaagaaaaaccgcatgtgacg  
 ggatcatctcgggttacaacgcaagtgccgcacgcagtcgggtattgocgttgcgggacgt  
 atggagaaaaaggatctcgcagccttggttacattcggggaagggtottcaaaccaagge  
 gatttccatgaagggggcaaaccttgcggctgtccataaagctgcccgttatttccatgtgt  
 gaaaaacaacaaatacgcacatctcagtgcccttacgataagcaagtcgcagtgagaaacatt  
 tccgaccggtgccataggctatgggatgccctggcgtaacctgtgaatggaaatgatccgctg  
 gaagtttatacagcgggttaaagaaacacgcgaaaggggcacgcagagggagaaagcccgaca  
 ttaattgaaaacgatttcttaccgccttacaccacattccagtgatgacgatgacagcagc  
 tacagagggccgtgaagaaatgagaggaagcgaaaaaaagtgatcccctgcttacttatcaa  
 gcttactttaaagaaacagccctgctgtccgatgagatagaacaaaccatgctggatgaa  
 attatggcaatcgtaaatgaagcgcagggatgaagcggagaacgccccatatagcagctcct  
 gagtcagcgttggattatgtttatgcgaagtag

**Figura 19: Secuencia de ADN del gen bkdAB del operón bkd (SEC ID N.º: 22)**

atgtcagtaatgtcatatattgatgcaatcaatttggcgaatgaaagaagaaatggaacga  
 gattctcgcgttttcgtccttggggaagatgttaggaagaaaaggcgggtgtgtttaaagcg  
 acagccggactctatgaacaatttggggaagagcgcgttatggatagccgcttgcgtgaa  
 tctgcaatcgcagggagtcgggtatcggagcggcaatgtaacggaatgagaccgatgtctgaa  
 atgcaqsttggctgatttccattatgcccgcagtcacccaaattatctctgaagcggctaaa  
 atccgctaccgcagcaacaatgactggagctgtccgatgtgctcagagcgcacatacggc  
 ggagcgtgcaaggagccctgtatcattctcaatcagtcgaagcaatttccgccaaccag  
 cccggactgaaaatgtcatgcatcaacaccaatgacgagcaaaagggtctttaaagcc  
 gcagttcgtgacgaagaccctgctgtttttgagcacaagcgggcataccgctctgata  
 aagggcaggggttccggctgatgatattgtcctgccaatcggcaaggcggagctaaaaagg  
 gaagggcagcagatcacagtgatcacatacggcctgtgtgtccacttcgcttacaagct  
 gcagaaagctctcgaaaaagatggcatttccagcgcagtggtggatttaagaaacagtttac  
 ccgcttgataaaagaagccatcagagctgctgccaactggaaagggtcttcttggctc  
 acagaaagatacaaaaagaagcagcagatcatgagcgaagtagccgcaattatataccgagcat  
 tgtctgttcgacttagacgcgcccgatcaaacggcttgcaggtccttgatattccggctatg  
 ccttatgcccagcaaatggaaaaatactttatggtcaaccctgataaagtggaagcggcg  
 atgagagaattagcggagttttaa

**Figura 20: Secuencia de ADN del gen bkdB del operón bkd (SEC ID N.º: 23)**

atggcaattgaacaaatgacgatgcccagcttggagaaagcgttaacagaggggacgatc  
 agcaaatggcttgtcgcctccgggtgataaagtgaacaaatacgatccgatcgggaagtc  
 atgacagataaaggtaaatgcagaggttccgtctctcttttactggtacgataaacagagctt  
 gtgggagaagaaggccaaacccctgcaagtccggagaaatgatttgcaaaattgaaacagaa  
 ggcgggaatccggctgaacaaaaacaagaacagccagcagcatcagaagccgctgagAAC  
 cctgttgcaaaaagtgctggagcagccgatcagcccaataaaaagcgtactcgcagct  
 gttctcctgttggccggagagcagccgatcagctcagatcaagtgcaggaactgggtgcc  
 ggcggcgcgatcacacgaaaagataatcagcgccttaattgaaacagggcggcgtgcaagaa  
 cagaatcctgaggagctgaaaaacagcagctcctgcaaccggaagtctgcatcaaaacctgag  
 ccaaaaagaagagacgctcatatcctcgcgtctgcagccgggtgataaagaaatcctcgtcacá  
 ggtgtaagaaaagcaattgcttccaatatgaagcgaagcaaaacagaaattcccgcatgct  
 tggacgatgatggaagtccagctcacaaatatggttgcatatcgcaacagtaataaaagat  
 tcttttaagaagacagaaggctttaaatttaacgttctctcgccttttttgtaaaagcggct  
 gctcagggcttaaaagaattcccgcaaatgaatagcatgtggggcggggacaaaattatt  
 cagaaaaaggatatacaatatttcaattgacagttgccacagaggattctttatttggttccg  
 gtgattaaaaacgctgatgaaaaaacaaataaaggcattggcgaagacattaccggccta  
 gctaaaaaagtaagagacggaaaactcactgcagatgacatgcaggagggcacgcttacc  
 gtcacaacaacaggttccgttcgggtctgctcagtcgatgggcattatcaactaccctcag  
 gctgcgattcttcaagtagaatccatcgtcaaacgcccgggttgatggacaatggcatg  
 attgctgtcagagacatggttaatctgtgcctgtcattagatcacagagtgcttgacggt  
 ctctgttgccggacgatcctcggacagagtgaaacaaattttagaatcgattgacgagaag  
 acatctgtttactaa

**Figura 21: Secuencia de la proteína del gen lpdV del operón bkd (SEC ID N.º: 24)**

MATEYDVVILGGGTGGYVAAIRAAQLGLKTAVEREKLGSTCLHKGCIPSKALLRSAEYV  
 RTAREADQFGVETAGVSLNFEKVQQRKQAVVDKLAAGVNLMLKKGRI DVYTYGRI LGPS  
 IFSPPLPGTISVERGNGEENEMLIPKQVLIATGSRPRMLPGLEV DGRSVLTSDEALQMEEL  
 PQSIIIVGGGVIGIEWASMLHDFGVKVTVIEYADRILPTEDELEISKEMESLLKKKGIQFI  
 TGAKVLPDTMKTSDDISIQAEKDGETVTYSAEKMLVSIQRQANI EGIGLENTDIVTENG  
 MISVNESQTKESHYIAGVIGGLQLAHVASHEGIIA VEHFAGLNPHPLDPTLVFKCIY  
 SSPEAASVQLTEDEAKANGHNVKIGRPFMAIGKALVYGESDGFVKIVADRDTDDILGVH  
 MIGPHVTDMI SEAGLAKVLEATFWEVGTIHPHETLSEAI GEAAALADGKAIHF

**Figura 22: Secuencia de la proteína del gen bkdAA del operón bkd (SEC ID N.º: 25)**

MSTNRHQALGLTDQEA VDMYRTMLLARKIDERMWLLNRSKIPFVISCQQQEEAAQVGAAP  
 ALDREMDYVLPYRDMGVVLAFGMTAKDLMMSGFARAADPNSSGGRQMPGHFGQKKNRTVT  
 GSSPVTQVPHAVGIALAGPMEKKDIAAFVTFGEGSSNQGFHEGANFAAVHKLFPVIFMC  
 ENNKYAI SVFPYDKQVACENISDRAIGYGMFGVTVNGNDPLEVYQAVKEAREPARRGEGPT  
 LIETISYRLTPHSDDDDSSYRGREEVEEAKKSDPLLTQAYLKETGLLSDEIETQTMLE  
 IMAIVNEATDEAENAPYAAPESALD VVYAK

**Figura 23: Secuencia de la proteína del gen bkdAB del operón bkd (SEC ID N.º: 26)**

MSVMSYIDAINLANKEEMERDSRVFVLGEDVGRKGGVFKATAGLYEQFGEERVMDTFLAE  
 SAIAGVIGAAAMYGMRI AEMQFADFIMPAVNQIISEAKIRYRSNNDWSCPIVVRAPYG  
 GGVHGAALYHSQSVEAIFANQPLKIVMPSTPYDAKGLLKA AVRDEDPVLF FEHKRAYRLI  
 KGEVPADYVLP I GKADV KREGDDITVITYGLCVHFALQAAERLEKDGISAHVVDLRTVY  
 PLDREAIIEAASKTGKVLVLTEDTKEG SIMSEVAAI ISEHCLFDLDAPIKRLAGPDI PAM  
 PYAPIMEKYFMVNPDKVEAAMRELAEF



**Figura 24: Secuencia de la proteína del gen bkdB del operón bkd (SEC ID N.º: 27)**

MAIEQMTMPQLGESVTEGTISKWLVAPGDKVNKYDPIAEVMTDKVNAEVPSSFTGTITEL  
 VGEEGQTLQVGMICKIETEGANPAEQKQEPAASEAAENPVAKSAGAADQPNKKRYSFA  
 VLRLAGEHGI DLDQVGTGTGAGGRITRKDIQRLIETGGVQEQNPEELKTAAPAPKSASKPE  
 PKEETSYPASAAGDKEIPVTGVRKATASNMRKSKTEIPHAWTMMEDVDTNMVAYRNSIKD  
 SFKRTEGFNLTFFAFFVRKAVAQALKEFPQMNSMWAGDKIIQKKDINISIAVATEDSLFVP  
 VIKNADEKTIKGIARDITGLAKKVRDGLKLEADDMQGGTFTVNNVTGSFSGVQSMGIINYFQ  
 AAILQVESIVKRPVVMNMGMIAVREMVNLCLESLDHRVLDGLVCGRFLGRVKQILESIDEK  
 TSVY

**Figura 25: Secuencia de la proteína de la ácido graso de cadena media tioesterasa en medio de Mallard (SEC ID N.º: 28)**

MDKVIARPYKRPNALCRLICFPWAGGNCSEFFIRWCEAFSSIIVSVIRLAGRECRDTEPF  
 PEDMAEVVNEITNALLKDLQEKPPALFGHSFGSFVSYALAVHLKEKHGLEPVHMFSGSY  
 GPHSEYFHLMYKLPEVEDSRLELIHTLGGTPEFLQNEQITKHLRLVVKEDQKVLVTYP  
 WHDVRKKYFSCDLTCFNGSDEKNHGSEAWIAITSGDTSIYSLPGNHFYLMEPSNETFLIK  
 YITKCIENSDI

**Figura 26: Secuencia de la proteína de la ácido graso de cadena media tioesterasa en medio de mama de rata (SEC ID N.º: 29)**

METAVNAKSPRNEKVLNCLYQNPDAVFKLICFPWAGGSIHFAKWQKINDSLEVHAVRL  
 AGRETRLGEPFANDIYQLADEIVTALLPIIQDKAFAFFGHSFGSYIALITALLLKEKYKM  
 EPLHIFVSGASAPHSTSRPQVPDLNELTEEQVRHLLDFGGTTPKHLEDQDVLRMPIPLL  
 KADAGVVKKFIYDKPSKALLSLDITGFLGSEDTIKDIEGWQDLTSGKFDVRMLPGDHFYL  
 MKPDNENFIRNYIAKCLELSSLT

Figura 27: Producción de ácido graso anteiso en células huésped que expresan treonina desaminasa (*tdcB*) y acetohidroxiácido sintetasa (*ilvIH* G14D)

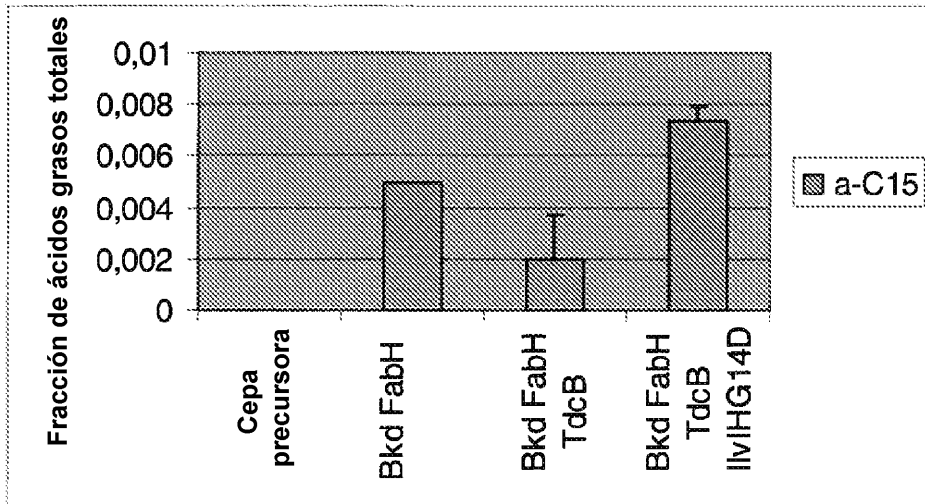


Figura 28: Producción de ácido graso anteiso en células huésped que expresan treonina desaminasa (*tdcB*) y acetohidroxiácido sintetasa (*ilvIH*)

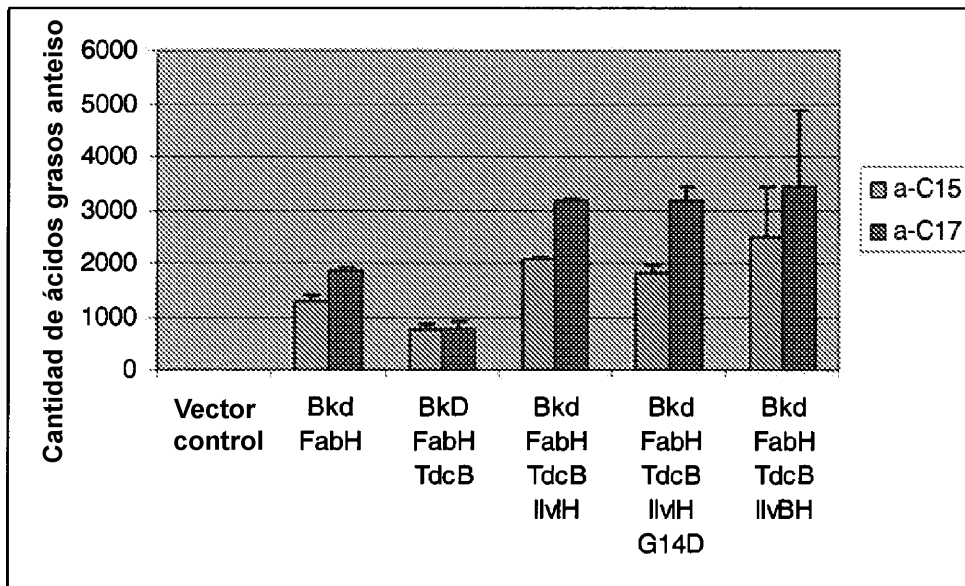


Figura 29: Producción de ácido graso anteiso en células huésped que expresan treonina desaminasa (*tdcB*) y acetohidroxiácido sintetasa (*ilvIH ilvIH G14D*)

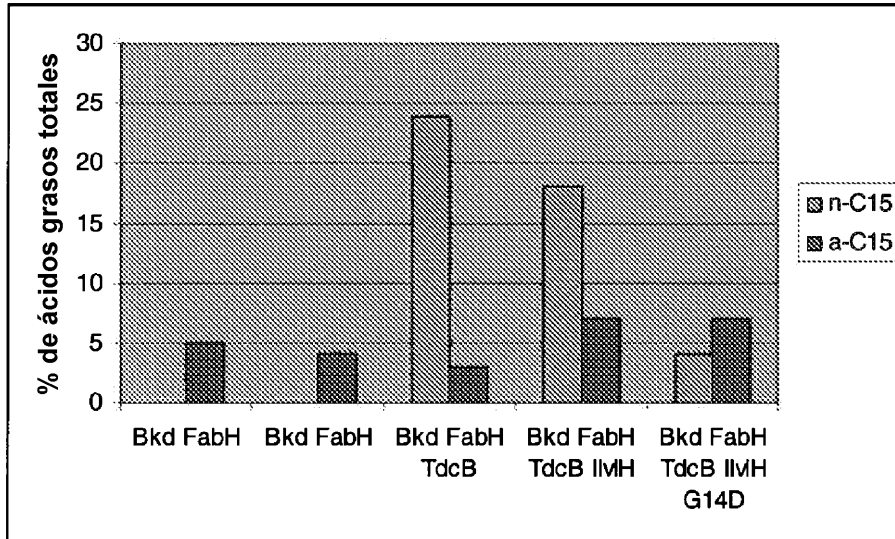


Figura 30: Producción de ácido graso anteiso en células huésped que expresan treonina desaminasa (*tdcB*) y acetohidroxiácido sintetasa (*ilvGM*)

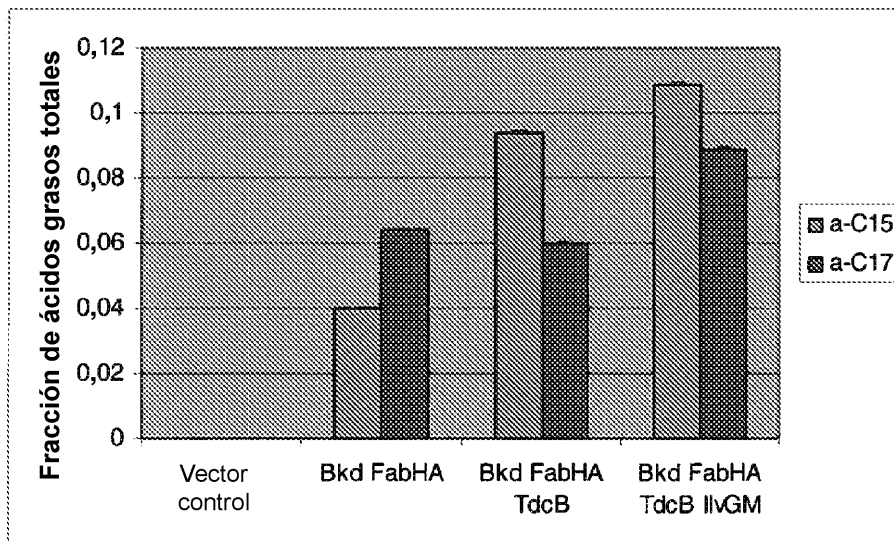


Figura 31: Producción de ácido graso anteiso en células huésped que expresan citrato sintetasa (*cimA*), *leuB*, *leuC*, *leuD*, y *ilvIH* (G14D)

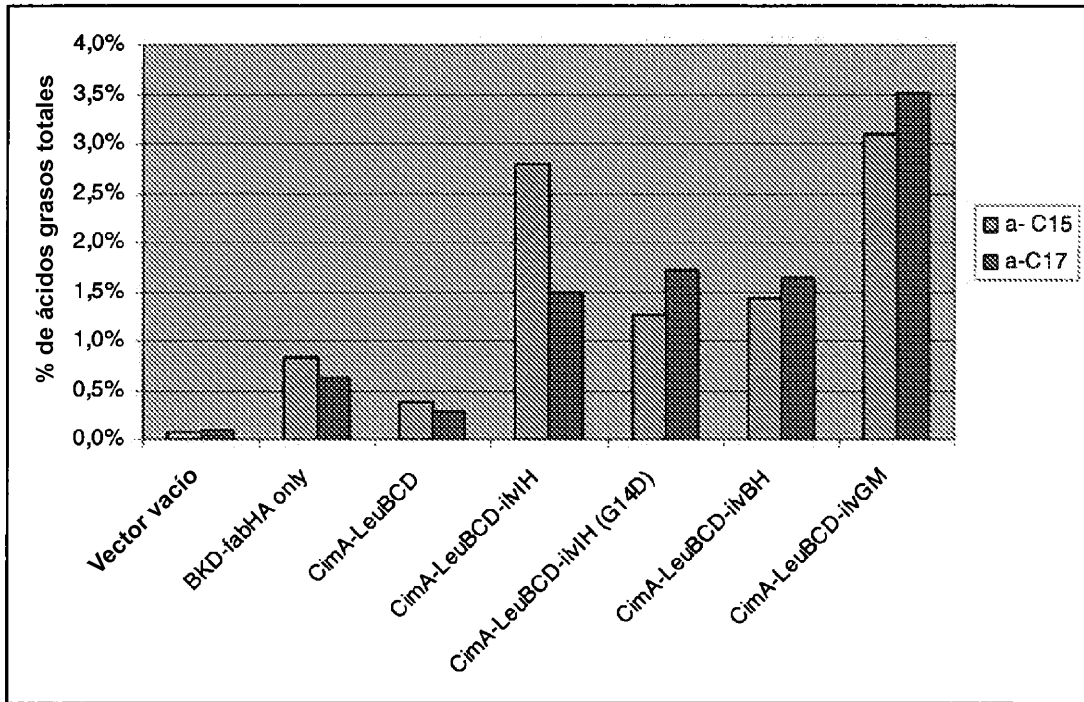


Figura 32: Producción de ácido graso anteiso en células huésped que expresan tioesterasa (*tesA*)

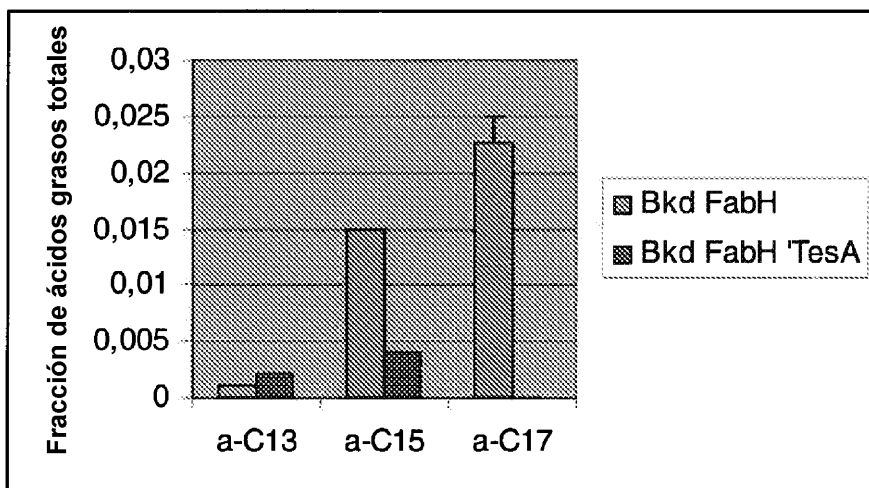


Figura 33: Producción de ácido graso anteiso C13, C15 y C17 en células huésped que expresan tioesterasa ('tesA)

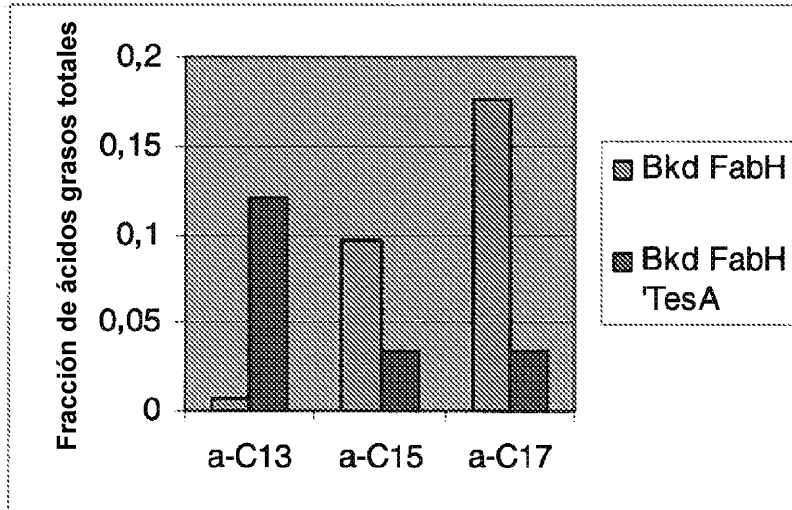


Figura 34: Tiamina aumenta la producción de ácido graso anteiso.

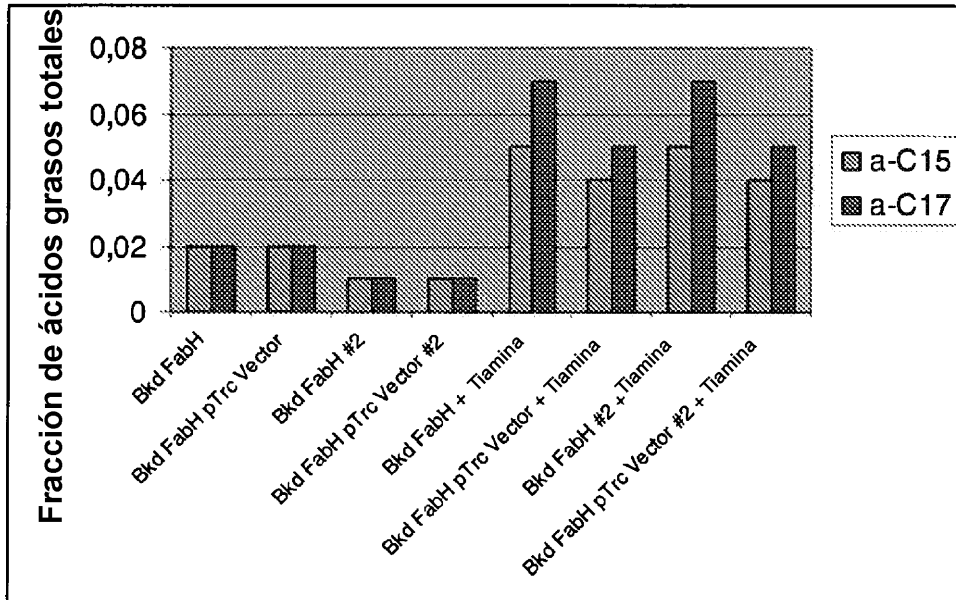


Figura 35: Producción de ácido graso anteiso en *E. coli* *ilv* deficiente en *E*

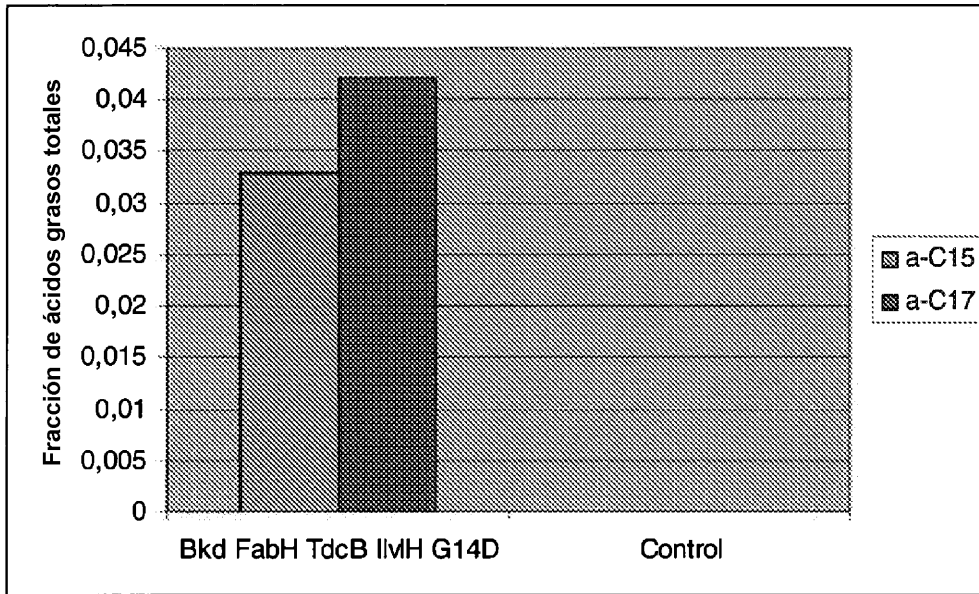


Figura 36: Producción de ácido graso ramificado en *E. coli* que expresa *L. monocytogenes fabH* y *B. subtilis bkd*

