

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 757**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 1/22 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2011 E 11806357 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2593540**

54 Título: **Microorganismos con rango de utilización de sustrato ampliado**

30 Prioridad:

16.07.2010 US 364898 P
16.07.2010 EP 10169808

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.05.2016

73 Titular/es:

NESTE OYJ (100.0%)
Keilaranta 21
02150 Espoo, FI

72 Inventor/es:

SICHWART, SHANNA;
HASCHENHERMES, BIRGIT;
BRÖKER, DANIEL;
STEINBÜCHEL, ALEXANDER;
HETZLER, STEFAN y
KOSKINEN, PERTTU

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 571 757 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microorganismos con rango de utilización de sustrato ampliado

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos microorganismos que tienen capacidad mejorada para la utilización de azúcares monoméricos que se encuentran en fuentes renovables, en particular en lignocelulosa. Más específicamente, la invención se refiere a hospedadores de *Ralstonia* y *Cupriavidus* modificados genéticamente y a métodos de uso de los mismos.

Antecedentes

La lignocelulosa es una fuente renovable principal que tiene diversas aplicaciones, tales como la materia prima para productos químicos a granel. Los componentes principales de la lignocelulosa son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. La fracción de celulosa comprende polímeros del azúcar hexosa, la glucosa. La fracción de hemicelulosa está principalmente compuesta por polímeros de azúcares de pentosa, xilosa y arabinosa, y de azúcares de hexosa, manosa, glucosa y galactosa. En la biomasa lignocelulósica de maderas blandas, estos azúcares se encuentran en abundancia, mientras que la xilosa, se produce en maderas tanto blandas como duras.

Hay numerosos ejemplos de esfuerzos realizados para utilizar las lignocelulosas de un modo más eficaz por microorganismos y para ampliar el rango de utilización de sustrato de los microorganismos hacia fuentes de carbono asequibles y abundantes. Por ejemplo, se han hecho intentos para ampliar la utilización de pentosas no fermentables, como xilosa y arabinosa, que se encuentran en la biomasa lignocelulósica en muchos microorganismos. La finalidad de muchas de estas investigaciones era la ampliación del metabolismo de los hidratos de carbono en productores de etanol, tales como *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, para bioprocesos de fermentación de etanol. El documento WO 2009/081941, por ejemplo, describe la modificación genética de bacterias productoras de etanol, pertenecientes al género *Zymomonas*, para utilizar glucosa, manosa y xilosa.

Las bacterias pertenecientes a los géneros *Ralstonia* y *Cupriavidus* son quimiolitoheterótrofas que tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de fuentes renovables o de dióxido de carbono. Se ha observado que las cepas de los géneros *Ralstonia* y *Cupriavidus*, en particular, *R. eutropha* (nuevo nombre *Cupriavidus necator*), poseen un gran potencial biotecnológico dado que estas cepas pueden cultivarse a gran escala a altas densidades celulares (Schlegel *et al.* 1961) y son idóneas para bioprocesos industriales a gran escala. Por desgracia, *Cupriavidus* y *Ralstonia* tienen un rango de sustrato de hidratos de carbono muy estrecho, limitado a fructosa, N-acetilglucosamina y gluconato. En la técnica anterior, se han descrito intentos para ampliar el rango de utilización de sustrato de *R. eutropha* H16 (Pries *et al.* 1990, Schlegel y Gottschalk, 1965). Se ha notificado que se ha aislado un mutante espontáneo de *R. eutropha* H16 que utiliza glucosa, que supuestamente transportó este azúcar en la célula mediante un transportador pasivo (Schlegel y Gottschalk 1965, König, *et al.* 1969). Además, Pries *et al.* 1990 notificaron la introducción del gen de β -galactosidasa y del operón *gal* de *E. coli* en la cepa H16 de *R. eutropha* y la utilización de lactosa y galactosa por esta bacteria.

Adicionalmente, Buchholz *et al.* 1994 han descrito la construcción de una genoteca de *Pseudomonas saccharophila* y su transferencia a *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*). Un inserto que contiene los genes *xyl* que codifican la xilosa isomerasa y la xiluloquinasa hace que el *A. eutrophus* hospedador (pGN3) crezca en xilosa.

El documento JP 2009 225662 A (KANEKA CORP) desvela una cepa H16 de *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*) genéticamente modificada que expresa un gen que codifica una proteína transportadora de glucosa obtenida de *Zymomonas mobilis*, en el que la introducción del gen permite que la cepa modificada crezca en glucosa.

A pesar de los intentos previos para ampliar el rango de utilización de sustrato de determinados microorganismos hacia fuentes de carbono asequibles y abundantes, sigue habiendo una necesidad de nuevos métodos y microorganismos para una utilización más eficaz de fuentes renovables, en particular lignocelulosas.

Sumario

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso para utilizar de un modo eficaz lignocelulosas, en particular azúcares monoméricos encontrados en las lignocelulosas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos microorganismos que tengan la capacidad de utilizar lignocelulosas, en particular azúcares monoméricos encontrados en la lignocelulosa. Para conseguir estos objetivos, la invención se caracteriza por los rasgos que se enumeran en las reivindicaciones independientes. Otras reivindicaciones representan las realizaciones preferidas de la invención.

En el presente documento se desvela un nuevo microorganismo, que está modificado genéticamente para expresar genes que amplían su capacidad para utilizar diferentes azúcares monoméricos que están presentes en la lignocelulosa.

- 5 La presente invención proporciona, en un aspecto, un microorganismo del género *Cupriavidus* o *Ralstonia*, que tiene la capacidad de utilizar manosa y opcionalmente glucosa como fuente de carbono, dicho organismo está modificado genéticamente para expresar fosfomanosa isomerasa (EC 5.3.1.8) y la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa y opcionalmente manofructoquinasa (EC 2.7.1.4).
- 10 En otra realización de la invención, el microorganismo del género *Cupriavidus* o *Ralstonia* está además modificado genéticamente para expresar xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5), xiluloquinasa (EC 2.7.1.17) y un transportador ABC (del inglés *ATP binding cassette*) de alta afinidad y/o simportador E de xilosa y protones con capacidad de utilizar xilosa como fuente de carbono.
- 15 En una realización el microorganismo está modificado genéticamente para expresar fosfomanosa isomerasa (EC 5.3.1.8) y la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa y/o simportador E de xilosa y protones, y opcionalmente manofructoquinasa (EC 2.7.1.4). Normalmente, los microorganismos del género *Cupriavidus* o *Ralstonia* no tienen la capacidad de utilizar manosa sin dicha modificación, mientras que los microorganismos modificados tienen la capacidad de utilizar manosa. Los genes utilizados para dicha modificación genética pueden
- 20 ser exógenos o endógenos, normalmente son exógenos. En diversas realizaciones, cuando el microorganismo está modificado genéticamente para expresar un gen que codifica la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa, en particular el gen *g/f*, el microorganismo hospedador también tiene, sorprendentemente, la capacidad de utilizar glucosa.
- 25 En una realización el microorganismo está modificado genéticamente para expresar xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5), xiluloquinasa (EC 2.7.1.17) y un transportador ABC de alta afinidad (Xyl G, EC 3.6.3.17, Xyl F y/o Xyl H) y/o simportador E de xilosa y protones. Normalmente, los microorganismos de género *Cupriavidus* o *Ralstonia* no tienen la capacidad de utilizar xilosa sin dicha modificación, mientras que los microorganismos modificados tienen la capacidad de utilizar xilosa. Los genes utilizados para dicha modificación genética pueden ser exógenos o
- 30 endógenos, normalmente son exógenos. Normalmente, dichos microorganismos no tienen la capacidad de utilizar arabinosa sin dichos genes, mientras que en diversas realizaciones los microorganismos modificados tienen sorprendentemente la capacidad de utilizar arabinosa como fuente de carbono. Además, cuando los microorganismos están modificados genéticamente para expresar un transportador ABC de alta afinidad (en particular genes Xyl G, (EC 3.6.3.17), Xyl F y Xyl H), los microorganismos hospedadores tienen sorprendentemente
- 35 la capacidad de utilizar glucosa y galactosa.
- En una realización adicional de la invención los microorganismos hospedadores están modificados genéticamente para expresar glucoquinasa (EC 2.7.1.2). Esta modificación hace que el microorganismo modificado genéticamente también tenga la capacidad de utilizar glucosa.
- 40 Los microorganismos tienen por tanto la capacidad de utilizar glucosa como fuente de carbono además de manosa, o además de manosa, xilosa y arabinosa.
- En una realización preferida de la invención, los microorganismos tienen la capacidad de utilizar manosa, glucosa,
- 45 galactosa, xilosa y arabinosa como fuente de carbono.
- En una realización adicional los microorganismos están modificados genéticamente para expresar transaldolasa (EC 2.2.1.2) y/o transcetolasa (EC 2.2.1.1). Los genes que codifican transaldolasa y/o transcetolasa mejoran la rapidez del crecimiento del microorganismo modificado, en particular en pentosas, tales como xilosa y arabinosa.
- 50 Los microorganismos pueden ser de cualquier especie o cepa perteneciente al género *Cupriavidus* o *Ralstonia*. Preferentemente, el microorganismo pertenece a la especie *C. necator* (anteriormente *R. eutropha* o *Alkaligenes eutrophus*).
- 55 En un aspecto, la invención proporciona un vector que comprende un gen que codifica fosfomanosa isomerasa (EC 5.3.1.8), y opcionalmente un gen que codifica la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa, un gen que codifica el simportador E de xilosa y protones y/o un gen que codifica manofructoquinasa (EC 2.7.1.4), y elementos reguladores para regular la expresión de dichos genes en *Cupriavidus* o *Ralstonia*. Dichos genes pueden estar en el mismo vector o en vectores distintos.
- 60 En una realización, el vector comprende un gen que codifica xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5), xiluloquinasa (EC 2.7.1.17), un transportador ABC de alta afinidad (Xyl G, EC 3.6.3.17, Xyl F, y/o Xyl H) y/o el simportador E de xilosa y protones, y elementos reguladores para regular la expresión de dichos genes en *Cupriavidus* o *Ralstonia*. Dichos genes pueden estar en el mismo vector o en vectores distintos.
- 65

En una realización el vector puede comprender un gen que codifica transaldolasa (EC 2.2.1.2) y/o transcetolasa (EC 2.2.1.1). Dichos genes pueden estar en el mismo vector o en vectores distintos.

En una realización adicional el vector puede comprender un gen que codifica glucoquinasa (EC 2.7.1.2). Al igual que los genes anteriormente indicados, dicho gen puede estar en el mismo vector o en vectores distintos.

En una realización aún adicional un vector comprende una cualquiera o cualquier combinación de los genes indicados anteriormente.

Cualquier promotor que pueda expresarse en cepas de los géneros *Ralstonia* o *Cupriavidus* puede utilizarse en el vector.

Los promotores adecuados comprenden, por ejemplo, el promotor de *lac*, el promotor de *neokanamycin*, el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, P2, el promotor de hidrogenasa (SH) y P_L.

En una realización preferida el vector es un plásmido con amplio rango de hospedador que puede utilizarse para ampliar el rango de utilización de sustrato de diversas cepas hospedadoras diferentes de *Cupriavidus* o *Ralstonia*.

En el presente documento se desvela un método para modificar los microorganismos de los géneros *Ralstonia* o *Cupriavidus*. El método comprende que los hospedadores estén modificados genéticamente para expresar una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que comprende una secuencia de nucleótidos o secuencias que codifican fosfomanosa isomerasa (EC 5.3.1.8) y la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa y/o el simportador E de xilosa y protones, y opcionalmente manofructoquinasa (EC 2.7.1.4), en el que dicho microorganismo tiene la capacidad de crecer en manosa y opcionalmente también en glucosa como fuente de carbono, y/o

una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5), xiluloquinasa (EC 2.7.1.17) y un transportador ABC de alta afinidad y/o simportador E de xilosa y protones, en el que dicho microorganismo tiene la capacidad de crecer en xilosa, o en xilosa y arabinosa, y opcionalmente también en glucosa y galactosa como fuente de carbono.

El método puede comprender adicionalmente que el microorganismo esté modificado genéticamente para expresar transaldolasa (EC 2.2.1.2) y/o transcetolasa (EC 2.2.1.1).

El método puede comprender adicionalmente que el microorganismo esté modificado genéticamente para expresar glucoquinasa (EC 2.7.1.2).

En un aspecto aún adicional, la invención proporciona un método para cultivar el microorganismo modificado de la presente invención en un medio de cultivo que comprende manosa, glucosa, galactosa, xilosa o arabinosa, cualquiera de las mismas, cualquier combinación de las mismas, o todas ellas, como fuente de carbono.

En una realización, el medio de cultivo puede comprender manosa como fuente de carbono y opcionalmente glucosa.

En otra realización, el medio de cultivo puede comprender cualquiera o ambas de xilosa y arabinosa como fuente de carbono, y opcionalmente también glucosa y/o galactosa.

En una realización adicional, el medio de cultivo puede comprender manosa y cualquiera o ambas de xilosa y arabinosa como fuente de carbono, y opcionalmente también glucosa y/o galactosa.

En una realización adicional, el método comprende permitir que el microorganismo sintetice productos químicos a granel, tales como lípidos, por ejemplo polihidroxicarboxilatos, ácidos grasos o derivados de ácidos grasos, y recuperar el producto químico de las células, o del medio de cultivo.

A través de presente invención se obtienen ventajas considerables. A través de la invención se obtienen nuevos microorganismos pertenecientes a los géneros *Cupriavidus* o *Ralstonia*, teniendo dichos microorganismos un rango de utilización de sustrato ampliado. Los microorganismos modificados, como los descritos en el presente documento, pueden utilizar de un modo eficaz hidratos de carbono asequibles, en particular lignocelulosa, que comprende azúcares monoméricos. La xilosa, manosa y arabinosa son azúcares de la madera presentes en forma polimerizada en las hemicelulosas de las paredes de las células vegetales. Los microorganismos de la presente invención también pueden utilizar glucosa monomérica, que se encuentra en particular en la sacarosa y almidón y también en fracciones de celulosa y hemicelulosa en materiales lignocelulósicos. Los microorganismos modificados de la presente invención son adecuados para producir muchos productos químicos a granel.

Descripción de las figuras

Figura 1. Rutas de utilización de manosa y glucosa establecidas en la cepa H16 de *R. eutropha*. GLF, transportador de difusión facilitado para la captación de glucosa, KDGP, ruta de, Entner-Doudoroff; MAK, manofructoquinasa; PMI, fosfomanosa isomerasa; GLK, glucoquinasa; PGI fosfoglucosa isomerasa.

Figura 2. Mapas físicos de los plásmidos construidos pBBR1MCS-3::glf pBBR1MCS-3::glf::mak, pBBR1MCS-3::glf::pmi, pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi, pBBR1MCS-2::P_{nk}::glf y pBBR1MCS-2::P_{nk}::glk::glf. Los genes *glf*, *glk*, *mak* y *pmi*, respectivamente, se escindieron de plásmidos híbridos de pJET1.2 o pCR2.1 después de la subclonación utilizando los sitios de restricción indicados y después se ligaron en diversas matrices con los vectores de expresión linealizados pBBR1 MCS- 2 y pBBR1 MCS-3. Se indican los sitios de escisión y los genes estructurales relevantes (Km^R, casete de resistencia a kanamicina; Tc^R, casete de resistencia a tetraciclina; *mob*, sitio de movilización; *rep*, origen de replicación; *glf*, gen que codifica el transportador de difusión facilitado para la captación glucosa (GLF) de *Z. mobilis*; *glk*, gen que codifica la glucoquinasa (GLK) de *E. coli*; *mak*, gen que codifica una manofructoquinasa (MAK) de *E. coli*; *pmi*, gen que codifica una fosfomanosa isomerasa (PMI) de *E. coli*).

Figura 3. Análisis de transcripción de *glf*, *mak* y *pmi* en la cepa H16 de *R. eutropha* que lleva pBBR1 MCS-3::glf::mak::pmi y el control negativo que lleva solamente el vector pBBR1 MCS-3. La expresión de *glf*, *mak* y *pmi* se analizó mediante RT-PCR en muestras que contenían ARN total aislado de células de la fase de crecimiento exponencial de la cepa H16 de *R. eutropha* que llevaba pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi y de la cepa H16 de *R. eutropha* que llevaba el vector pBBR1 MCS- 3. Las células se desarrollaron en MSM que contenía gluconato sódico al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono. Los productos resultantes de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio. Los carriles 1, 3 y 5 representan el ensayo por RT-PCR para *glf*, *mak* y *pmi*, respectivamente, para la cepa H16 de *R. eutropha* que llevaba pBBR1MCS- 3::glf::mak::pmi, mientras que los carriles 2, 4 y 6 representan los controles negativos para detectar si había alguna expresión de *glf*, *mak* y *pmi* en la cepa que llevaba solo el vector pBBR1MCS-3. Un marcador de ADN λ PstI (carriles M, Fermentas, Alemania) sirvió para la comparación de tamaños.

Figura 4. Extractos en bruto y proteínas de membrana solubilizadas de la cepa H16 de *R. eutropha* recombinante que lleva pBBR1 MCS-2 o pBBR1MCS-2::P_{nk}::glk::glf. Las células se desarrollaron durante 48 horas en medio MSM que contenía glucosa sódica al 1 % (peso/vol) como fuente de carbono. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida con SDS al 12,5 % (peso/vol) y se tiñeron con azul brillante de Coomassie. A, extractos en bruto. Carril 1: cepa H16 de *R. eutropha* pBBR1 MCS-2, carril 2: cepa H16 de *R. eutropha* pBBR1MCS-2::P_{nk}::glf::glf; B, proteínas de membrana solubilizadas. Carril 3: cepa H16 de *R. eutropha* pBBR1MCS- 2, carril 4: cepa H16 de *R. eutropha* pBBR1 MCS-2::P_{nk}::glk::glf. St, patrón de masa molecular. Las flechas indican las proteínas recombinantes detectadas, transportador de glucosa (Glf) y glucoquinasa (Glk).

Figura 5. Crecimiento de la cepa H16 de *R. eutropha* recombinante. Cepas recombinantes de *R. eutropha* que llevan diferentes plásmidos. Las células se cultivaron en MSM líquido que contenía glucosa al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono. □ pBBR1MCS- 3::glf; ●□□□pBBR1MCS-2::P_{nk}::glf; Δ pBBR1MCS-2::P_{nk}::glk::glf; ▲ pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi; ♦ cepa H16 de *R. eutropha* de control G+1. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer incubados en un agitador rotativo horizontal a 110 rpm at 30 °C. La densidad óptica se midió a 600 nm en un fotómetro de Klett.

Figura 6. Cepas recombinantes de *R. eutropha* que llevan el plásmido pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi. Las células se cultivaron en MSM líquido que contenía tetraciclina (12,5 µg/ml) y Δ gluconato sódico al 0,5 % (peso/vol), ▲ manosa al 0,5 % (peso/vol), □ manosa al 1 % (peso/vol), ♦ manosa al 2 % (peso/vol), o manosa al 4 % (peso/vol) como única fuente de carbono. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer incubados en un agitador rotativo horizontal a 130 rpm y a 30 °C. La densidad óptica se midió a 600 nm en un fotómetro de Klett.

Figura 7. Ruta de utilización de D-xilosa en bacterias (XI, xilosa isomerasa; XK, xiluloquinasa; PPP, ruta de la pentosa fosfato).

Figura 8. Mapas físicos de los plásmidos construidos pBBR1 MCS-3::xylAB, pBBR1MCS-3::xylABE y pBBR1MCS-3::xylABFGH. Los genes *xylA*, *xylB*, *xylE* y *xylFGH*, respectivamente, se escindieron de plásmidos híbridos de pJET1.2 después de la subclonación utilizando los sitios de restricción indicados y se ligaron después con el vector de expresión linealizado pBBR1 MCS-3. Se indican los sitios de escisión y los genes estructurales relevantes (Tc^R, casete de resistencia a tetraciclina; *mob*, sitio de movilización; *rep*, origen de replicación; *xylA*, gen que codifica la xilosa-isomerasa (XylA); *xylB*, gen que codifica la xiluloquinasa (XylB); *xylE*, gen que codifica el transportador de baja afinidad (XylE); y *xylFGH*, genes que codifican el transportador ABC (XylFGH) de *E. coli*, respectivamente).

Figura 9. Crecimiento de la cepa H16 de *R. eutropha* que lleva el plásmido recombinante pBBR1MCS-3::xylABFGH y de la cepa H16 de *R. eutropha*, que se cultivaron en MSM líquido que contenía diferentes concentraciones (0,5 %, 1 %, 2 % [peso/vol]) de D-xilosa, glucosa al 1 % (peso/vol) y con gluconato sódico al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono, respectivamente. □ pBBR1MCS-3::xylABFGH, D-xilosa al 0,5 % (peso/vol); ■ pBBR1 MCS-3::xylABFGH, D-xilosa al 1,0 % (peso/vol); Δ pBBR1MCS-3::xylABFGH, D-xilosa al 2,0 % (peso/vol); ▲ pBBR1 MCS-3::xylABFGH, D-xilosa al 4,0 % (peso/vol); ◇ pBBR1MCS-3::xylABFGH, gluconato sódico al 1,0 % (peso/vol); ♦ pBBR1MCS-3::xylABFGH, glucosa al 1,0 % (peso/vol); + control *R. eutropha* H16, gluconato sódico al 1,0 % (peso/vol). Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer incubados en un agitador rotativo horizontal a 110 rpm a 30 °C. La densidad óptica se midió a 600 nm en un

fotómetro de Klett.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento, "un microorganismo modificado genéticamente" se refiere a un microorganismo cuyo material genético se ha alterado utilizando técnicas de modificación por ingeniería genética. Estas técnicas implican el uso de moléculas de ácido nucleico de diferentes fuentes, por ejemplo, de otro microorganismo o pueden ser al menos parcialmente sintéticas. Las moléculas de ácido nucleico de diferentes fuentes pueden combinarse con una o más moléculas. Estas construcciones pueden transferirse a un microorganismo, dándole construcciones genéticas modificadas o nuevas.

En el presente documento, "un gen" se refiere normalmente a una secuencia de nucleótidos que codifica un producto específico, en el presente documento, normalmente una enzima. La región codificante está normalmente unida operativamente en regiones reguladoras, en particular, en un promotor, que puede funcionar en la célula hospedadora. Dentro de una célula hospedadora, se introduce normalmente una construcción genética, que consta esencialmente de una región codificante de un gen y de una región reguladora, en particular, un promotor, funcional en la célula hospedadora. Para introducir la construcción genética deseada en una célula hospedadora puede utilizarse un vector adecuado. "Un gen" puede referirse a uno o más genes.

Una modificación genética puede significar que uno o más genes exógenos se introducen y se expresan en un microorganismo hospedador, o que uno o más de los genes expresados son endógenos y uno o más son exógenos, o que la expresión de uno o más genes endógenos aumenta en un hospedador en comparación con la del hospedador parental.

En diversas realizaciones de la invención, los microorganismos hospedadores son bacterias que pertenecen a los géneros *Cupriavidus* o *Ralstonia*.

En el presente documento un microorganismo se refiere normalmente a un microorganismo aislado, es decir, un microorganismo que se utiliza como un cultivo puro.

En una realización la especie puede ser cualquier especie de *Ralstonia* incluyendo, pero sin limitación, *Ralstonia insidiosa*, *R. mannitolitica*, *R. pickettii*, *R. solanacearum* y *R. syzygii*. En otra realización la especie puede ser cualquier especie de *Cupriavidus* incluyendo, pero sin limitación *Cupriavidus basilensis*, *C. campinensis*, *C. gilardii*, *C. laharis*, *C. metallidurans*, *C. necator*, *C. oxalaticus*, *C. pauculus*, *C. pinatubonensis*, *C. respiraculi* y *C. taiwanensis* (nomenclatura bacteriana actual (lista aprobada, lista de validación), mayo de 2010, recopilada por DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Las especies preferidas son *R. eutropha* (nombre actual *C. necator*, nombres anteriores *Alcaligenes eutrophus* e *Hydrogenomonas eutropha*). Las cepas de *Cupriavidus* y *Ralstonia* se encuentran disponibles al público en las colecciones de cultivos microbianos, tales como la ATCC, DSMZ y NCIB.

Los ejemplos de la invención se han realizado utilizando la cepa H16 de *R. eutropha* (nombre actual *C. necator*). Esta cepa es una cepa de tipo silvestre, que está disponible en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, con el número de registro DSM428, en la American Type Culture Collection con el número de registro ATCC17699, y en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria, NCIBM, número de registro NCIB10442. Todas estas cepas se encuentran disponibles al público.

Las cepas H16 de *R. eutropha* depositadas, que pueden utilizarse en la invención son *Ralstonia eutropha* H16, n.º de registro DSMZ: DSM 428, DSM 15443 (mutante de DSM 428).

Taxonomía ID: 381666; nombre heredado del programa Blast: betaproteobacterias.
Otros nombres:

sinónimos: *Cupriavidus necator* H16, *Alcaligenes eutropha* H16, *Wautersia eutropha* H16, *Cupriavidus necator* ATCC 17699, *Ralstonia eutropha* ATCC 17699;

nombres equivalentes: cepa H16 de *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia eutropha* cep. H16.

Otras cepas de *R. eutropha* que pueden utilizarse en la invención son:

Ralstonia eutropha H850

N.º de registro DSMZ: DSM 13439

Taxonomía ID: 53482; nombre heredado del programa Blast: betaproteobacterias.

Otros nombres:

sinónimos: *Wautersia eutropha* H850, *Cupriavidus necator* H850, *Alcaligenes eutrophus* H850

Ralstonia eutropha JMP134

N.º de registro DSMZ: DSM 4058

Taxonomía ID: 264198; nombre heredado del programa Blast: betaproteobacterias.

Otros nombres:

sinónimos: *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134, *Cupriavidus necator* JMP134, *Wautersia eutropha* JMP134, *Ralstonia* sp. JMP134;

nombres equivalentes: *Ralstonia eutropha* cep. JMP134 y cepa JMP134 de *Ralstonia eutropha*.

Además, en la invención también pueden utilizarse las siguientes otras cepas de *Ralstonia eutropha*:

Ralstonia eutropha 335 (N.º de registro DSMZ: DSM 531, ATCC 17697)

Ralstonia eutropha N9A (N.º de registro DSMZ: DSM 518;

Ralstonia eutropha B19 (N.º de registro DSMZ: DSM 515):

Ralstonia eutropha G27 (N.º de registro DSMZ: DSM 516):

Ralstonia eutropha G29 (N.º de registro DSMZ: DSM 517):

Ralstonia eutropha 336 (N.º de registro DSMZ: DSM 529, ATCC 17698)

Ralstonia eutropha 338 (N.º de registro DSMZ: DSM 530, ATCC 17700);

Ralstonia eutropha TA06 (N.º de registro DSMZ: DSM 4182);

Ralstonia eutropha H850 (N.º de registro DSMZ: DSM 5536; NRRL B-15940)

Ralstonia eutropha KTO₂ (N.º de registro DSMZ: DSM 6519);

Ralstonia eutropha Tfa17 (N.º de registro DSMZ: DSM 11098)

Ralstonia eutropha N-1 (N.º de registro DSMZ: DSM 13513; ATCC 43291)

Ralstonia eutropha NRRL B-2804 (N.º de registro DSMZ: DSM 30029, ATCC 25207, NRRL B-2804);

En el presente documento, "biomasa lignocelulósica" se refiere a biomasa vegetal que comprende principalmente celulosa, hemicelulosas y lignina. La biomasa lignocelulósica es, por ejemplo, residuos agrícolas (por ejemplo, paja de trigo, cebada o avena, cáscaras (broza), forraje de maíz, paja, bagazo de caña de azúcar), cultivos energéticos, residuos o materiales de madera o plantas y basura urbana, por ejemplo, restos de papel.

"Producto químico a granel" se refiere a cualquier producto químico útil, que puede producirse en altas cantidades a partir de materiales económicos sin procesar. Los ejemplos de productos químicos a granel útiles son lípidos, por ejemplo, polihidroalcanoatos, en particular polihidroxibutirato (PHB), u otros lípidos, tales como ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos, por ejemplo, acilglicerol.

El término "lípidos" se refiere a una sustancia grasa, cuya molécula generalmente contiene, como una parte, una cadena de hidrato de carbono alifática, que se disuelve en disolventes orgánicos no polares pero que es poco soluble en agua. Los lípidos son un grupo esencial de moléculas grandes en las células vivas. Los lípidos son, por ejemplo, grasas, aceites, ceras, ésteres de cera, esteroides, terpenoides, isoprenoides, carotenoides, polihidroalcanoatos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, glucolípidos, esfingolípidos y acilglicerol. En esta descripción los términos lípidos y aceites se utilizan como sinónimos.

El término "acilglicerol" se refiere a un éster de glicerol y ácidos grasos. Los acilglicerol se producen de manera natural como grasas y aceites grasos. Los ejemplos de acilglicerol incluyen triacilglicerol (TAG, triglicéridos) diacilglicerol (diglicéridos) y monoacilglicerol (monoglicéridos).

Los "materiales sin procesar" o "materiales de partida", son materiales que se forman o que están incluidos en el medio de cultivo de un hospedador de *Cupriavidus* o *Ralstonia* y que el microorganismo puede utilizar para su crecimiento y/o producción de productos químicos deseados. Favorablemente, los materiales son asequibles y están disponibles en grandes cantidades. Son materiales de partida adecuados, por ejemplo, la biomasa lignocelulósica (por ejemplo, materiales de madera o plantas, sus fracciones o restos) y desecho(s) o residuo(s) agrícolas, micro- o macro- algas y cualquier material que comprenda hidratos de carbono, tales como glucosa, galactosa, manosa, xilosa, o arabinosa o sus combinaciones. Algunos materiales de partida pueden comprender principalmente xilosa (hemicelulosas), algunos pueden comprender principalmente glucosa (celulosa o almidón), y algunos pueden comprender principalmente manosa (hemicelulosas a base de galactoglucomanano).

Los azúcares, manosa, glucosa, xilosa, arabinosa, y galactosa deben proporcionarse a los microorganismos como azúcares monoméricos. Los materiales sin procesar que contienen estos azúcares en forma polimérica, por ejemplo, lignocelulosas, pueden tratarse con cualquier método conocido para hidrolizar los polímeros de azúcar en azúcares monoméricos que pueden utilizar los microorganismos de acuerdo con la presente invención.

En el cultivo de *Cupriavidus* o *Ralstonia* puede utilizarse cualquier medio de cultivo que comprenda los componentes adecuados para el crecimiento de *Cupriavidus* o *Ralstonia*.

En aplicaciones industriales el medio de cultivo comprende normalmente azúcares monoméricos que se originan de materiales lignocelulósicos como fuente de carbono, y además normalmente nutrientes y sales o componentes de los mismos como micro- y macro- nutrientes y agua. Un medio de cultivo puede comprender manosa, glucosa, galactosa, xilosa, o arabinosa o cualquiera de sus combinaciones como fuente de carbono, normalmente como la fuente de carbono principal, en algunas realizaciones como la única fuente de carbono.

En el cultivo de *Cupriavidus* o *Ralstonia* pueden utilizarse condiciones de cultivo adecuadas para el cultivo de *Cupriavidus* o *Ralstonia*. Dichas condiciones de cultivo son bien conocidas por un experto en la técnica. En el cultivo pueden utilizarse medios líquidos o sólidos. Los cultivos líquidos pueden agitarse, siendo la agitación adecuada de 50 - 1000 rpm, normalmente de 100 - 600 rpm. La temperatura del cultivo puede ser de 15 a 45 °C, preferentemente 25 a 37 °C, normalmente de 30 °C. El tiempo de incubación puede ser de 1 día a 14 días, normalmente de 2 a 7 días, preferentemente de 24 a 72 horas. El cultivo puede ser un cultivo discontinuo, semicontinuo o continuo.

En el presente documento la expresión "gen endógeno" se refiere a un gen que es natural para el hospedador de *Cupriavidus* o *Ralstonia*.

En el presente documento la expresión "gen exógeno" se refiere a un gen que no es natural para el hospedador *Cupriavidus* o *Ralstonia*.

Los genes introducidos en los hospedadores de *Ralstonia* o *Cupriavidus* pueden ser endógenos o exógenos, normalmente son exógenos, si/dado que el hospedador no posee los genes de manera natural. En algunas realizaciones, los genes endógenos producidos de manera natural por el hospedador pueden sobreexpresarse en el hospedador, por ejemplo, expresando la región codificante bajo un promotor fuerte.

Un gen codificante de "fosfomanosa isomerasa" puede ser cualquier gen que codifique una enzima que tenga actividad fosfomanosa isomerasa. De acuerdo con la Clasificación de Enzimas la enzima tiene un número de CE 5.3.1.8. En una realización específica de la invención el gen puede ser un gen que codifique fosfomanosa isomerasa (PMI) o manosa-6-fosfato isomerasa de la cepa K12 de *Escherichia coli* (EC 5.3.1.8) (n.º de registro P00946) (nombre del gen: *pmi*, origen: cepa K12 de *Escherichia coli*) (SEQ ID NO: 1).

Un gen codificante de "proteína de difusión facilitada para la captación de manosa" puede ser cualquier gen que codifique una proteína de difusión facilitada para la actividad de captación de manosa o un gen que codifique el simportador E de xilosa y protones. En una realización específica de la invención el gen puede ser un gen que codifique un transportador de difusión facilitado para la captación de glucosa (GLF) de *Zymomonas mobilis* (n.º de registro P21906) (nombre del gen: *glf*, origen: *Zymomonas mobilis*) (SEQ ID NO: 2). Sorprendentemente, un hospedador de *Ralstonia* o *Cupriavidus* introducido para expresar un gen que codifique una proteína de difusión facilitada para la actividad de captación de manosa, en particular *glf*, puede utilizar glucosa como fuente de carbono.

Un gen codificante de "manofructoquinasa" puede ser cualquier gen que codifique actividad de manofructoquinasa (EC 2.7.1.4). En una realización específica de la invención el gen puede ser un gen que codifique manofructoquinasa (MAK) (EC 2.7.1.4) de *Escherichia coli*, en particular de la cepa K12 (n.º de registro P23917) (nombre del gen: *mak*, origen: cepa K12 de *Escherichia coli*) (SEQ ID NO: 3).

Un gen codificante de "xilosa isomerasa" puede ser cualquier gen que codifique actividad de xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5). En una realización específica de la invención el gen puede ser un gen que codifique D-xilosa isomerasa (XylA) de la cepa K12 de *Escherichia coli* (n.º de registro P00944) (EC 5.3.1.5) (nombre del gen: *xylA*, origen: cepa K12 de *Escherichia coli*) (SEQ ID NO: 4).

Un gen codificante de "xiluloquinasa" puede ser cualquier gen que codifique actividad de xiluloquinasa (EC 2.7.1.17). En una realización específica de la invención el gen puede ser un gen que codifique xilulosa quinasa (XylB) de la cepa K12 de *Escherichia coli* (n.º de registro P09099) (EC 2.7.1.17) (nombre del gen: *xylB*, origen: cepa K12 de *Escherichia coli*) (SEQ ID NO: 5).

Un gen codificante de "simportador E de xilosa y protones" puede ser cualquier gen que codifique el simportador E de xilosa y protones. En una realización específica de la invención el gen puede ser un gen que codifique un simportador de D-xilosa y protones (XylE) de la cepa K12 de *Escherichia coli* (nombre del gen: *xylE*, origen: cepa K12 de *Escherichia coli*) (n.º de registro P0AGF4) (SEQ ID NO: 6).

Un gen codificante de "transportador ABC de alta afinidad" puede ser cualquier gen, que codifique un transportador ABC de alta afinidad. En una realización específica de la invención el gen puede ser cualquier gen que codifique la proteína periplasmática de unión a D-xilosa (XylF) de la cepa K12 de *Escherichia coli* (nombre del gen: *xylF*, origen: cepa K12 de *Escherichia coli*) (n.º de registro P37387) (SEQ ID NO: 7), o un gen que codifique una proteína de unión a ATP de importación de xilosa (XylG) de la cepa K12 de *Escherichia coli* (nombre del gen: *xylG*, origen: cepa K12

de *Escherichia coli*) (n.º de registro P37388) (EC 3.6.3.17) (SEQ ID NO: 8), o un gen que codifique una proteína permeasa del sistema de transporte de xilosa (**XylH**) de la cepa K12 de *Escherichia coli* (nombre del gen: *xylH*, origen: *cepa K12 de Escherichia coli*) (n.º de registro P0AGI4) (SEQ ID NO: 9). Sorprendentemente, un hospedador de *Ralstonia* o *Cupriavidus* introducido para expresar genes que codifican al transportador ABC de alta afinidad, en particular genes que codifican Xyl F, Xyl G y Xyl H, puede utilizar glucosa y galactosa como fuente de carbono.

Un gen codificante de "transaldolasa" puede ser cualquier gen que codifique transaldolasa (EC 2.2.1.2). En una realización específica de la invención el gen puede ser un gen que codifique transaldolasa B (TalB) de la cepa K12 de *Escherichia coli* (nombre del gen: *talB*, origen: *cepa K12 de Escherichia coli*) (n.º de registro BAB96586) (EC 2.2.1.2) (SEQ ID NO: 10).

Un gen codificante de "cetolasa" puede ser cualquier gen que codifique transcetolasa (EC 2.2.1.1). En una realización específica de la invención el gen puede ser un gen que codifique transcetolasa 1 (TktA) de la cepa K12 de *Escherichia coli* (nombre del gen: *tktA*, origen: *cepa K12 de Escherichia coli*) (n.º de registro P27302) (EC 2.2.1.1) (SEQ ID NO: 11).

Un gen codificante de "glucoquinasa" puede ser cualquier gen que codifique glucoquinasa (EC 2.7.1.2). En una realización específica de la invención el gen puede ser un gen que codifique glucoquinasa (*glk*) de la cepa K12 de *Escherichia coli* (nombre del gen: *glk*, origen: *cepa K12 de Escherichia coli*) (n.º de registro POA6V8.1) (EC 2.7.1.2) (SEQ ID NO: 12).

Un hospedador de *Ralstonia* o *Cupriavidus* introducido para expresar glucoquinasa tiene la capacidad de utilizar glucosa.

Puede utilizarse cualquier gen, cuyo producto génico se sepa que cataliza la reacción de interés. Dentro del ámbito de la presente invención también hay genes, que codifican la misma función o una función equivalente y que son muy homólogos con respecto al gen de interés. Esto significa, por ejemplo, que las proteínas codificadas por los genes tienen un alto porcentaje (%) de identidad cuando se comparan entre sí.

Por ejemplo pueden utilizarse los siguientes genes:

Los genes respectivos de diferentes cepas de *Escherichia* (por ejemplo *Escherichia albertii* [fosfomanosa isomerasa ZP_02903372.1, manosa-6-fosfato isomerasa, clase I [*Escherichia albertii* TW07627] (SEQ ID NO: 13); manofructoquinasa ZP_02902328.1, manofructoquinasa [*Escherichia albertii* TW07627] (SEQ ID NO: 14); *Escherichia fergusonii* [fosfomanosa isomerasa YP_002382576.1, manosa-6-fosfato isomerasa [*Escherichia fergusonii* ATCC 35469] (SEQ ID NO: 15); xilosa isomerasa YP_002384641.1) xilosa isomerasa [*Escherichia fergusonii* ATCC 35469] (SEQ ID NO: 16); cepas de *Shigella* (por ejemplo *Shigella flexneri* [fosfomanosa isomerasa NP_837299.1, manosa-6-fosfato isomerasa [*Shigella flexneri* 2a cep. 2457T] (SEQ ID NO: 17); *Shigella sonnei* [fosfomanosa isomerasa YP_310481.1, manosa-6-fosfato isomerasa [*Shigella sonnei* Ss046] (SEQ ID NO: 18); xilosa isomerasa YP_312597.1, xilosa isomerasa [*Shigella sonnei* Ss046] (SEQ ID NO: 19); *Shigella dysenteriae* [fosfomanosa isomerasa YP_03064125.1, manosa-6-fosfato isomerasa, clase I [*Shigella dysenteriae* 1012] (SEQ ID NO: 20); manofructoquinasa ZP_03064822.1, manofructoquinasa [*Shigella dysenteriae* 1012] (SEQ ID NO: 21); xilosa isomerasa ZP_03063610.1), xilosa isomerasa [*Shigella dysenteriae* 1012] (SEQ ID NO: 22); cepas de *Citrobacter* (por ejemplo, *Citrobacter koseri* [fosfomanosa isomerasa P_001453192.1, proteína hipotética CKO_01624 [*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895] (SEQ ID NO: 23); xilosa isomerasa YP_001456500.1, xilosa isomerasa [*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895] (SEQ ID NO: 24); *Citrobacter rodentium* [fosfomanosa isomerasa YP_003365034, manosa-6-fosfato isomerasa [*Citrobacter rodentium* ICC168] (SEQ ID NO: 25); manofructoquinasa YP_003364074.1, probable manofructoquinasa [*Citrobacter rodentium* ICC168] (SEQ ID NO: 26); xilosa isomerasa YP_003367655.1, D-xilosa isomerasa [*Citrobacter rodentium* ICC168] (SEQ ID NO: 27); *Citrobacter youngae* [fosfomanosa isomerasa ZP_06352970.2, manosa-6-fosfato isomerasa, clase I [*Citrobacter youngae* ATCC 29220] (SEQ ID NO: 28); xilosa isomerasa ZP_06571492.1), xilosa isomerasa [*Citrobacter youngae* ATCC 29220] (SEQ ID NO: 29); cepas de *Salmonella* (por ejemplo *Salmonella enterica* [fosfomanosa isomerasa YP_002146578.1, manosa-6-fosfato isomerasa, clase I [*Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovariedad *Agona* cep. SL483] (SEQ ID NO: 30); xilosa isomerasa ZP_02342859.1), xilosa isomerasa [*Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovariedad *Saintpaul* cep. SARA29] (SEQ ID NO: 31); *Salmonella typhimurium* [fosfomanosa isomerasa CAA40399.1), fosfomanosa isomerasa [*Salmonella typhimurium*] (SEQ ID NO: 32); cepas de *Enterobacter* (por ejemplo, *Enterobacter cloacae* [fosfomanosa isomerasa ABF71065.1, manosa-6-fosfato isomerasa [*Enterobacter cloacae*] (SEQ ID NO: 33); xilosa isomerasa YP_003610718.1), xilosa isomerasa [*Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae* ATCC 13047] (SEQ ID NO: 34); *Enterobacter cancerogenus* [fosfomanosa isomerasa ZP_05967481.1), manosa-6-fosfato isomerasa, clase I [*Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316] (SEQ ID NO: 35); cepas de *Cronobacter* (por ejemplo, *Cronobacter turicensis* [fosfomanosa isomerasa YP_003210382.1, manosa-6-fosfato isomerasa [*Cronobacter turicensis* z3032] (SEQ ID NO: 36); *Cronobacter sakazakii* [fosfomanosa isomerasa YP_001438057.1), proteína hipotética ESA_01968 [*Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894] (SEQ ID NO: 37); cepas de *Klebsiella* (por ejemplo, *Klebsiella pneumoniae* [fosfomanosa isomerasa YP_002238770.1, manosa-6-fosfato isomerasa, clase I

[*Klebsiella pneumoniae* 342] (SEQ ID NO: 38); manofructoquinasa YP_002240149.1), mano(fructo)quinasa [*Klebsiella pneumoniae* 342] (SEQ ID NO: 39); cepas de *Serratia* (por ejemplo *Serratia odorifera* [fosfomanosa isomerasa ZP_06640499.1]), manosa-6-fosfato isomerasa [*Serratia odorifera* DSM 4582] (SEQ ID NO: 40).

5 Además pueden utilizarse los siguientes genes:

transportador de D-xilosa Xyle [*Escherichia fergusonii* ATCC 35469] YP_002385136.1 (SEQ ID NO: 41);
transportador de D-xilosa Xyle [*Shigella flexneri* 2a cep. 301] NP_709888.1 (SEQ ID NO: 42);
simportador de D-xilosa y protones (transportador de D-xilosa) [*Salmonella enterica* subesp. *enterica*
10 serovariedad *Schwarzengrund* cepa SL480], Xyl E, ZP_02664392.1 (SEQ ID NO: 43);
proteína de la familia de transportadores de azúcar [*Citrobacter youngae* ATCC 29220], Xyl E, ZP_06356420.1
(SEQ ID NO: 44);
simportador de D-xilosa:protones [*Acidobacterium capsulatum* ATCC 51196], Xyl E, YP_002753901.1 (SEQ ID
NO: 45); xiluloquinasa [*Shigella flexneri* 2a cep. 301] NP_709351.1 (SEQ ID NO: 46); xilulosa quinasa
15 [*Citrobacter rodentium* ICC168] YP_003367656.1 (SEQ ID NO: 47);
subunidad transportadora de D-xilosa XylF [*Shigella flexneri* 5 cep. 8401] YP_691285.1 (SEQ ID NO: 48);
subunidad transportadora de D-xilosa XylF [*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895] YP_001456501.1 (SEQ ID NO:
49);
transportador ABC D-xilosa, proteína de unión a ATP [*Shigella boydii* CDC 3083-94] YP_001882237.1, Xyl G,
20 (SEQ ID NO: 50);
transportador ABC D-xilosa, proteína de unión a D-xilosa periplasmática [*Klebsiella pneumoniae* 342], Xyl G,
YP_002236058.1 (SEQ ID NO: 51);
subunidad de unión a ATP del transportador de xilosa [*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895] YP_001456502.1, Xyl
G, (SEQ ID NO: 52);
25 transportador ABC de D-xilosa, proteína permeasa [*Shigella dysenteriae* 1012] ZP_03063638.1, Xyl H, (SEQ ID
NO: 53);
translocador de membrana interna [*Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae* ATCC 13047] YP_003610715.1, Xyl H,
(SEQ ID NO: 54);
glucoquinasa [*Shigella dysenteriae* 1012] ZP_03065183.1 (SEQ ID NO: 55);
30 glucoquinasa [*Escherichia fergusonii* ATCC 35469] YP_002381954.1 (SEQ ID NO: 56);
transaldolasa [*Shigella dysenteriae* 1012] ZP_03066451.1 (SEQ ID NO: 57);
transaldolasa B [*Escherichia fergusonii* ATCC 35469] YP_002381239.1 (SEQ ID NO: 58); transcetolasa [*Shigella*
dysenteriae 1012] ZP_03063878.1 (SEQ ID NO: 59);
transcetolasa [*Escherichia fergusonii* ATCC 35469] YP_002383968.1 (SEQ ID NO: 60) pueden utilizarse en la
35 invención.

Son fuentes alternativas para diversos genes que codifican las actividades enzimáticas deseadas, por ejemplo:

Fuentes alternativas para glucoquinasas:

40 glucoquinasa [*Shigella boydii* Sb227] YP_408803.1
glucoquinasa [*Escherichia albertii* TW07627] ZP_02901664.1
glucoquinasa [*Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovariedad *Typhimurium* cep. LT2] NP_461344.1
glucoquinasa [*Citrobacter youngae* ATCC 29220] ZP_06351950.1
45 glucoquinasa [*Citrobacter rodentium* ICC168] YP_003366335.1
glucoquinasa [*Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae* NCTC 9394] CBK87115.1
glucoquinasa [*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895] YP_001452005.1
glucoquinasa [*Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894] YP_001436959.1
glucoquinasa [*Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316] ZP_05968594.1
50 glucoquinasa [*Klebsiella pneumoniae* subesp. *pneumoniae* MGH 78578] YP_001336384.1
glucoquinasa [*Serratia odorifera* DSM 4582] ZP_06639362.1
Glucoquinasa [*Erwinia billingiae* Eb661] CAX60782.1
glucoquinasa [*Erwinia amylovora* CFBP1430] YP_003531826.1

55 Son fuentes alternativas para manofructoquinasas, por ejemplo:

fructoquinasa [*Shigella sonnei* Ss046] YP_309383.2
proteína hipotética CKO_02777 [*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895] YP_001454319.1
fructoquinasa [*Enterobacter sp.* 638] YP_001175599.1
60 fructoquinasa [*Escherichia fergusonii* ATCC 35469] YP_002383736.1
fructoquinasa [*Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae* ATCC 13047] YP_003611661.1

Son fuentes alternativas para el transportador de fusión facilitado, GLF y Xyle, por ejemplo:

65 transportador de D-xilosa Xyle [*Shigella sonnei* Ss046] YP_312943.1 simportador de xilosa y protones
[*Citrobacter sp.* 30_2] ZP_04558597.1 proteínas de familia de transportadores de azúcar [*Citrobacter*

youngae ATCC 29220] ZP_06356420.1
transportador de D-xilosa XylE [*Salmonella enterica* subesp. *arizonae* serovariedad 62:z4,z23:--]
YP_001572426.1
5 simportador de D-xilosa y protones (transportador de D-xilosa) [*Citrobacter rodentium* ICC168]
YP_003367154.1
transportador de D-xilosa XylE [*Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E] YP_089566.1
transportador de D-xilosa XylE [*Actinobacillus succinogenes* 130Z] YP_001343806.1
transportador de D-xilosa XylE [*Bacillus cereus* ATCC 10987] NP_978526.1 permeasa xilosa [*Bacillus*
10 *megaterium* DSM319] YP_003597063.1

Debido a la alta homología entre la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa, en particular GLF, y el simportador E de xilosa y protones, xyl E, pueden utilizarse genes que codifiquen el simportador E de xilosa y protones, xyl E, en lugar de genes que codifiquen la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa, y viceversa.

Son fuentes alternativas para xiluloquinasas, por ejemplo:

xiluloquinasa [*Shigella* sp. D9] ZP_05434777.1
xiluloquinasa [*Escherichia fergusonii* ATCC 35469] YP_002384640.1
20 xiluloquinasa [*Citrobacter* sp. 30_2] ZP_04559359.1
xiluloquinasa [*Shigella boydii* Sb227] YP_409882.1
xilulosa quinasa [*Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovariedad *Paratyphi* C cepa RKS4594] YP_002639258.1
25 proteína hipotética CKO_05020 [*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895] YP_001456499.1
xiluloquinasa [*Shigella sonnei* Ss046] YP_312598.1
xiluloquinasa [*Citrobacter youngae* ATCC 29220] ZP_06355683.1
xiluloquinasa [*Klebsiella* sp. 1_1_55] ZP_06551221.1
30 proteína hipotética ECL_00202 [*Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae* ATCC 13047] YP_003610719.1
xiluloquinasa [*Klebsiella pneumoniae* 342] YP_002236061.1
xiluloquinasa [*Klebsiella variicola* At-22] YP_003437118.1
xilulosa quinasa [*Cronobacter turicensis* z3032] YP_003212435.1
Xilulosa quinasa [*Yersinia intermedia* ATCC 29909] ZP_04636833.1
35 xiluloquinasa [*Erwinia billingiae* Eb661] CAX60830.1
xiluloquinasa [*Serratia odorifera* DSM 4582] ZP_06638097.1

Son fuentes alternativas para XylIF, por ejemplo:

subunidad transportadora de D-xilosa XylF [*Shigella boydii* Sb227] YP_409884.1
40 subunidad transportadora de D-xilosa XylF [*Enterobacter* sp. 638] YP_001174896.1
subunidad transportadora de D-xilosa XylF [*Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894] YP_001440178.1
proteína periplasmática de unión a D-xilosa [*Cronobacter turicensis* z3032] YP_003212438.1
subunidad transportadora de D-xilosa XylF [*Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae* ATCC 13047] YP_003610717.1
45 proteína hipotética ENT CAN_08293 [*Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316] ZP_05969667.2
transportador ABC de D-xilosa, proteína periplasmática de unión a sustrato [*Erwinia billingiae* Eb661] CAX60828.1
transportador del casete de unión a ATP de la superfamilia ABC de xilosa, proteína de unión [*Serratia odorifera* DSM 4582] ZP_06638100.1
50 subunidad transportadora de D-xilosa XylF [*Actinobacillus succinogenes* 130Z] YP_001343809.1

Son fuentes alternativas para XylG, por ejemplo:

subunidad de unión a ATP transportador de xilosa [*Shigella flexneri* 5 cep. 8401] YP_691284.1
55 transportador ABC de D-xilosa, proteína de unión a ATP [*Shigella dysenteriae* 1012] ZP_03063359.1
subunidad de unión a ATP transportador de xilosa [*Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae* ATCC 13047] YP_003610716.1
transportador ABC de D-xilosa, proteína de unión a ATP [*Klebsiella pneumoniae* 342] YP_002236058.1
proteína hipotética ENT CAN_08292 [*Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316] ZP_05969666.1
60 subunidad de unión a ATP transportadora de xilosa [*Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894] YP_001440177.1
proteína de unión a ARP importadora de xilosa xylG [*Cronobacter turicensis* z3032] YP_003212439.1
transportador ABC de D-xilosa, subunidad ATPasa [*Erwinia billingiae* Eb661] CAX60827.1
superfamilia ABC xilosa ABC transportador de casete de unión a ATP, proteína ABC [*Serratia odorifera* DSM 4582] ZP_06638101.1
65 COG1129: sistema transportador de azúcar de tipo ABC, componente ATPasa [*Actinobacillus pleuropneumoniae* serovariedad 1 cep. 4074] ZP_00134918.2

Son fuentes alternativas para XylH, por ejemplo:

proteína hipotética CKO_05024 [*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895] YP_001456503.1
 proteína de membrana transportador ABC de xilosa [*Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* NCTC 9394] CBK87790.1
 proteína hipotética ENTCAN_08291 [*Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316] ZP_05969665.1
 translocador de membrana interna [*Enterobacter* sp. 638] YP_001174894.1 proteína hipotética ESA_04159
 [*Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894] YP_001440176.1
 transportador ABC de D-xilosa, proteína permeasa [*Klebsiella pneumoniae* 342] YP_002236057.1
 proteína permeasa del sistema de transporte de xilosa xylH [*Cronobacter turicensis* z3032] YP_003212440.1
 proteína permeasa del sistema de transporte de azúcar [*Yersinia enterocolitica* subesp. *enterocolitica* 8081] YP_001008391.1
 proteína permeasa, transportador ABC de D-xilosa [*Erwinia billingiae* Eb661] CAX60826.1
 ATPasa transportadora de monosacáridos [*Serratia proteamaculans* 568] YP_001476339.1
 transportador del casete de unión a ATP de la superfamilia ABC xilosa, proteína de membrana [*Serratia odorifera* DSM 4582] ZP_06638102.1
 ATPasa transportadora de monosacáridos [*Actinobacillus succinogenes* 130Z] YP_001343807.1

Son fuentes alternativas para transaldolasas, por ejemplo:

transaldolasa B [*Shigella boydii* Sb227] YP_406573.1
 transaldolasa [*Citrobacter youngae* ATCC 29220] ZP_06354813.1
 transaldolasa B [*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895] YP_001454897.1
 transaldolasa B [*Salmonella enterica* subesp. *arizonae* serovariedad 62:z4,z23:-YP_001571972.1
 transaldolasa B [*Citrobacter rodentium* ICC168] YP_003363651.1
 transaldolasa B [*Enterobacter* sp. 638] YP_001175308.1
 proteína hipotética ENTCAN_05194 [*Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316] ZP_05966848.1
 transaldolasa B [*Citrobacter* sp. 30_2] ZP_04559788.1
 transaldolasa A [*Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae* NCTC 9394] CBK87626.1
 transaldolasa B [*Klebsiella pneumoniae* 342] YP_002240539.1
 transaldolasa B [*Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae* ATCC 13047] YP_003611333.1
 transaldolasa B [*Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894] YP_001439387.1
 transaldolasa B [*Cronobacter turicensis* z3032] YP_003208998.1
 transaldolasa [*Escherichia albertii* TW07627] ZP_02902842.1
 transaldolasa [*Yersinia kristensenii* ATCC 33638] ZP_04625574.1
 transaldolasa A [*Serratia odorifera* DSM 4582] ZP_06637249.1
 transaldolasa B [*Erwinia amylovora* CFBP1430] YP_003532302.1
 transaldolasa B [*Erwinia amylovora* ATCC 49946] YP_003537736.1
 transaldolasa B [*Erwinia pyrifoliae* DSM 12163] CAY73102.1

Son fuentes alternativas para transcetolasas, por ejemplo:

transcetolasa [*Shigella flexneri* 2a cep. 2457T] NP_838419.1
 transcetolasa [*Shigella boydii* CDC 3083-94] YP_001881708.1
 transcetolasa [*Escherichia albertii* TW07627] ZP_02900973.1
 transcetolasa [*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895] YP_001455802.1
 transcetolasa [*Citrobacter* sp. 30_2] ZP_04560349.1
 transcetolasa [*Citrobacter youngae* ATCC 29220] ZP_06355044.1
 transcetolasa [*Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316] ZP_05970189.1
 transcetolasa [*Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae* NCTC 9394] CBK86553.1
 transcetolasa [*Klebsiella pneumoniae* subesp. *pneumoniae* MGH 78578] YP_001336984.1
 transcetolasa 1 [*Citrobacter rodentium* ICC168] YP_003368408.1
 transcetolasa [*Klebsiella variicola* At-22] YP_003440166.1
 transcetolasa [*Klebsiella pneumoniae* 342] YP_002239249.1
 Transcetolasa 1 [*Cronobacter turicensis* z3032] YP_003211835.1
 transcetolasa [*Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894] YP_001436540.1
 transcetolasa [*Enterobacter cloacae* subesp. *cloacae* ATCC 13047] YP_003614730.1
 transcetolasa [*Erwinia tasmaniensis* Et1/99] YP_001908733.1
 transcetolasa [*Serratia odorifera* DSM 4582] ZP_06641778.1

Los números de registro proceden de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA). La fecha de facilitación de los números de registro fue el 2 de junio de 2010.

Dentro del alcance de la presente invención se encuentran proteínas codificadas por cualquiera de los genes indicados anteriormente, en particular los que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 60,

preferentemente las secuencias SEQ ID NO: 1 a 12.

Es obvio que pequeñas variaciones en la secuencia de nucleótidos de un gen no cambian significativamente las propiedades catalíticas de la proteína codificada. Por ejemplo, muchos cambios en la secuencia de nucleótidos no cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Además, una secuencia de aminoácidos puede tener variaciones, que no cambian las propiedades funcionales de una proteína, en particular, no impiden que una enzima realice su función catalítica. Como sabe un experto en la técnica, pueden existir o hacerse variaciones en regiones que están fuera de la región crítica con respecto a la función de la enzima y producir no obstante un polipéptido activo. Dichas variaciones en la secuencia de nucleótidos o en las moléculas de ADN o en la secuencia de aminoácidos se conocen como "equivalentes funcionales", porque no cambian significativamente la función del gen que codifica una proteína con una función particular, por ejemplo, catalizar una reacción particular o, respectivamente, cambiar la función particular de la proteína. Se desvelan equivalentes funcionales, que incluyen fragmentos o derivados, u homólogos más cercanos de las proteínas indicadas, en particular equivalentes funcionales de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 60, preferentemente secuencias SEQ ID NO: 1 a 12; por ejemplo genes que codifican secuencias de aminoácidos que muestran una identidad de al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, preferentemente al menos 65 %, preferentemente al menos 70 %, preferentemente al menos 75 %, preferentemente al menos 80 %, preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, incluso aún más preferentemente al menos 95 %, más preferentemente al menos 98 % con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las proteínas indicadas anteriormente, en particular secuencias SEQ ID NO: 1 a 60, preferentemente secuencias SEQ ID NO: 1 a 12; tales como genes que codifican proteínas que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 60, preferentemente secuencias SEQ ID NO: 1 a 12; por ejemplo también genes que codifican secuencias de aminoácidos que muestran una identidad de al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, preferentemente al menos 65 %, preferentemente al menos 70 %, preferentemente al menos 75 %, preferentemente al menos 80 %, preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, incluso más preferentemente al menos 95 %, cada vez más preferentemente al menos 98 % con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 60, preferentemente secuencias SEQ ID NO: 1 a 12. El término "identidad" se refiere a la identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, respectivamente comparadas entre sí desde el primer ácido nucleico hasta el último ácido nucleico o desde el primer aminoácido codificado por el gen correspondiente hasta el último aminoácido. La identidad de las secuencias de longitud completa puede medirse utilizando el programa BLAST (Altschul, S. F., T.L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman 1997. Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402). En la comparación se utilizan preferentemente las secuencias maduras de las proteínas.

Las bacterias que pertenecen a los géneros *Cupriavidus* o *Ralstonia* y que tienen la capacidad de expresar genes que codifican fosfomanosa isomerasa y la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa o el simportador E de xilosa y protones y opcionalmente manofructoquinasa tienen la capacidad crecer en maltosa como fuente de carbono. Un hospedador de *Cupriavidus* introducido para expresar un gen que codifique la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa, en particular *glf*, también puede utilizar glucosa como fuente de carbono.

La manosa puede encontrarse en materiales de madera y plantas, especialmente en hemicelulosas de maderas blandas (por ejemplo pino o abeto) que constan del polímero galactoglucomanano, en algunos frutos o bayas (por ejemplo, arándano), y en estructuras celulares de varios microorganismos tales como hongos (hongos filamentosos y levaduras) y microalgas (por ejemplo *Chlorella*, *Nannochloropsis* y *Phaeodacylum*).

Las bacterias que pertenecen a los géneros *Cupriavidus* o *Ralstonia* y que tienen la capacidad de expresar genes que codifican xilosa isomerasa y xiluloquinasa y un transportador ABC de alta afinidad o un simportador E de xilosa y protones tienen la capacidad de crecer en xilosa o xilosa y arabinosa como fuente de carbono. Un hospedador de *Cupriavidus* introducido para expresar genes que codifican el transportador ABC de alta afinidad, en particular genes que codifican Xyl F, Xyl G y Xyl H, también tienen la capacidad de utilizar glucosa y galactosa como fuente de carbono.

Además el microorganismo puede modificarse genéticamente para expresar transaldolasa y/o transcetolasa haciendo que el crecimiento del microorganismo sea más rápido.

Como se describe en el presente documento un microorganismo introducido para expresar un gen que codifique la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa tiene la capacidad de utilizar también glucosa. Esto se consigue en particular con el gen *glf*.

El microorganismo hospedador también tiene la capacidad de utilizar glucosa, si se introduce en la célula hospedadora para que exprese un gen que codifique glucoquinasa EC 2.7.1.2).

El microorganismo hospedador tiene la capacidad de utilizar manosa. En una realización un microorganismo de acuerdo con esta divulgación tiene la capacidad de utilizar una o más de manosa, glucosa, galactosa, xilosa y/o arabinosa como fuente de carbono.

En una realización un microorganismo de acuerdo con esta divulgación tiene la capacidad de utilizar manosa y opcionalmente glucosa como fuente de carbono.

5 En una realización adicional un microorganismo de acuerdo con esta divulgación tiene la capacidad de utilizar xilosa, o xilosa y arabinosa, y opcionalmente glucosa y/o galactosa como fuente de carbono.

10 Un microorganismo introducido para expresar xilosa isomerasa, xiluloquinasa y un transportador ABC de alta afinidad o simportador E de xilosa y proteína, tiene la capacidad de utilizar xilosa. Sorprendentemente, el microorganismo hospedador tiene la capacidad de utilizar también arabinosa. Para un mejor conocimiento de los autores de la presente invención, esta es la primera vez que un hospedador de *Ralstonia* o *Cupriavidus* ha obtenido la capacidad de utilizar arabinosa. En la técnica anterior, Buchholz *et al.* (1994) transfirieron un hospedador de *Alcaligenes eutrophus* mediante un inserto de 28 kb, 16,4 de las cuales comprendían la información mínima necesaria para la utilización de xilosa por *A. eutrophus*. Buchholz *et al.* dieron por hecho que los genes *xyl*, que codifican xilosa isomerasa y xiluloquinasa, se localizaban dentro de esta región, dado que se indujeron durante el crecimiento en xilosa. Buchholz *et al.* obtuvieron tres transconjugantes que crecieron en xilosa como única fuente de carbono y energía, pero no se obtuvieron cepas que utilizarasen ribosa o arabinosa. Como se desvela en el presente documento, los microorganismos hospedadores se han introducido para expresar insertos que constan esencialmente de secuencias de nucleótidos necesarias para la utilización de xilosa. Sorprendentemente las construcciones hacen que el hospedador tenga la capacidad de utilizar también arabinosa.

20 Un microorganismo introducido para expresar un transportador ABC de alta afinidad, en particular genes que codifican Xyl F, Xyl G y Xyl H, tiene sorprendentemente la capacidad de utilizar también glucosa y galactosa como fuente de carbono.

25 La actividad de MAK (manofructoquinasa), PMI (fosfomanosa isomerasa), GLK (glucoquinasa) puede ensayarse por métodos bien conocidos en la técnica. Pueden aplicarse fracciones de proteínas solubles de la cepa hospedadora recombinante para mediciones de actividad de MAK, PMI y GLK a 30 °C utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Nicolet Evolution 100 (Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK). La actividad de MAK puede ensayarse con un sistema acoplado a NADH como el descrito por Sebastian y Asensio (1972) con algunas modificaciones como las descritas en los ejemplos.

La actividad de PMI puede medirse con un ensayo acoplado a NADP (Kang y Markovitz 1967) con algunas modificaciones como las descritas en los ejemplos.

35 La actividad de GLK puede medirse con un sistema acoplado a NADPH de acuerdo con el método de Gottschalk (Gottschalk *et al.* 1964) con modificaciones como las descritas en los ejemplos.

40 La actividad de XylA y XylB puede ensayarse por métodos bien conocidos en la técnica. Las fracciones de proteínas solubles de la cepa hospedadora recombinante pueden aplicarse para mediciones de la actividad de XylA y XylB a 30 °C utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Nicolet Evolution 100 (Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK). La actividad de XylA (Gao *et al.* 2002, Mejnen *et al.* 2008) o XylB (Shamanna y Sangerson 1979, Eliasson *et al.* 2000) puede ensayarse con un sistema acoplado a NADH con algunas modificaciones, utilizando sorbitol deshidrogenasa o piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa, respectivamente, como enzimas auxiliares como se describe en los ejemplos.

45 En el presente documento, los "elementos reguladores" se refieren a elementos reguladores que pueden regular la expresión de un gen extraño introducido en una célula hospedadora, en este caso en particular en *Cupriavidus* o *Ralstonia*. Los elementos reguladores incluyen promotores, terminadores, potenciadores y secuencia señal.

50 En el presente documento, "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, normalmente una molécula de ADN, que puede utilizarse para transferir material genético extraño en una célula hospedadora. Un vector puede ser un plásmido, un bacteriófago, un virus o un cósmido, siendo en este caso normalmente un plásmido. Preferentemente el vector es un vector de amplio rango de hospedador. En algunas realizaciones, el vector puede ser un vector episomal no incorporado en el genoma de la célula hospedadora. En otra realización el vector puede estar integrado en el genoma de la célula hospedadora.

Los plásmidos de amplio rango de hospedador permiten la replicación en diversas especies de bacterias y no están restringidos a bacterias de determinados géneros o especies.

60 En una realización de la invención un vector puede comprender un gen que codifique la fosfomanosa isomerasa, un gen que codifique la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa, un gen que codifique el simportador E de xilosa y protones y/o un gen que codifique la manofructoquinasa. Los genes pueden estar en el mismo vector o en vectores distintos.

65 En otra realización de la invención un vector puede comprender un gen que codifique la xilosa isomerasa, la xiluloquinasa, el simportador E de xilosa y protones y/o un transportador ABC de alta afinidad. Los genes pueden

estar en el mismo vector o en vectores distintos.

En una realización de la invención el vector puede ser un vector de amplio rango de hospedador. Esto proporciona la ventaja de que la ampliación del rango del sustrato puede conseguirse con vectores de amplio rango de hospedador en cualquiera de las especies o cepas de *Cupriavidus* o *Ralstonia*.

Preferentemente el vector es un vector con alto número de copias.

Adicionalmente, el vector comprende elementos reguladores, en particular un promotor, para regular la expresión de dichos genes en *Cupriavidus* o *Ralstonia*. Preferentemente el vector comprende un promotor fuerte para la expresión de los genes deseados en *Cupriavidus* o *Ralstonia*.

En una realización, los elementos reguladores en el vector pueden comprender el promotor de neokanamicina, el promotor *lac* o el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Además pueden utilizarse los siguientes promotores: el promotor P2, normalmente de *Pseudomonas syringae* (Solaiman y Swingle 2010), en particular del plásmido pBS29-P2 (Solaiman *et al.* 2010), el promotor de hidrogenasa (SH), normalmente de *R. eutropha* (Porthun *et al.* 2002, Schwartz *et al.* 1998), y el promotor P_L, normalmente del operón *cbb* (Jeffke *et al.* 1999, Schäferjohann *et al.* 1996, Windhövel y Bowien 1990).

Preferentemente los promotores son constitutivos.

Los promotores adecuados son en este caso en particular un promotor *lac* constitutivo (P_{lac}) (Siedow *et al.* 1999), promotor de neokanamicina (P_{nk}), promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (P_{GAPDH}).

Son vectores adecuados para su uso en la invención, por ejemplo pBBR1 MCS y sus derivados pBBR1 MCS-2, pBBR1 MCS-3, pBBR1 MCS-4 y pBBR1 MCS-5 (Kovach *et al.* 1995).

Además, en la invención, puede utilizarse el plásmido lanzadera pBHR1 (MoBiTec GmbH, Göttingen, Alemania) (Aneja *et al.* 2009).

El plásmido pKT230 (Park *et al.* 1995), que procede de un plásmido de amplio rango de hospedador RSF1010 (Franklin *et al.* 1981) también puede utilizarse en la invención.

Además, en la presente invención, pueden utilizarse los plásmidos pBS29 (Swingle *et al.* 2008) o pBS29-P2 (Solaiman *et al.* 2010), que proceden del plásmido pUCP26, que tienen la capacidad de replicarse en *E. coli* y en especies de *Pseudomonas* (West *et al.* 1994).

Dentro del ámbito de la presente invención también está la producción de productos químicos deseados utilizando los microorganismos modificados de acuerdo con la invención. Los productos químicos deseados pueden ser productos, tales como polihidroalquilcanoatos, producidos de manera natural por la célula hospedadora (Reinecke y Steinbuchel 2009 y Verlinden *et al.* 2007) o puede introducirse el hospedador para que exprese los productos químicos deseados, por ejemplo lípidos. En el documento WO 2007136762 se han desvelado genes que pueden utilizarse para modificar genéticamente microorganismos hospedadores para expresar diversos lípidos. La capacidad de un hospedador de *Cupriavidus* o *Ralstonia* para producir lípidos se ilustró introduciendo un hospedador de *Cupriavidus* o *Ralstonia* para expresar ésteres etílicos de ácidos grasos (EEAG). Esto se llevó a cabo expresando en un mutante negativo a polihidroxibutirato (PHB) del hospedador H16 de *R. eutropha*, genes que codifican sintasa de éster ceroso/diacilglicerol aciltransferasa (*atfA*), piruvato descarboxilasa (*pdc*) y alcohol deshidrogenasa B (*adhB*).

El beneficio de esta invención es un rango de utilización de sustrato ampliado de *Cupriavidus* o *Ralstonia* hacia hidratos de carbono abundantes y asequibles. La ampliación del rango de sustrato se realizó utilizando plásmidos de rango de hospedador ampliado que hacen posible ampliar el rango de sustrato en cualquier especie o cepa de los hospedadores de *Cupriavidus* o *Ralstonia*. A través de métodos químicos es posible introducir solo una mutación en una cepa específica. Además, en los mutantes inducidos químicamente existe el riesgo de producirse mutaciones adicionales que podrían afectar a la productividad y/o podrían conducir a efectos secundarios desfavorables.

La presente invención se ilustró construyendo dos cepas recombinantes diferentes de *Ralstonia*, más específicamente dos cepas H16 de *R. eutropha*. Las cepas se desarrollaron para tener la capacidad de utilizar manosa/glucosa, y xilosa/arabinosa respectivamente, por modificación genética metabólica. La inducción de genes diferentes en *R. eutropha*, necesarios bien para la captación de glucosa/manosa y para la utilización de manosa, o bien para la captación y utilización de xilosa, respectivamente, complementó las partes que faltaban de o bien glucosa/manosa o bien el catabolismo de xilosa/arabinosa, respectivamente. Las cepas recombinantes de *R. eutropha* con el rango de utilización de sustrato ampliado sintetizaron poli(3-hidroxibutirato) PHB a partir de glucosa, manosa, xilosa y arabinosa en cantidades similares a las de gluconato.

En una realización de la invención, en *Cupriavidus* o *Ralstonia*, pueden expresarse genes que son sensibles a la captación y conversión de azúcares. Las hexoquinasas de otros procariotas, tales como *Leuconostoc mesenteroides*

o *Streptomyces* sp., que también exhiben una actividad para manosa (Anderson y Sapico 1975, Coulombel *et al.* 1982), pueden expresarse en *Cupriavidus* o *Ralstonia* para mejorar la conversión de azúcares en el hospedador. Para potenciar la utilización de manosa en *Ralstonia* puede utilizarse una sobreexpresión de la hexoquinasa, cromosómicamente codificada, con su actividad secundaria para manosa. Los plásmidos pBBR utilizados en los ejemplos pueden reemplazarse, por ejemplo, por vectores con alto número de copias y/o con fuertes promotores (Kovach *et al.* 1995, Siedow *et al.* 1999), o por otros vectores más adecuados para la expresión de los genes deseados para la utilización de manosa. El promotor *lac* puede reemplazarse por un promotor constitutivo más fuerte, por ejemplo, el promotor de neokanamicina como se describe en el presente documento y que proporciona niveles de expresión elevados. Los genes deseados también pueden integrarse en el genoma de *Cupriavidus* o *Ralstonia* proporcionando ventajas, tales como estabilidad. Además, los mutantes que contienen integraciones sin marcadores en sus genomas no están sometidos a ninguna selección, lo que ahorra costes especialmente para cultivos a gran escala.

De acuerdo con una realización adicional, la presente invención proporciona un método que comprende permitir que el microorganismo sintetice productos químicos a granel, tales como lípidos, por ejemplo, polihidroxialcanoatos, ácidos grasos o derivados de ácidos grasos y recuperar el producto químico del medio de cultivo o de las células.

En el cultivo de *Cupriavidus* o *Ralstonia* puede utilizarse cualquier medio de cultivo que comprenda componentes adecuados para el crecimiento de *Cupriavidus* o *Ralstonia*. Normalmente estos incluyen una fuente de carbono y/o de nutrientes, sales, normalmente sales minerales, y agua. Pueden ser necesarios marcadores de selección, tales como genes de resistencia a antibióticos, para confirmar la presencia de genes deseados en las células hospedadoras.

La utilización de sustrato de *Ralstonia* se ha ilustrado cultivando *Cupriavidus* o *Ralstonia* en un medio con sales minerales (MSM) descrito por Schlegel *et al.* (1961). En aplicaciones industriales el medio de cultivo comprende normalmente azúcares monoméricos que se originan de materiales lignocelulósicos, como fuente de carbono, y además posiblemente nutrientes y sales o componentes de los mismos como micro- y macro- nutrientes, y agua.

En el cultivo de *Cupriavidus* o *Ralstonia* pueden utilizarse condiciones de cultivo adecuadas para el cultivo de *Cupriavidus* o *Ralstonia*. Dichas condiciones de cultivo son bien conocidas por un experto en la materia. En el cultivo pueden utilizarse medios líquidos o sólidos. Los cultivos líquidos pueden agitarse, siendo una agitación adecuada de 50 -1000 rpm, normalmente de 100 - 600 rpm. La temperatura del cultivo es normalmente de 15 a 45, preferentemente de 25 a 37 °C, normalmente de 30 °C. El tiempo de incubación puede ser de 1 día a 14 días, normalmente de 2 a 7 días, preferentemente de 24 a 72 horas. El cultivo puede ser un cultivo discontinuo, semicontinuo o continuo.

Se cultivaron *Escherichia coli* y *Zymomonas mobilis* mediante métodos muy conocidos por un experto en la técnica y se describe en los ejemplos.

Como se describe en el presente documento, se cultivaron cepas de *Ralstonia* recombinantes y cepas de tipo silvestre en diferentes fuentes de carbono. Las células se incubaron durante 5 días a 30 °C en placas de agar con MSM que contenían 1 % (peso/vol) de la fuente de carbono respectiva. Se examinó el fenotipo del crecimiento de las colonias visibles. Caracteres: (++) crecimiento después de un tiempo de incubación de 24-72 h, (+) crecimiento después de un tiempo de incubación mayor de 72 h, (-) crecimiento detectable no visible. Se examinó el uso de las siguientes fuentes de carbono: L-Arabinosa, D- fructosa, D-galactosa, D- gluconato, D-glucosa, D-glicerol, D- maltosa-manitol, D-manosa, N-acetil-D-glucosamina, piruvato, D, ribosa, D-trehalosa y D-xilosa.

La actividad de MAK (manofructoquinasa), PMI (fosfomanosa isomerasa), GLK (glucoquinasa) puede ensayarse por métodos muy conocidos en la técnica. Para las mediciones de actividad de MAK, PMI y GLK pueden aplicarse fracciones de proteínas solubles de cepas hospedadoras recombinantes a una temperatura de 30 °C, utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Nicolet Evolution 100 (Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK). La actividad de MAK puede ensayarse con un sistema acoplado NADH como el descrito por Sebastian y Asensio (1972) con algunas modificaciones como se describe en los ejemplos.

La actividad de PMI puede medirse con un sistema acoplado a NADPH (Kang y Markovitz 1967) con algunas modificaciones como se describe en los ejemplos.

La actividad de GLK puede medirse con un sistema acoplado a NADPH de acuerdo con el método de Gottschalk (Gottschalk *et al.* 1964) con modificaciones como se describe en los ejemplos.

La presente invención se ha ilustrado generando recombinantes de la cepa H16 de *R. eutropha* que, a diferencia de la de tipo silvestre, pudo utilizar manosa y/o glucosa como fuentes de carbono únicas. Se introdujeron hasta cuatro genes (*glf*, *glk*, *mak*, *pmi*) de manera episomal en la cepa H16 de *R. eutropha* bajo el control de un promotor constitutivo de neokanamicina o *lac*, lo que permitió la captación y la conversión de glucosa y manosa en productos intermedios de la ruta KDPG.

Las bacterias que pertenecen a los géneros *Ralstonia* y *Cupriavidus* normalmente tienen un espectro de utilización de sustrato muy estrecho y sólo está limitada la cantidad de azúcares. Por ejemplo, la capacidad de la cepa H16 de *Ralstonia eutropha* para utilizar hidratos de carbono y compuestos relacionados está limitada a fructosa, N-acetilglucosamina y gluconato. Para ampliar el rango de utilización de sustrato de las cepas de *Ralstonia* y *Cupriavidus*, las cepas se modificaron por ingeniería genética para utilizar manosa como única fuente de carbono para el crecimiento. Los genes que codifican una proteína de difusión facilitada (*glf*) de *Zymomonas mobilis* y manofructoquinasa (*mak*), fosfomanosa isomerasa (*pmi*) y glucoquinasa (*glk*) de *E. coli*, bien en solitario o en combinación, se expresaron de manera constitutiva en *R. eutropha* bajo el control del promotor lac, utilizando un vector episomal con rango de hospedador amplio. Las cepas recombinantes que llevaban pBBR1 MCS-3::*glf::mak::pmi* o pBBRMCS-3::*glf::pmi* crecieron en manosa, mientras que pBBR1 MCS-3::*glf::mak* y pBBR1 MCS-3::*glf* no confirieron la capacidad de utilizar manosa como fuente de carbono en *R. eutropha*. Las cepas recombinantes que llevaban pBBR1MCS-3::*glf::mak::pmi* mostraron un crecimiento más rápido en manosa que las que llevaba pBBR1 MCS-3::*glf::pmi*. Estos datos indican que se requiere fosfomanosa isomerasa para convertir manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato para el catabolismo posterior mediante la ruta de Entner-Doudoroff. Además, sorprendentemente, todos los plásmidos confirieron a *Ralstonia* la capacidad de crecer también en presencia de glucosa.

Adicionalmente, la expresión de las enzimas respectivas se demostró a nivel de la transcripción y midiendo las actividades de manofructoquinasa (0,14 U mg⁻¹ proteína), y fosfomanosa isomerasa (0,25 U mg⁻¹ proteína).

Para identificar genes en el genoma de *R. eutropha* H16 que codifican enzimas funcionales necesarias para la captación y el catabolismo de D-xilosa, se efectuó un análisis BLAST de proteína-proteína (Altschul *et al.* 1990) utilizando una base de datos de secuencias de aminoácidos de *R. eutropha* H16 (Pohlmann *et al.* 2006). No pudieron identificarse genes que codificasen a un transportador específico para D-xilosa (Pohlmann *et al.* 2006). Tampoco se identificaron genes que codificasen enzimas catabolizadoras de D-xilosa, por ejemplo, una xilosa isomerasa o xilulosa quinasa. De hecho, *R. eutropha* H16 posee genes para codificar una fructoquinasa y una glucoquinasa (Pohlmann *et al.* 2006). El resto de genes, que codifican enzimas de la ruta de la pentosa fosfato no oxidativa para el catabolismo adicional de la D-xilulosa-5-fosfato están presentes en la cepa H16 de *R. eutropha*.

La construcción de hospedadores de *Ralstonia* para utilizar xilosa como única fuente de carbono para el crecimiento se ilustró utilizando cepas de *R. eutropha*. Los genes que codifican un simportador de D-xilosa y protones de baja afinidad (*xyIE*), un transportador ABC de alta afinidad (*xy- IFGH*), una xilosa isomerasa (*xyIA*) y una xiluloquinasa (*xyIB*) de *E. coli* se expresaron de manera constitutiva en combinación en hospedadores de *Ralstonia* bajo el control de un promotor lac y el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), respectivamente, utilizando un vector episomal con rango de hospedador amplio. Las cepas recombinantes que llevaban pBBR1 MCS-3::*xyIABFGH* crecieron en xilosa confiriendo a *Ralstonia* la capacidad de utilizar xilosa como fuente de carbono. Además, sorprendentemente, los plásmidos que conferían a *Ralstonia* la capacidad de utilizar xilosa, conferían también la capacidad de crecer en presencia de arabinosa.

Para ilustrar la capacidad de las cepas recombinantes de *R. eutropha* de producir PHB a partir de manosa o glucosa, se cultivaron células de *Ralstonia* en condiciones permisivas para la acumulación de PHB en MSM que contenía manosa, glucosa o gluconato sódico al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono conteniendo tetraciclina o kanamicina, respectivamente, para la selección y NH₄Cl al 0,05 % (peso/vol). El contenido de PHB de las células se analizó por cromatografía de gases como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los cultivos que contenían gluconato como única fuente de carbono sirvieron como una referencia para la cepa recombinante y se tomaron muestras en la fase temprana de crecimiento estacionario. Un análisis de CG de las células reveló un contenido de PHB de 63 % (peso/peso) de masa seca celular. También se examinaron células que crecieron en presencia de glucosa o manosa al 1 % (peso/vol) en la fase de crecimiento estacionario, y se determinó el contenido de PHB de 65 y 67 % (peso/peso) de masa seca celular, respectivamente.

Para ilustrar la capacidad de las cepas recombinantes de *R. eutropha* para producir PHB a partir de xilosa y arabinosa, las células se cultivaron en condiciones permisivas para la acumulación de PHB en MSM que contenía D-xilosa, L-arabinosa o gluconato sódico al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono conteniendo tetraciclina, respectivamente, para la selección y NH₄Cl al 0,05 % (peso/vol). El contenido de PHB de las células se analizó con cromatografía de gases como se describe en los Ejemplos y en la sección de Métodos y materiales. Los cultivos que contenían gluconato como una única fuente de carbono sirvieron como una referencia para la cepa recombinante, y se tomaron muestras en la fase temprana de crecimiento estacionario. Un análisis de CG de las células reveló que estas podían producir PHB. También se examinaron células que crecieron en presencia de L-arabinosa o D-xilosa al 1 % (peso/vol) en la fase de crecimiento estacionario y se mostró la producción de PHB.

Las cepas recombinantes de *R. eutropha* con el rango de utilización de sustrato ampliado pudieron por tanto sintetizar poli(3-hidroxibutirato) PHB a partir de glucosa, manosa, xilosa y arabinosa en cantidades similares a las de a partir de gluconato.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

- 5 **Cepas bacterianas, plásmidos, oligonucleótidos y condiciones de cultivo.** Todas las bacterias, plásmidos y
cebadores utilizados en esta solicitud se indican en la Tabla 1. Células de la cepa H16 de *R. eutropha* se cultivaron
en medio con sales minerales (MSM) como describen Schlegel *et al.* (1961). Se añadieron fuentes de carbono al
MSM líquido como se indica en el texto. Los cultivos líquidos se cultivaron en matraces Erlenmeyer en un agitador
rotativo horizontal a una agitación de 110 rpm. Los medios sólidos se prepararon mediante la adición de agar agar al
10 1,5 % (peso/vol). Se cultivaron células de *Escherichia coli* a 37 °C en caldo de lisogenia (CL) [Sambrook *et al.* 1989].
Se cultivaron células de *Zymomonas mobilis* en un medio que contenía bactopectona 10 g/l, extracto de levadura
10 g/l y glucosa 20 g/l. Se aplicaron antibióticos de acuerdo con Sambrook *et al.* (1989) como se indica en el texto.

Tabla 1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.

Cepa, plásmido o cebador	Características relevantes	Fuente de referencia
Cepas		
<i>E. coli</i> K-12	<i>Tipo silvestre</i>	DSM 426
<i>E. coli</i> TOP 10	F-mcrA, <i>A(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZAM15, AlacX74, deoR, recA1, araD139, A(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA1, thiP, hsdR17</i> (r ⁻ , m ⁺), <i>proA</i> , transgenes del plásmido RP4 cromosómicamente integrado (cepa de movilización)	Simon <i>et al.</i> 1983
<i>E. coli</i> JE5511	Hfr, <i>manA4, lpp-1, pps-6</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center (Hirota <i>et al.</i> 1977)
<i>R. eutropha</i> cepa H16	<i>Tipo silvestre</i>	DSM 428
<i>Z. mobilis</i> subesp. <i>mobilis</i>	<i>Tipo silvestre</i>	DSM 424 ATCC 10988
<i>Z. mobilis</i> subesp. <i>mobilis</i>	<i>Tipo silvestre</i>	DSM3580 ATCC 9191
Plásmidos		
pJET1.2/romo	Ap ^r	Fermentas
pCR2.1	Ap ^r , Km ^r , LacZ- α	Invitrogen
pJET1.2::gff	con gff como producto PCR de extremo romo	en los ejemplos
pJET1.2::mak	con mak como producto PCR de extremo romo	en los ejemplos
pJET1.2::pmi	con pmi como producto PCR de extremo romo	en los ejemplos
pCR2.1::P _{rk}	con promotor de neokanamidina como fragmento <i>XhoI/NdeI</i>	en los ejemplos
pCR2.1::P _{rk} ::g/l/c	con promotor de neokanamidina y <i>gfk</i> como fragmento <i>XhoI/EcoRI</i>	en los ejemplos
pBBR1 MCS-3	Tc ^r , LacZ- α , <i>mob, rep</i>	Kovach <i>et al.</i> 1995
pBBR1MCS-2::P _{rk} ::gff	con promotor de neokanamidina y <i>gff</i> como fragmento <i>XhoI/SacI</i>	en los ejemplos
pBBR1 MCS-2::P _{rk} ::gfk::gff	con promotor de neokanamidina, <i>gfk</i> y <i>gff</i> como fragmento <i>XhoI/SacI</i>	en los ejemplos
pBBR1MCS-3::gff	con gff como fragmento <i>KpnI/PstI</i>	en los ejemplos
pBBR1 MCS-3::gff::mak	con gff y mak como fragmento <i>KpnI/XbaI</i>	en los ejemplos
pBBR1 MCS-3::gff::pmi	con gff como fragmento <i>KpnI/PstI</i> y <i>pmi</i> como fragmento <i>XbaI/SacI</i>	en los ejemplos
pBBR1 MCS-3::gff::mak::pmi	con gff, mak y <i>pmi</i> como fragmento <i>KpnI/SacI</i>	en los ejemplos
Oligonucleótidos		
<i>Pgff KpnI/J</i>	5'GGTACCAAGGAAGGACTGATCATG AGTTCTGAAAGTAGTCAGGGTCTA GTC3' (SEQ ID NO: 61)	
<i>Pgff PstI_r</i>	5'CTGCAGCTACTTCTGGGAGCGCCACATC3' (SEQ ID NO: 62)	

<i>Pmak_PstI</i> J	5' <u>CTGCAG</u> AGGAAGGACTGATC GTGOGTATAGGTATCGATTTAGGGG3' (SEQ ID NO: 63)	
<i>Pmak_XbaI_r</i>	5'TCTAGATTACTCTTGTCGCCATAACCAAGC3' (SEQ ID NO: 64)	
<i>Ppmi_XbaI</i>	5'TCTAGAAAGGAAGTGCAGCTC ATGCAAAAACCTAATTAAGTCAGTG CAAAAC3' (SEQ ID NO: 65)	
<i>Ppmi_SacI_r</i>	5' <u>GAGCTCTT</u> ACAGCTTGTGTAACACGCGCTAAAC3' (SEQ ID NO: 66)	
<i>glf_RJ J</i>	5'GTTCTATCGATTGGGTTAATGCCAGTGG3' (SEQ ID NO: 67)	
<i>glf_RT_r</i>	5'GGAACATCTGGGTGCATAATACAGC3' (SEQ ID NO: 68)	
<i>mak_RT_f</i>	5'GCGAGGTGCAGCGGGAAGTG3 (SEQ ID NO: 69)	
<i>mak_RT_r</i>	5'AATTTCAGTCGCTTTCAGCGCATGTCC3' (SEQ ID NO: 70)	
<i>pmf_RT_f</i>	5'CGCTGAOGCCTTCTCTGGAT3' (SEQ ID NO: 71)	
<i>pmi_RT_r</i>	5'GCGGTGTTTCAGCGAACAGGAACA3' (SEQ ID NO: 72)	
cebador de secuenciación directo pJET1.2, 23 meros	5'CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC3' (SEQ ID NO: 73)	Fermentas
cebador de secuenciación inverso pJET1.2, 24 meros	5'AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG3' (SEQ ID NO: 74)	Fermentas
M13/pUC directo, 17 meros	5'GTAAAAACGACGGGCCAGT3' (SEQ ID NO: 75)	Jena Bioscience
<i>F_Pnk_XhoI</i>	5'CTCGAGCGCGGAATTGCCAGCTGGGG3' (SEQ ID NO: 76)	
<i>R_Pnk_Adel</i>	5' <u>CATATG</u> AAACGATCCTCATCCTGTCTCTTG3' (SEQ ID NO: 77)	
<i>F_glk_NdeI</i>	5' <u>CATATG</u> ACAAAAGTATGCATTAGTCGGTGATGTGGG3' (SEQ ID NO: 78)	
<i>R_glk_SaI</i>	5' <u>GTCGACTT</u> ACAGAATGTGACCTAAGGCTGGCGTAAATGTGC3' (SEQ ID NO: 79)	
<i>F_glf_BamHI</i>	5'GGATCCATGAGGATOGTTTCGCATGAGTTCTGAAAGTAGTCAGGGTCTAGT3' (SEQ ID NO: 80)	
<i>R_glf_SacI</i>	5' <u>GAGCTCCT</u> ACTTCTGTGGAGCGCCACATCTCCTCG3' (SEQ ID NO: 81)	

Tabla 2. Crecimiento de la cepa H16 de *R. eutropha* recombinante y de tipo silvestre (control negativo) en diferentes fuentes de carbono. Las células se incubaron durante 5 días a 30 °C en placas de agar con MSM que contenía 1 % (peso/vol) de la fuente de carbono respectiva. Se examinó el fenotipo del crecimiento de las colonias visibles. Caracteres: (++) crecimiento después de un tiempo de incubación de 24-72 h, (+) crecimiento después de un tiempo de incubación mayor de 72 h, (-) crecimiento detectable no visible.

Fuente de carbono	Cepa H16 de <i>R. eutropha</i> de tipo silvestre	<i>R. eutropha</i> que lleva pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi	<i>R. eutropha</i> que lleva pBBR1MCS-2::P _{nk} ::glk::glf
L-arabinosa	-	-	-
D-fructosa	++	++	++
D-galactosa	-	-	-
D-gluconato	++	++	++
D-glucosa	-	+	++
D-glicerol	+	+	+
D-maltosa	-	-	-
D-manitol	-	-	-
D-manosa	-	+	-
N-acetil-D-glucosamina	++	++	++
Piruvato	++	++	++
D-ribosa	-	-	-
D-trehalosa	-	-	-
D-xilosa	-	-	-

Aislamiento, análisis y modificación de ADN. Se preparó ADN plasmídico de lisados en bruto mediante el método de extracción alcalina (Birnboim y Doly 1979). Se preparó ADN total de *Z. mobilis* DSM 424 o DSM 3580 y de la cepa K-12 de *E. coli* utilizando el kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN se restringió con endonucleasas de restricción (Gibco/BRL, Gaithersburg, USA) en condiciones recomendadas por el fabricante. El resto de los procedimientos genéticos y de las manipulaciones genéticas se realizaron como describen Sambrook *et al.* (1989).

Construcciones de plásmidos y su transferencia en la cepa H16 de *R. eutropha*. Las regiones codificantes de *glf* de *Z. mobilis mobilis* DSM424 y DSM3580, y de *glk*, *mak* y *pmi* de *E. coli*, respectivamente, se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos *Pglf_KpnI_f*, *Pglf_PstI_r*, *F_glf_BamHI* y *R_glf_SacI* para la amplificación de *glf*, *F_Pnk_XhoI* y *R_Pnk_NdeI* para *P_{nk}*, *F_glk_NdeI* y *R_glk_Sall* para *glk*, *Pmak_PstI_f* y *Pmak_XbaI_r* para la amplificación de *mak*, o *Ppmi_XbaI_f* y *Ppmi_SacI_r* para la amplificación de *pmi*, respectivamente (Tabla 1). Para la PCR, se utilizó ADN polimerasa KOD Hot Start (Merck, Darmstadt, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después, los productos de la PCR se clonaron en el vector de clonación pJET1.2/romo (Fermentas, Alemania) utilizando ADN ligasa de T4 (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) o en el vector de clonación pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, Alemania) y se transfirieron al interior de la cepa TOP10 de *E. coli*. Los plásmidos se aislaron de clones resistentes a ampicilina, y los fragmentos clonados se escindieron por restricción con enzimas de restricción adecuadas respectivas para la clonación adicional, se extrajeron del gel después de la separación utilizando el kit de extracción en gel E.Z.N.A (Omega Bio-tec, Bangalore, India). Para los experimentos de expresión en la cepa H16 de *R. eutropha*, se utilizaron los vectores con rango de hospedador amplio pBBR1MCS-2 y pBBR1MCS-3 para la clonación de *glf*, *glk*, *mak* y *pmi*. El vector pBBR1MCS-2 confirió resistencia a kanamicina, mientras que pBBR1 MCS-3 confirió resistencia a tetraciclina para la selección en *E. coli* y la cepa H16 de *R. eutropha*. La región codificante de *glf* se escindió por restricción con *KpnI* y *PstI* y se ligó al plásmido pBBR1 MCS-3 linealizado con *KpnI/PstI*, produciendo plásmidos pBBR1MCS-3::glf (Fig. 2). La secuencia codificante del promotor de neokanamicina *P_{nk}* se amplificó utilizando los cebadores *F_Pnk_XhoI* y *R_Pnk_NdeI* utilizando el vector aislado pBBR1 MCS-2 y adicionalmente se ligó en el vector pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante produciendo pCR2.1::P_{nk}. El gen *glk* se amplificó mediante PCR a medida a partir de ADN total de *E. coli* K12 utilizando como cebadores los oligonucleótidos *F_glk_NdeI* y *R_glk_Sall*. El producto de la PCR resultante se clonó como fragmento *NdeI/Sall* en pCR2.1::P_{nk}, produciendo pCR2.1::P_{nk}::glk. El gen *glf* se amplificó mediante PCR a medida a partir de ADN total de *Z. mobilis* DSM3580 utilizando como cebadores los oligonucleótidos *F_glf_BamHI* y *R_glf_SacI*. El producto de la PCR resultante se clonó como fragmento *BamHI/SacI* en pBBR1 MCS-2, produciendo pBBR1MCS-2::glf. Para obtener el plásmido pBBR1MCS-2::P_{nk}::glk::glf, la región codificante de *P_{nk}::glk* se escindió por restricción con *XhoI* y *EcoRI* del plásmido pCR2.1::P_{nk}::glk y se ligó en pBBR1MCS-2::glf linealizado con *XhoI/EcoRI*. La secuencia codificante de *glk* se escindió adicionalmente por restricción con *NdeI/Sall* del plásmido pBBR1MCS- 2::P_{nk}::glk::glf, el plásmido linealizado se enromó utilizando T4 polimerasa (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) y volvió a ligarse utilizando ADN ligasa de T4 (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) produciendo el plásmido pBBR1MCS-2::P_{nk}::glf. Para obtener los plásmidos pBBR1MCS-3::glf::mak y pBBR1MCS-3::glf::pmi, las regiones codificantes de *mak* y *pmi* se escindieron por restricción con *PstI* y

*Xba*I o *Xba*I y *Sac*I, respectivamente, y se ligaron con el plásmido pBBR1MCS- 3::glf linealizado con *Pst*I/*Xba*I y *Xba*I/*Sac*I, respectivamente (Fig. 2). Las regiones codificantes escindidas de *mak* y *pmi* también se ligaron entre sí con el plásmido pBBR1MCS-3::glf linealizado con *Pst*I/*Sac*I produciendo pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi (Fig. 2). Todos los plásmidos se transfirieron a la cepa S17-1 *E. coli* por transformación (Hanahan 1983).

Transferencia de ADN por conjugación. La transferencia de los plásmidos pBBR1 MCS-2, pBBR1MCS-2::P_{nk}::glf, pBBR1MCS- 2::P_{nk}::glk::glf, pBBR1 MCS-3, pBBR1MCS-3::glf, pBBR1MCS-3::glf::mak, pBBR1MCS-3: :glf::pmi y pBBR1MCS- 3::glf::mak::pmi (Tabla 1) se realizó por conjugación aplicando un protocolo previamente descrito (Friedrich *et al.* 1981), utilizando la cepa S17-1 de *E. coli* como donante y la cepa H16 de *R. eutropha* como receptora.

Análisis de secuencia de ADN. El ADN se secuenció en un sistema de electroforesis con el analizador de ADN 48-capillary 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para la secuenciación de insertos en el vector de donación pJET1.2/romo (Fermentas, Alemania) se utilizó el cebador de secuenciación directo pJET1.2, de 23 meros y el cebador de secuenciación inverso, pJET1.2, de 24 meros. Para la secuenciación de los insertos en los plásmidos pBBR1 MCS-2 y pBBR1 MCS-3 se utilizaron los cebadores directo M13/pUC e inverso M13/pUC universales (Kovach *et al.* 1995).

Análisis RT-PCR de ARN total aislado de la cepa H16 de *R. eutropha*. Se preparó ARN total sin ADN de la cepa H16 de *R. eutropha* utilizando el kit de purificación ARN RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para la identificación de ARNm procedente de *glf*-, *mak*- y *pmi*-, se aplicó RT-PCR utilizando los oligonucleótidos *glf_RT_f*, *glf_RT_r*, *mak_RT_f*, *mak_RT_r*, *pmi_RT_f* y *pmi_RT_r* (Tabla 1). La RT-PCR se realizó utilizando un kit de Qiagen OneStep para RT-PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante y como molde ARN 0,5 ng. Para excluir cualquier contaminación de ADN que pudiese servir como molde para la PCR, se añadió ARN molde en un experimento de control, después de la inactivación de la transcriptasa inversa durante 15 min a 95 °C en presencia de *Taq*-polimerasa. La ausencia de productos de la PCR indicó que los productos de la RT-PCR no procedían de ADN contaminante.

Preparación de fracciones de proteínas solubles de la cepa H16 de *R. eutropha*. Se cultivaron células de cepas recombinantes de la cepa H16 de *R. eutropha* como se ha descrito anteriormente en presencia de gluconato sódico al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono. Las células se recogieron por centrifugación durante 15 min a 4 °C y a 3.500 x g, se lavaron con tampón MOPS 100 mM (pH 7,0) y se resuspendieron en dos volúmenes del mismo tampón. La alteración se realizó por ultrasonido empleando un Sonifer 250 (Branson Sonic Power Company) con una amplitud de 16 µm (1 min/ml; control de salida 50 %). Durante el ultrasonido las muestras se enfriaron con una mezcla de NaCl-hielo. Se prepararon fracciones de proteínas sin membrana solubles por ultracentrifugación durante 60 minutos de extractos en bruto a 100.000 x g y a 4 °C.

Solubilización de proteínas de membrana. Se cultivaron células recombinantes de *R. eutropha* H16 como se ha descrito anteriormente en presencia de glucosa al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono. Después de 48 h, las células se recogieron mediante centrifugación durante 15 min a 3.500 x g y a 4 °C, se lavaron una vez con NaCl al 0,9 % (peso/vol) y se resuspendieron en un volumen de tampón Tris/HCl 100 mM (pH 7,0). La alteración celular se realizó mediante un pase en tres veces a través de una celda de prensa francesa previamente enfriada a 1.000 MPa. Los lisados obtenidos se centrifugaron como se ha indicado anteriormente para retirar las células residuales. Se preparó una fracción de membrana mediante centrifugación durante 1 h del sobrenadante a 100.000 x g y a 4 °C, se resuspendió en 2 ml de tampón Tris/HCl 20 mM (pH 7,4) que contenía NaCl 200 mM y TritonX-114 al 2 % (vol/vol) y se incubó durante 12 h en hielo en un agitador rotativo (W3, VWR international GmbH, Darmstadt, Alemania). El lisado se centrifugó durante 20 min a 3.500 x g y a 4 °C. El sobrenadante se incubó durante 5 min a 37 °C y se centrifugó durante 20 min a 3.500 x g y a 37 °C para retirar el TritonX-114 de acuerdo con Bordier (Bordier, 1981). El sobrenadante se diluyó posteriormente con 2 volúmenes del mismo tampón sin TritonX-114 para disminuir la concentración del detergente.

PAGE unidimensional. Las muestras de proteínas se resuspendieron en tampón de carga con gel (0,6 % (peso/vol) SDS; β-mercaptoetanol 1,25 % (vol/vol); EDTA 0,25 mM; glicerol al 10 % (vol/vol); azul de bromofenol al 0,001 % (peso/vol); Tris/HCl 12,5 mM, pH 6,8) y se separaron en geles de poliacrilamida con SDS al 12,5 % (peso/vol) como describe Laemmli (1970). Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Weber y Osborn, 1969). Las muestras de extractos en bruto y de las proteínas de membrana solubilizadas se analizaron mediante este método.

Ensayos de actividad de MAK, PMI y GLK. Fracciones de proteínas solubles de la cepa H16 de *R. eutropha* recombinante se aplicaron para realizar mediciones de actividad de MAK, PMI y GLK a 30 °C utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Nicolet Evolution 100 (Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK). La actividad de MAK se ensayó con un sistema acoplado NADH como describen Sebastian y Asensio (1972) con algunas modificaciones, utilizando piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa como enzimas auxiliares. La mezcla de reacción tamponada (MOPS 100 mM, pH 7,0) contenía MgCl₂ 2 mM, ATP 2 mM, NADH 0,2, manosa 5 mM, PEP 0,2 mM, piruvato quinasa 5 U ml⁻¹, lactato deshidrogenasa 5 U ml⁻¹ y de 5 a 100 µl de extracto soluble. La actividad de PMI se midió con un ensayo acoplado a NADP (Kang y Markovitz 1967) con algunas modificaciones utilizando

fosfoglucoisomerasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como enzimas auxiliares. La mezcla de reacción tamponada (MOPS 100 mM, pH 7,0) contenía MgCl₂ 5 mM, NADP 1 mM, manosa-6-fosfato 3 mM, fosfoglucoisomerasa 1 U ml⁻¹, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1 U ml⁻¹ y de 10 a 100 µl de extracto soluble.

5 La actividad de GLK se midió con un sistema acoplado a NADPH de acuerdo con el método de Gottschalk (Gottschalk *et al.* 1964) con modificaciones con respecto al tampón. La mezcla de tampón (Tris/HCl 100 mM, pH 7,6) contenía MgCl₂ 7 mM, NADP 0,9 mM, D-glucosa 460 mM, ATP 0,7 mM, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa 0,35 U ml⁻¹ y de 10 a 50 µl de preparación enzimática.

10 **Análisis del contenido de PHB de células de *R. eutropha* recombinantes mediante CG.** El material celular liofilizado se sometió a metanólisis en presencia de metanol y ácido sulfúrico (85 %, vol/vol, MeOH y 15 %, vol/vol, H₂SO₄) durante 4 h a 100 °C, y los metilésteres resultantes de los constituyentes de PHA se caracterizaron mediante cromatografía de gases utilizando un CG Agilent 6850 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con una columna capilar BP21 (50 m por 0,22 mm; grosor de la película, 250 nm; SGE, Darmstadt, Alemania) y un detector de ionización de llama (Agilent Technologies). Se analizaron 2 µl de partes de la fase orgánica después de inyección con división (proporción de división, 1:5), y se utilizó un flujo de hidrógeno constante de 0,6 ml min⁻¹ como gas transportador. Las temperaturas del inyector fueron de 250 °C y 220 °C, respectivamente. Se aplicó el siguiente programa de temperatura: 120 °C durante 5 min, aumento de 3 °C min⁻¹ a 180 °C y aumento de 10 °C min⁻¹ a 220 °C y 220 °C durante 31 min. Las sustancias se identificaron por comparación de sus tiempos de retención con los del éster metílico de ácido graso convencional.

El gen *glf* de *Z. mobilis* más los genes *mak* y *pmi* de *E. coli* se introdujeron de manera episomal y se expresaron en *R. eutropha* y se caracterizaron en las cepas recombinantes. Las rutas modificadas por ingeniería genética del catabolismo de glucosa y manosa en la cepa de *R. eutropha* recombinante se representa en la Figura 1.

25 **Construcción de diferentes vectores de expresión pBBR1 para la cepa H16 de *R. eutropha*.** Las regiones codificantes del gen *glf* de *Z. mobilis* (1.449 pb) y de los genes *mak* (936 pb), *pmi* (1.203 pb) y *glk* (966 pb) de *E. coli* se amplificaron mediante PCR a partir de ADN genómico de *Z. mobilis* DSM 424 y de la cepa K-12 de *E. coli*, respectivamente. Los cuatro productos PCR comprenden además de las regiones codificantes también sitios de unión a ribosoma adecuados para *R. eutropha* aguas arriba del codón de inicio respectivo para permitir la expresión en este hospedador. Estos fragmentos se clonaron mediante el vector pJET1.2/romo o pCR2.1 en los vectores de rango de hospedador amplio pBBR1 MCS-2 y pBBR1 MCS-3 bajo el control del promotor de *neokanamicina* o *lac*, respectivamente, lo que permite la expresión constitutiva de los genes clonados en *R. eutropha* H16, produciendo los plásmidos pBBR1MCS-2::P_{nk}::*glf*, pBBR1MCS-2::P_{nk}::*glf*::*glf*, pBBR1MCS-3::*glf*, pBBR1MCS-3::*glf*::*mak*, pBBR1MCS-3::*glf*::*pmi* y pBBR1 MCS-3::*glf*::*mak*::*pmi* (Fig. 2). La construcción exacta de estos plásmidos se confirmó por secuenciación. Adicionalmente, la funcionalidad del gen *pmi* en pBBR1MCS-3::*glf*::*pmi* y pBBR1MCS-3::*glf*::*mak*::*pmi* se confirmó por complementación del mutante de *E. coli* deficiente en *pmi* (*manA*) JE5511 (Hirota *et al.* 1977). Los mutantes *manA* de *E. coli* recombinantes presentaron buen crecimiento en medio M9 sólido que contenía manosa al 0,5 % (peso/vol) como única fuente de carbono después de dos días de incubación a 37 °C. Por otro lado, el vector pBBR1 MCS-3 no confirió crecimiento al mutante *manA*.

45 **Transferencia de plásmidos a la cepa H16 de *R. eutropha* y establecimiento de la utilización de glucosa y manosa.** Ambos plásmidos pBBR1MCS-2::P_{nk}::*glf* y pBBR1MCS-2::P_{nk}::*glk*::*glf* se transfirieron mediante conjugación de *E. coli* S17-1 a la cepa H16 de *R. eutropha*. Se seleccionaron transconjugantes en placas de agar con MSM que contenía gluconato sódico al 1 % (peso/vol) y kanamicina (300 µg/ml), y de ahí se transfirieron a placas con MSM que contenía glucosa al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono. Únicamente las cepas recombinantes que llevaban bien pBBR1 MCS-2::P_{nk}::*glf* o bien pBBR1 MCS-2::P_{nk}::*glk*::*glf* mostraron un crecimiento significativo después de 5 días de incubación.

50 Para investigar si los tres genes eran necesarios para la utilización de manosa, todos los plásmidos construidos y el plásmido pBBR1 MCS-3 se movilaron de la cepa S17-1 de *E. coli* a la cepa H16 de *R. eutropha*. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de agar con MSM que contenía gluconato sódico al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono y tetraciclina (12,5 µg/ml). Después, se transfirieron a placas de agar con MSM que contenía manosa como única fuente de carbono a diversas concentraciones (0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 % [peso/vol]). Únicamente las cepas recombinantes que llevaban pBBR1MCS-3::*glf*::*pmi* o pBBR1MCS-3::*glf*::*mak*::*pmi* mostraron crecimiento significativo en presencia de cualquiera de las concentraciones de manosa que se ensayaron. Mientras que las células que llevaban el plásmido pBBR1MCS-3::*glf*::*mak*::*pmi* presentaron un crecimiento distinto en manosa después de 3-4 días de incubación, las células con pBBR1 MCS-3::*glf*::*pmi* únicamente mostraron crecimiento después de un tiempo de incubación de 5-6 días. En cambio, las cepas recombinantes que llevaban el plásmido pBBR1MCS-3::*glf* o pBBR1 MCS-3::*glf*::*mak*, respectivamente, no mostraron apenas crecimiento incluso después de un periodo de incubación de 30 días. Únicamente después de una exposición previa de las últimas cepas recombinantes en placas con MSM que contenían fructosa en lugar de gluconato, se produjo un pequeño crecimiento después de un tiempo de incubación prolongado.

65 **Control de expresión de *glf*, *glk*, *mak* y *pmi*.** Para confirmar la presencia de ARNm procedente de *glf*, *mak*, y *pmi* se realizaron análisis transcripcionales de las cepas recombinantes. Para ello, las células de las cepas

recombinantes de *R. eutropha* que llevaban pBBR1 MCS-3::glf::mak::pmi o pBBR1 MCS-3 se cultivaron en MSM que contenía gluconato sódico al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono. Dado que P_{lac} es un promotor constitutivo en la cepa H16 de *R. eutropha* (Siedow *et al.* 1999), los tres genes deben expresarse de manera constitutiva sin inducción adicional. Se realizaron análisis transcripcionales mediante RT-PCR de una etapa. El ARN total de las células de una fase de crecimiento logarítmico tardía sirvió para la RT-PCR utilizando los cebadores glf_RT_f, glf_RT_r, mak_RT_f, mak_RT_r, pmi_RT_f y pmi_RT_r específicos para glf, mak y pmi (Tabla 1). Se obtuvieron productos de la PCR del tamaño esperado de 351 pb para glf, mak y pmi, respectivamente y se analizó el ARN aislado de células que llevaban pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi recombinante de la cepa H16. Esto demostró claramente que glf, mak y pmi se transcribían únicamente en células de la cepa recombinante de la cepa H16 de *R. eutropha* que llevaba pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi pero no en el control negativo que llevaba solamente el vector pBBR1 MCS-3. La ausencia de productos de PCR en el control sin ninguna actividad de transcriptasa inversa indicó que el producto de la RT-PCR no procedía de ADN contaminante (Fig. 3).

Para confirmar adicionalmente la transcripción de glk y glf en cepas recombinantes que llevaban el plásmido pBBR1MCS-2::P_{nk}::glk::glf a nivel de proteína, se realizó un análisis mediante SDS-PAGE. Como Glf es una proteína transmembrana (Parker *et al.* 1995) las proteínas de membrana tanto de la cepa H16 de *R. eutropha* que llevan el vector pBBR1 MCS-2 como de la cepa H16 de *R. eutropha* que lleva el plásmido pBBR1MCS-2::P_{nk}::glk::glf se solubilizaron y se separaron por PAGE. El electroferograma mostró una banda proteica distinta con una masa aparente de 50 kDa que representaba Glf, que no estaba en el control. De manera similar, el análisis de la fracción celular soluble mostró una banda proteica distinta a 35 kDa, que representaba Glk (Fig. 4).

La presencia de MAK, PMI y GLK activas funcionales en las cepas recombinantes se confirmó mediante análisis enzimático. Ensayos enzimáticos acoplados que emplean las fracciones proteicas solubles obtenidas de células de la cepa recombinante de H16 que lleva pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi, o pBBR1MCS-2::P_{nk}::glk::glf cultivada en MSM que contenía gluconato sódico al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono, demostraron la presencia de PMI (0,25 U mg⁻¹), de MAK (0,14 U mg⁻¹) y también de GLK (0,52 U mg⁻¹) activas, respectivamente, mientras que estas actividades, excepto la de GLK (0,2 U mg⁻¹) no estaban en las fracciones proteicas solubles del control negativo de la cepa H16 que llevaba los plásmidos pBBR1MCS-2 o pBBR1MCS-3, respectivamente, indicando de este modo la ausencia de PMI y de MAK en la cepa de control negativo.

Investigaciones sobre la utilización de diversas fuentes de carbono por las cepas recombinantes de *R. eutropha* H16. En comparación con las otras cepas recombinantes, la cepa H16 de *R. eutropha* que lleva los plásmidos pBBR1MCS-2::P_{nk}::glk::glf o pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi mostró el crecimiento más rápido en glucosa o manosa de todos los sustratos ensayados, respectivamente, como única fuente de carbono. Por lo tanto, estas cepas se investigaron adicionalmente con respecto a la utilización de diversas otras fuentes de carbono empleando placas de agar con MSM conteniendo cada una de ellas 1 % (peso/vol) de L-arabinosa, D-fructosa, D-galactosa, D-gluconato, D-glucosa, glicerina, maltosa, D-manitol, D-manosa, N-acetil-D-glucosamina, piruvato, D-ribosa, trehalosa, o D-xilosa como única fuente de carbono. El tipo silvestre de *R. eutropha* sirvió como control negativo. En la Tabla 2 se resumen los resultados. Tanto la cepa de tipo silvestre como las cepas recombinantes pudieron crecer en presencia de D-fructosa, D-gluconato, glicerol, N-acetilglucosamina y piruvato (Tabla 2). Las otras fuentes de carbono mencionadas anteriormente no se utilizaron para el crecimiento, excepto la manosa por la cepa recombinante que lleva pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi y glucosa por las cepas recombinantes que llevan pBBR1MCS-2::P_{nk}::glk::glf o pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi (Tabla 2).

Crecimiento de *R. eutropha* recombinante con glucosa como única fuente de carbono. Las cepas recombinantes de la cepa H16 de *R. eutropha* se cultivaron en SMS líquido que contenía glucosa al 1 % (peso/vol). Aunque todas las cepas mostraron crecimiento en glucosa, la cepa recombinante que llevaba pBBR1MCS-2::P_{nk}::glk::glf mostró un crecimiento más rápido ($\mu = 0,32 \text{ h}^{-1}$) en comparación con la cepa recombinante que llevaba pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi ($\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 5). Esto estaba en el mismo orden que la cepa de control positivo G+1 ($\mu = 0,30 \text{ h}^{-1}$). Resulta curioso que, células recombinantes que llevan plásmidos portadores solo del gen glf bajo el control de promotor de neokanamicina o lac, mostraron un crecimiento muy disminuido ($\mu = 0,085$ y $0,073$, respectivamente) cuando se compararon con las células recombinantes que llevaban plásmidos también con los otros genes (Fig. 5).

Crecimiento de *R. eutropha* recombinante con manosa o gluconato como única fuente de carbono. Células recombinantes de la cepa H16 de *R. eutropha* que llevaban el plásmido pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi se cultivaron en MSM líquido que contenía diferentes concentraciones de manosa como única fuente de carbono para evaluar la concentración óptima para un crecimiento máximo. Además, se examinó si los genes introducidos afectaban al crecimiento de la cepa recombinante en combinación con la cepa H16 de tipo silvestre en MSM que contenía gluconato sódico al 0,5 % (peso/vol) como única fuente de carbono. De acuerdo con las expectativas, la cepa recombinante H16 que llevaba pBBR1MCS-3::glf::mak::pmi mostró un crecimiento más rápido en gluconato ($\mu = 0,33 \text{ h}^{-1}$) en comparación con manosa ($\mu = 0,078 \text{ h}^{-1}$). El crecimiento máximo en manosa se produjo con manosa al 1 % (peso/vol), mientras que concentraciones más bajas y más altas de este azúcar produjeron un crecimiento ligeramente más lento (Fig. 6). Con gluconato como única fuente de carbono, el crecimiento de la cepa recombinante disminuyó solo ligeramente en comparación con el del tipo silvestre.

Ejemplo 2

Cepas bacterianas, plásmidos, oligonucleótidos y condiciones de cultivo. Todas las bacterias, plásmidos y cebadores utilizados en este estudio se indican en la Tabla 3 y 4, respectivamente. Se cultivaron células de la cepa H16 de *R. eutropha* en caldo con nutrientes o en medio con sales minerales (MSM) como describen Schlegel *et al.* (1961). Se añadieron fuentes de carbono al MSM líquido como se indica en el texto. Se incubaron cultivos líquidos en matraces Erlenmeyer en un agitador rotativo horizontal a una agitación de 110 rpm. Se prepararon medios sólidos mediante la adición de agar-agar al 1,5 % (peso/vol). Se cultivaron células de *Escherichia coli* a 37 °C en caldo de lisogenia (CL, [Sambrook *et al.* 1989]) o en medio con sales minerales M9 (Sambrook *et al.* 1989) con D-xilosa como única fuente de carbono. Se aplicaron antibióticos de acuerdo con Sambrook *et al.* (1989) como se indica en el texto

Aislamiento, análisis y modificación de ADN. Se preparó ADN plasmídico de lisados en bruto mediante el método de extracción alcalina (Birboim y Doly 1979). Se preparó ADN total de la cepa K-12 de *E. coli* utilizando el kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN se restringió mediante endonucleasas de restricción (Gibco/BRL, Gaithersburg, USA) en las condiciones recomendadas por el fabricante. El resto de los procedimientos genéticos y de las manipulaciones genéticas se realizaron como describen Sambrook *et al.* (1989).

Tabla 3. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este estudio

Cepa, plásmido o cebador	Características relevantes	Fuente de referencia
Cepas		
<i>E. coli</i> K-12	<i>Tipo silvestre</i>	DSM 426
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)f80lacZ$ $\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galk</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA1</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K -, m _K +), <i>proA</i> , transgenes del plásmido RP4 cromosómicamente integrado (cepa de movilización)	Simon <i>et al.</i> 1983
<i>E. coli</i> HB101	<i>hsdS</i> , <i>recA</i> , <i>proA</i> , <i>lacy</i> , <i>galK</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center (Hirota <i>et al.</i> 1977)
<i>E. coli</i> JW1255	<i>xy191pR</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center (Hirota <i>et al.</i> 1977)
<i>E. coli</i> LR2-168	<i>thi</i> , <i>arg</i> , <i>met</i> , <i>his</i> , <i>gal</i> , <i>xyl-7</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center (Hirota <i>et al.</i> 1977)
Cepa H16 de <i>R. eutropha</i>	<i>Tipo silvestre</i>	DSM 428
Plásmidos		
pJET1.2/romo	Ap ^r	Fermentas
pJET1.2::xylA	con <i>xylA</i> como producto PCR de extremo romo	en los ejemplos
pJET1.2::xylB	con <i>xylB</i> como producto PCR de extremo romo	en los ejemplos
pJET1.2::xylE	con <i>xylE</i> como producto RCR de extremo romo	en los ejemplos
pBBR1MCS-3	Tc ^r , <i>LacZ-α</i> , <i>mob</i> , <i>rep</i>	Kovach <i>et al.</i> 1995
pBBR1MCS-3::xylFGH	con <i>xylFGH</i> como fragmento <i>SpeI/SacII</i>	en los ejemplos
pBBR1MCS-3::xylAB	con <i>xylAB</i> como fragmento <i>Apal/SpeI</i>	en los ejemplos
pBBR1MCS-3::xylABE	con <i>xylABE</i> como fragmento <i>Apal/SacII</i>	en los ejemplos
pBBR1MCS-3::xylABFGH	con <i>xylABE</i> como fragmento <i>Apal/SacII</i>	en los ejemplos

Tabla 4. PCR y cebadores de secuenciación UTILIZADOS en este estudio

Oligonucleótidos	Secuencia (5'→3')	Función
<i>P_xylA_Apal_f</i>	ATT <u>AGG GCC CAA</u> GGA GGT TAC AGC ATG CAA GCC TAT TTT GAC CAG (SEQ ID NO: 82)	cebador 5' para la amplificación de la región codificante de <i>xylA</i> . El cebador contiene el sitio de restricción para <i>Apal</i> (subrayado).
<i>P_xylA_SmaI_r</i>	ATT <u>GCC CGG GTT</u> ATT TGT CGA ACA GAT AAT G (SEQ ID NO: 83)	cebador 3' para la amplificación de la región codificante de <i>xylA</i> . El cebador contiene el sitio de restricción para <i>SmaI</i> (subrayado).
<i>P_xylB_SmaI_f</i>	ATT <u>GCC CGG GAA</u> GGA GGT TAC AGC ATG TAT ATC GGG ATA GAT CTT (SEQ ID NO: 84)	cebador 5' para la amplificación de la región codificante de <i>xylB</i> . El cebador contiene el sitio de restricción para <i>SmaI</i> (subrayado).
<i>P_xylB_SpeI_r</i>	CCC <u>GAC TAG TTT</u> ACG CCA TTA ATG GCA GAA G (SEQ ID NO: 85)	cebador 3' para la amplificación de la región codificante de <i>xylB</i> . El cebador contiene el sitio de restricción para <i>SpeI</i> (subrayado).
<i>P_xylE_SpeI_f</i>	CCC <u>GAC TAG TAA</u> GGA GGT TAC AGC ATG AAT ACC CAG TAT AAT TC (SEQ ID NO: 86)	cebador 5' para la amplificación de la región codificante de <i>xylE</i> . El cebador contiene el sitio de restricción para <i>SpeI</i> (subrayado).
<i>P_xylE_SacII_r</i>	ATT <u>GCC GCG GTT</u> ACA GCG TAG CAG TTT GTT G (SEQ ID NO: 87)	cebador 3' para la amplificación de la región codificante de <i>xylE</i> . El cebador contiene el sitio de restricción para <i>SacII</i> (subrayado).
<i>P_xylFGH_SpeI_f</i>	CCC <u>GAC TAG TAA</u> GGA GGC TAC AGC ATG AAA ATA AAG AAC ATT CTA C (SEQ ID NO: 88)	cebador 5' para la amplificación de la región codificante de <i>xylFGH</i> : El cebador contiene el sitio de restricción para <i>SpeI</i> (subrayado).
<i>P-xy/FGH_SacII_r</i>	ATT <u>GCC GCG GTC</u> AAG AAC GGC GTT TGG TTG (SEQ ID NO: 89)	3'- cebador para la amplificación de la región codificante de <i>xy/FGH</i> . El cebador contiene el sitio de restricción para <i>SacII</i> (subrayado).
	AAAACCGCGGCGGCTCGGA AGTCG (SEQ ID NO: 90)	5'-cebador para la amplificación de la región del promotor <i>P_{GAPDH}</i> : El cebador contiene el sitio de restricción para <i>SacII</i> (subrayado).
pJET1.2 directo	CGACTCACTATAGGGAGAG CGGC (SEQ ID NO: 91)	Fermentas (cebador de secuenciación, 23 meros)
pJET1.2 inverso	AAG AACAT CGATTTT CCAT G GCAG (SEQ ID NO: 92)	Fermentas (cebador de secuenciación, 24 meros)
M13/pUC- directo	GTAAAACGACGGCCAGT (SEQ ID NO: 93)	Jena Bioscience (17 meros)

Construcciones de plásmidos y su transferencia en la cepa H16 de *R. eutropha*. Para la amplificación de las regiones codificantes de *xylA*, *xylB*, *xyle*, *xylFGH*, *talB* y *tktA* de la cepa K12 de *E. coli* por PCR, se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla 4. Los oligonucleótidos *P_xylA_Apal_f* y *P_xylA_SmaI_r* se utilizaron para la amplificación de *xylA*, *P_xylB_SmaI_f* y *P_xylB_SpeI_r* para *xylB*, *P_xylE_SpeI_f* y *P_xylE_SacII_r* para *xylE*, y *P_xylFGH_SpeI_f* y *P-xy/FGH_SacII_r* para *xy/FGH*, respectivamente. Los cebadores contenían un sitio de unión al ribosoma para permitir la traducción de ARN en la bacteria *R. eutropha* H16 diana. Se utilizó ADN polimerasa KOD Hot Start (Merck, Darmstadt, Alemania) para la amplificación por PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de la PCR se ligaron con el vector de clonación pJET1.2/romo (Fermentas, Alemania)

utilizando ADN ligasa de T4 (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) o con el plásmido pBBR1 MCS-3 (Kovach *et al.* 1995), y se transfirieron al interior de la cepa TOP10 de *E. coli*. Los plásmidos se aislaron a partir de clones resistentes a ampicilina o tetraciclina, respectivamente, y los fragmentos clonados se escindieron por restricción con las enzimas de restricción adecuadas respectivas para clonación adicional, se extrajeron del gel después de la separación utilizando el kit de extracción en gel E.Z.N.A (Omega Biotec, Bangalore, India). Para los experimentos de expresión en la cepa H16 de *R. eutropha*, se utilizó el vector con rango de hospedador amplio pBBR1MCS-3 para la clonación de *xylA*, *xylB*, *xylE*, y *xylFGH*. El vector pBBR1 MCS-3 confirió resistencia a tetraciclina para la selección en *E. coli* y en la cepa H16 de *R. eutropha*. Las regiones codificantes de *xylA* o *xylB* se escindieron por restricción con *Apal* y *SmaI* o *SmaI* y *SpeI*, respectivamente, se ligaron al plásmido pBBR1 MCS-3 linealizado con *Apal* y *SpeI*, produciendo los plásmidos pBBR1MCS-3::*xylAB* (Fig.8). Para obtener los plásmidos pBBR1MCS-3::*xylABE* y pBBR1MCS-3::*xylABFGH*, las regiones codificantes de *xylE* y *xylFGH* se escindieron por restricción con *SpeI* y *SacII*, respectivamente, y se ligaron al plásmido pBBR1MCS-3::*xylAB* linealizado con *SpeI* y *SacII* produciendo los plásmidos pBBR1MCS-3::*xylABE* y pBBR1MCS-3::*xylABFGH*, respectivamente (Fig. 8). Todos los plásmidos se transfirieron a la cepa S17-1 de *E. coli* por transformación (Hanahan 1983).

Transferencia de ADN por conjugación. La transferencia de los plásmidos pBBR1MCS-3, pBBR1MCS-3::*xylABE*, pBBR1MCS-3::*xylABFGH* (Tabla 3) se realizó por conjugación aplicando un protocolo previamente descrito (Friedrich *et al.* 1981) utilizando la cepa S17-1 de *E. coli* como donante y la cepa H16 de *R. eutropha* como receptora.

Análisis de secuencia de ADN. El ADN se secuenció en un sistema de electroforesis con el analizador de ADN 48-capillary 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para la secuenciación de insertos en el vector de clonación pJET1.2/romo (Fermentas, Alemania) se utilizó el cebador de secuenciación directo pJET1.2, de 23 meros y el cebador de secuenciación inverso, pJET1.2, de 24 meros. Para la secuenciación de los insertos en los plásmidos pBBR1 MCS-2 y pBBR1 MCS-3 se utilizaron los cebadores directo M13/pUC e inverso M13/pUC universales (Kovach *et al.* 1995).

Preparación de fracciones de proteínas solubles de la cepa H16 de *R. eutropha*. Células de cepas recombinantes de la cepa H16 de *R. eutropha* se cultivaron en medio de caldo con nutrientes. Las células se recogieron por centrifugación durante 15 min a 4 °C y a 3.500 x g, se lavaron con tampón Tris/HCl 50 mM (pH 7,5) y se resuspendieron en dos volúmenes del mismo tampón. La alteración se realizó por ultrasonido empleando un Sonifer 250 (Branson Sonic Power Company) con una amplitud de 16 µm (1 min/ml; control de salida 50 %). Durante el ultrasonido las muestras se enfriaron con una mezcla de NaCl-hielo. Se prepararon fracciones de proteínas sin membrana solubles por ultracentrifugación durante 60 minutos de extractos en bruto a 100.000 x g y a 4 °C.

Ensayos de actividad de XylA y XylB. Se aplicaron fracciones de proteínas solubles de la cepa H16 de *R. eutropha* recombinante para mediciones de actividad de XylA y XylB a 30 °C utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Nicolet Evolution 100 (Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK). La actividad de XylA (Gao *et al.* 2002, Mejnen *et al.* 2008) o XylB (Shamanna y Sangerson 1979, Eliasson *et al.* 2000) se ensayó con un sistema de acoplado a NADH con algunas modificaciones, utilizando sorbitol deshidrogenasa o piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa, respectivamente, como enzimas auxiliares. La mezcla de reacción tamponada (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5) para la medición de actividad de XylA contenía MgSO₄ 10 mM, trietanolamina 1 mM, NADH 0,2 mM, D-xilosa 50 mM, sorbitol deshidrogenasa 0,5 U ml⁻¹, y de 5 a 100 µl de extracto soluble. La mezcla de reacción tamponada (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5) para la medición de la actividad de XylB contenía MgCl₂ 2 mM, ATP 2 mM, NADH 0,2 mM, xilulosa 10 mM, PEP 0,2 mM, piruvato quinasa 10 U ml⁻¹, lactato deshidrogenasa 10 U ml⁻¹ y de 5 a 100 µl de extracto soluble.

Utilización de D-xilosa en *R. eutropha*. Después de la captación de D-xilosa por la célula, el gen *xyI-A* codifica la enzima D-xilosa isomerasa (XylI o XylA; EC 5.3.1.5) que cataliza la conversión reversible de aldosa D-xilosa en su forma ceto D-xilulosa. Posteriormente, la D-xilulosa se fosforila a D-xilulosa-5-fosfato, utilizando ATP como fuente de energía y fosfato. Esta etapa se cataliza mediante una xilulosa quinasa (XylK o XylB; EC 2.7.1.17). La D-xilulosa-5-fosfato puede utilizarse adicionalmente como un producto intermedio de la ruta de la pentosa fosfato no oxidativa. Como la cepa K12 de *E. coli* es uno de los organismos más ampliamente estudiados que utilizan D-xilosa, los genes *xylA*, que codifica xilosa-isomerasa, *xylB* que codifica xiluloquinasa, *xylE* que codifica el transportador de baja afinidad y *xylFGH* que codifica el transportador ABC se amplificaron utilizando ADN genómico de la cepa K12 de *E. coli*, se introdujeron de manera episomal y se expresaron en *R. eutropha* H16. En la Figura 7 se representa la ruta del catabolismo de xilosa genéticamente modificada en la cepa de *R. eutropha* recombinante.

Construcción de diferentes vectores de expresión pBBR1 para la cepa H16 de *R. eutropha*. Las regiones codificantes de los genes *xylA* (1,323 pb), *xylB* (1,455 pb), *xylE* (1,476 pb) y *xylFGH* (3,771 pb) se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de la cepa K12 de *E. coli*. Los tres productos de la PCR comprendían además de las regiones codificantes, también sitios de unión a ribosoma adecuados para *R. eutropha* aguas arriba del codón de inicio respectivo para permitir la expresión en este hospedador. Estos fragmentos se clonaron mediante el vector pJET 1.2/romo en el vector con rango de hospedador amplio pBBR1 MCS-3 bajo el control del promotor *lac*, que permite la expresión constitutiva de los genes clonados en *R. eutropha* H16 (Siedow *et al.* 1999), produciendo los plásmidos pBBR1MCS-3::*xylAB*, pBBR1MCS-3::*xylABE* y pBBR1MCS-3::*xylABFGH* (Fig. 8). La construcción exacta

de estos plásmidos se confirmó por secuenciación. Adicionalmente, la funcionalidad de los genes *xylA* o *xylB* en pBBR1MCS-3::*xylAB*, pBBR1 MCS-3::*xylABE* y pBBR1MCS-3::*xylABFGH* se confirmó por complementación del mutante HB101 de *E. coli* deficiente en *xylA*, el mutante JWL255 de *E. coli* deficiente en *xylB*, o el mutante LR2-168 de *E. coli* deficiente en *xylAB*, respectivamente (Hirota *et al.* 1977). Los mutantes de *E. coli* recombinantes HB101, JWL255 o LR2-168 que llevaban pBBR1MCS-3::*xylAB*, pBBR1MCS-3::*xylABE* o pBBR1MCS-3::*xylABFGH*, respectivamente, mostraron buen crecimiento en medio M9 sólido que contenía xilosa al 0.5 % (peso/vol) como única fuente de carbono después de dos días de incubación a 37 °C. En cambio, el vector pBBR1 MCS-3 no confirió crecimiento a los mutantes HB101, JWL255 o LR2-168, respectivamente.

Transferencia de plásmidos a la cepa H16 de *R. eutropha* y establecimiento de la utilización de D-xilosa. Los plásmidos pBBR1MCS-3::*xylAB*, pBBR1MCS-3::*xylABE* y pBBR1MCS-3::*xylABFGH* se transfirieron mediante conjugación de *E. coli* S17-1 a la cepa H16 de *R. eutropha*. Se seleccionaron transconjugantes en placas de agar con MSM que contenía gluconato sódico al 1 % (peso/vol) y tetraciclina (12,5 µg/ml), y posteriormente se transfirieron a placas con MSM que contenía D-xilosa al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono. Las cepas recombinantes que llevaban los plásmidos pBBR1MCS-3::*xylABFGH* presentaron crecimiento pobre después de 5 días de incubación.

Optimización evolutiva del plásmido pBBR1MCS-3::*xylABFGH* que lleva la cepa H16 de *R. eutropha*. Aunque el plásmido recombinante pBBR1 MCS-3::*xylABFGH* que lleva cepa 16 de *R. eutropha* se modificó genéticamente para la utilización de D-xilosa, esta cepa mostró solo un crecimiento pobre después de 5 días de incubación. Una sola colonia de esta cepa recombinante se cultivó en MSM líquido que contenía D-xilosa al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono durante 2 días a 30 °C. Se transfirieron diluciones en MSM sólido que contenía D-xilosa al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono y se incubó a 30 °C. Una sola colonia que mostró un crecimiento más rápido se cultivó de nuevo en MSM líquido que contenía D-xilosa al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono, y una dilución se transfirió de nuevo a MSM sólido que contenía D-xilosa al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono. Después de repetir este procedimiento varias veces, se obtuvo un plásmido recombinante pBBR1MCS-3::*xylABFGH* que llevaba la cepa H16 de *R. eutropha* que presentaba comparablemente buen crecimiento en MSM sólido que contenía D-xilosa al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono después de 2 días de incubación.

Investigaciones sobre la utilización de diversas fuentes de carbono por la cepa H16 de *R. eutropha* que lleva el plásmido recombinante pBBR1MCS-3::*xylABFGH* y de la cepa respectiva optimizada. Las células de la cepa recombinante de H16 que lleva pBBR1 MCS-3::*xylABFGH* y de la cepa recombinante optimizada respectiva de H16, de la cepa G+1 de *R. eutropha*, un mutante que utiliza glucosa de la cepa H-16 de *R. eutropha* (Schlegel y Gottschalk 1965), y de la cepa H16 de *R. eutropha* se cultivaron en Placas de agar con MSM sólido que contenía diferentes fuentes de carbono (L-arabinosa, D- fructosa, D-galactosa, D-gluconato, D-glucosa, D-maltosa, D-manosa, N-acetilglucosamina, D-ribosa, D-trehalosa, D-xilosa al 1 % [peso/vol]) para comparar el crecimiento de las cepas en diferentes fuentes de carbono. El tipo silvestre de *R. eutropha* H16 sirvió como control negativo. Todas las cepas pudieron utilizar D-fructosa, D-gluconato, y N-acetilglucosamina como única fuente de carbono. El plásmido pBBR1 MCS-3::*xylABFGH* que contenía la cepa H16 de *R. eutropha* también pudo utilizar glucosa como única fuente de carbono mostrando un crecimiento similar al de la cepa G+1 de *R. eutropha* H16. El plásmido pBBR1 MCS-3::*xylABFGH* que contenía la cepa también pudo utilizar D-xilosa, L-arabinosa y D-galactosa como única fuente de carbono.

Crecimiento de la cepa de *R. eutropha* H16 que lleva el plásmido pBBR1MCS-3::*xylABFGH* recombinante con glucosa, gluconato o xilosa como única fuente de carbono. Las células de la cepa de *R. eutropha* H16 que llevan del plásmido recombinante pBBR1MCS-3::*xylABFGH* se cultivaron en MSM líquido que contenía diferentes concentraciones (0,5 %, 1 %, 2 %, y 4 % [peso/vol]) de D-xilosa, D-glucosa al 1 % (peso/vol) y gluconato sódico al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono. Además, la cepa H16 de *R. eutropha* de tipo silvestre se cultivó con gluconato sódico al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono para comparar la tasa de crecimiento. La cepa recombinante mostró un crecimiento similar en gluconato sódico al 1 % (peso/vol) ($\mu = 0,47 \text{ h}^{-1}$) y también en glucosa al 1 % (peso/vol) ($\mu = 0,55 \text{ h}^{-1}$) como única fuente de carbono en comparación con la cepa de tipo silvestre en gluconato sódico al 1 % (peso/vol) ($\mu = 0,47 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 9). Después de casi 22 h, se alcanzó la fase de crecimiento estacionario. El crecimiento de la cepa recombinante en D-xilosa como única fuente de carbono fue más lento. Después de casi 40 h, se alcanzó la fase de crecimiento estacionario para los cultivos que contenían del 0,5 % (peso/vol) ($\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$) al 2 % (peso/vol) ($\mu = 0,18 \text{ h}^{-1}$) de D-xilosa como única fuente de carbono. El cultivo que contenía 4 % (peso/vol) de D-xilosa como única fuente de carbono alcanzó la fase de crecimiento estacionario después de casi 50 h ($\mu = 0,17 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 9).

Control de expresión de *xylA* y *xylB* en la cepa H16 de *R. eutropha* que contiene el plásmido recombinante pBBR1MCS-3::*xylABFGH*. La presencia de XylA y XylB activa funcional en la cepa recombinante se confirmó mediante análisis enzimático. Ensayos enzimáticos acoplados que empleaban fracciones de proteínas solubles obtenidas de células de la cepa recombinante de H16 que llevaba pBBR1MCS-3::*xylABFGH* cultivadas en MSM que contenía xilosa al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono demostraron la presencia de XylA ($0,035 \text{ U mg}^{-1}$) y XylB ($0,364 \text{ U mg}^{-1}$) activa, respectivamente, mientras que estas actividades no estaban en las fracciones proteicas solubles del control negativo de la cepa H16 que llevaba el plásmido pBBR1MCS-3, indicando de este modo la ausencia de XylA y XylB en la cepa de control negativa.

Análisis de contenido de PHB de células de *R. eutropha* recombinantes mediante GC El material celular liofilizado se sometió a metanólisis en presencia de metanol y ácido sulfúrico (85 %, vol/vol, MeOH y 15 %, vol/vol, H₂SO₄) durante 4 h a 100 °C, y los metilésteres resultantes de los constituyentes de PHA se caracterizaron mediante cromatografía de gases utilizando un CG Agilent 6850 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con una columna capilar BP21 (50 m por 0,22 mm; grosor de la película, 250 nm; SGE, Darmstadt, Alemania) y un detector de ionización a la llama (Agilent Technologies). Se analizó una parte de la fase orgánica de 2 µl después de inyección con división (proporción de división, 1:5), y se utilizó un flujo de hidrógeno constante de 0,6 ml min⁻¹ como gas transportador. Las temperaturas del inyector fueron de 250 °C y 220 °C, respectivamente. Se aplicó el siguiente programa de temperatura: 120 °C durante 5 min, aumento de 3 °C min⁻¹ a 180 °C y aumento de 10 °C min⁻¹ a 220 °C y 220 °C durante 31 min. Las sustancias se identificaron por comparación de sus tiempos de retención con los del éster metílico de ácido graso convencional.

Construcción de diferentes vectores adecuados para la expresión de transcetolasas (Tkt) y transaldolasas (TalB) en cepas de los géneros *Ralstonia* y *Cupriavidus*. Las regiones codificantes de los genes que codifican una proteína homóloga a transcetolasa (Tkt) y transaldolasa (TalB) se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de la cepa hospedadora respectiva. Los productos de la PCR pueden comprender, además de las regiones codificantes también sitios de rescisión adecuados para la clonación, elementos reguladores adecuados tales como, por ejemplo, una secuencia promotora y sitios de unión a ribosoma para cepas de los géneros *Ralstonia* y *Cupriavidus* aguas arriba del codón de inicio respectivo para permitir la expresión en este hospedador. Estas características pueden proporcionarse mediante oligonucleótidos sintéticos o por PCR de fusión. Estos fragmentos pueden clonarse mediante vectores de clonación en vectores adecuados para la expresión en cepas de los géneros *Ralstonia* y *Cupriavidus* bajo el control de un promotor adecuado, que permita la expresión de los genes clonados en la cepa hospedadora respectiva. Las regiones codificantes de genes que codifican una proteína homóloga a transcetolasa (Tkt) y transaldolasa (TalB) pueden clonarse por separado o en combinación con diferentes genes, por ejemplo *xylA*, *xylB*, *xylC*, y *xylFGH*. La construcción exacta de estos plásmidos puede confirmarse por secuenciación. Los plásmidos construidos pueden transferirse mediante conjugación de *E. coli* S17-1 o por electroporación a cepas de los géneros *Ralstonia* y *Cupriavidus*. Los transconjugantes o transformantes, respectivamente, pueden seleccionarse en placas de agar con MSM que contienen gluconato sódico al 1 % (peso/vol) y una selección adecuada para la estabilidad del plásmido. Las cepas recombinantes de los géneros *Ralstonia* y *Cupriavidus* pueden caracterizarse con respecto a su crecimiento en diferentes fuentes de carbono.

Ejemplo 3

Cepas bacterianas, plásmidos, oligonucleótidos y condiciones de cultivo. Todas las bacterias, plásmidos y cebadores utilizados en esta solicitud se indican en la Tabla 5. Se cultivaron células de *E. coli* en caldo de lisogenia (CL) [Sambrook *et al.* 1989] o en medio con sales minerales (MSM) complementado con glucosa al 1 % (p/v) de acuerdo con Schlegel *et al.* (1961). Para la síntesis de ésteres etílicos de ácidos grasos (EEAG), se cultivaron células de *R. eutropha* en caldo con nutrientes (CN) (Sambrook *et al.*, 1989) o en MSM complementado con gluconato sódico al 1 % (p/v) y oleato sódico (0,4 %, p/v). Los cultivos líquidos se incubaron en matraces Erlenmeyer con deflectores, en un agitador rotativo horizontal a una agitación de 110 rpm a 37 °C (*E. coli*) o a 30 °C (cepas de *R. eutropha*). Se aplicaron antibióticos de acuerdo con Sambrook *et al.* (1989) y como se indica en el texto.

Tabla 5. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Cepa, plásmido o cebador	Características relevantes	Fuentes de referencia
Cepas		
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F-mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ <i>f80lacZ</i> $\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA1</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>proA</i> , transgenes del plásmido RP4 cromosómicamente integrado (cepa de movilización)	Simon <i>et al.</i> 1983
<i>R. eutropha</i> $\Delta phaC1$	Mutante de <i>R. eutropha</i> H16 negativo a PHB	Peplinski <i>et al.</i> , 2010
Plásmidos		
pBBR1 MCS-3	Tc ^R , <i>lacZ</i> α , <i>mob</i> , <i>rep</i>	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pMicrodiesel	Amp ^R , <i>atfA</i> , <i>adhB</i> , <i>pdC</i>	Kalscheuer <i>et al.</i> , 2006
pBBR1 MCS-3:: <i>atfA/pdc/adhB</i>	con <i>atfA/pdc/adhB</i> como fragmento <i>XbaI</i> / <i>ApaI</i>	En este ejemplo

Oligonucleótidos

M13 dir 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' (SEQ ID NO: 94)

M13 inv 5' AACAGCTATGACCATG 3' (SEQ ID NO: 95)

Aislamiento, análisis y modificación de ADN. El ADN plasmídico de las cepas de *R. eutropha* se preparó a partir de lisados en bruto mediante el método de extracción alcalina (Birnboim y Doly, 1979). El ADN plasmídico de *E. coli* se preparó con un kit comercial de preparación de plásmidos (Kit Roti Prep Plasmid, Roth, Karlsruhe) aplicando las condiciones recomendadas por el fabricante. El ADN se restringió con endonucleasas de restricción (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) en las condiciones recomendadas por el fabricante. El resto de los procedimientos genéticos y de las manipulaciones genéticas se realizaron como describen Sambrook *et al.* (1989).

Transferencia de ADN por conjugación. La transferencia de los plásmidos pBBR1MCS-3 y pBBR1MCS-3::*atfA/pdc/adhB* se realizó por conjugación aplicando el protocolo descrito por Friedrich *et al.* (1981). Como cepa donante se utilizó *E. coli* S17-1 y como receptora la cepa Δ *phaC1* de *R. eutropha*.

Preparación de fracciones de proteínas solubles de cepas de *R. eutropha* y *E. coli*. Las células de cepas recombinantes de *R. eutropha* o *E. coli* se cultivaron como se ha descrito anteriormente en presencia de gluconato sódico al 1 % (p/v) o glucosa al 1 % (p/v), respectivamente. Las células se recogieron a los 15 min de centrifugación a 4 °C y a 3500 x g, se lavaron en un tampón adecuado como se describe más adelante y se resuspendieron en dos volúmenes del mismo tampón. Las células se alteraron por ultrasonido empleando una sonda MS72 y un ultrasonido Sonoplus GM200 (Bandelin, Berlín) con una amplitud de 10 μ m (2 min/ml; control de salida del 50 %). Durante el ultrasonido las muestras se enfriaron con hielo. Las concentraciones de proteínas en los extractos celulares en bruto se determinaron como describe Bradford (1976).

Análisis de secuencia de ADN. El ADN se secuenció en un sistema de electroforesis analizador de ADN 48-capillary 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para la secuenciación de insertos en el plásmido pBBR1 MCS-3 (Kovach *et al.* 1995) se utilizaron los cebadores universales "M13 inv" y "M13 dir"

Construcción de los plásmidos utilizados. Como vector de expresión en *R. eutropha* H16 se seleccionó el vector pBBR1 MCS-3 que permite una expresión estable de los genes contenidos en *R. eutropha*. Los genes necesarios para la síntesis de EEAG se cortaron del plásmido pMicrodiesel (Kalscheuer *et al.*, 2006) por restricción con *Xba*I y *Apa*I dando como resultado un fragmento de 4,8 kbp que contenía los genes *atfA*, *pdc* y *adhB*. Este fragmento se ligó con el plásmido pBBR1 MCS-3 por restricción con *Xba*I y *Apa*I utilizando ADN ligasa de T4 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) dando como resultado el plásmido pBBR1MCS-3::*atfA/pdc/adhB* de 9,9 kbp. El plásmido construido se transfirió por transformación (Hanahan 1983) a *E. coli* Top10 para su verificación y finalmente a la cepa S17-1 de *E. coli* sirviendo como donante para los experimentos de conjugación.

Ensayos de actividad de WS/DGAT, PDC y ADHB. Las fracciones de proteínas solubles de las cepas recombinantes de *R. eutropha* se aplicaron para mediciones de actividad de WS/DGAT, PDC y ADHB a 30 °C utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Nicolet Evolution 100 (Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK). La actividad de PDC se ensayó con un sistema acoplado a NADH utilizando ADH como una enzima auxiliar que mide la producción de NAD⁺ mediante la disminución de la absorción a 340 nm. La mezcla de reacción tamponada (tampón de fosfato potásico (KP) 50 mM, pH 6,5) que contenía MgSO₄ 5 mM, pirofosfato de tiamina (TPP) 0,1 mM, NADH 0,175 mM, piruvato 17,5 mM, ADH 0,1 U/ml y solución de proteínas 100 μ g/ml del extracto soluble.

La actividad ADH se midió directamente a través de la disminución de NADH debido a la reducción de aldehído acético. Se utilizó la misma mezcla de reacción que para el ensayo de actividad PDC, sin embargo el piruvato se reemplazó por aldehído acético 0,1 mM y el ADH se reemplazó por tampón KP.

La actividad WS/DGAT se midió radiométricamente mediante la síntesis de ésteres cerosos marcados a partir de hexadecanol o etanol y 1-¹⁴C-palmitoil coenzima A. La mezcla de reacción tamponada (tampón fosfato sódico 125 mM, pH 7,4) contenía hexadecanol o etanol 3,75 mM, albúmina de suero bovino (BSA) 12,5 μ g/ml, 1-¹⁴C-palmitoil CoA 4,72 μ M y extracto bruto de proteína 200 μ g/ml. Antes de utilizar una emulsión doble concentrada de hexadecanol, se preparó BSA y tampón fosfato sódico por ultrasonido (1 min/ml). La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a 35 °C y la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen de cloroformo-metanol (1:1; v/v). Después de someter intensamente a agitación vorticial durante 1 min., las fases se separaron por centrifugación durante 2 min a 16.000 x g. la fase orgánica se retiró y se aplicó a una placa de cromatografía de capa fina (TLC, *thin layer chromatography*) (gel de sílice 60, láminas de aluminio de 20x20 cm, Merck KGaA, Darmstadt) que después se reveló con hexano: dietil éter: ácido acético (90:7.5:1; (v/v/v) como disolvente. Las manchas de éster ceroso marcadas con radioactividad se visualizaron con un generador de imágenes PharosFX Phospho-Imager (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich) después de exponer la placa de TLC revelada a una pantalla de fósforo. Como sustancias patrón para la TLC se utilizaron oleil oleato o etil oleato que se visualizaron con tinción con vapor de yodo.

Determinación cuantitativa y cualitativa de etanol sintetizado y EEAG. Las cantidades de etanol en medios de cultivo acelulares se determinaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El análisis con HPLC de muestras de 20 µl se llevó a cabo con una HPLC LaChrom Elite (VWR-Hitachi International GmbH, Darmstadt) dotada con una columna C Metacarb 67H advanced (longitud: 300 mm; diámetro interno 6,5 mm; Varian, Palo Alto, USA) y un detector de índice refractivo (IR) de tipo 2490 (VWR-Hitachi International GmbH, Darmstadt).

Los EEAG en células liofilizadas se analizaron mediante TLC, cromatografía de gases (CG) y espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (CG/EM). Para el análisis TLC cualitativo, 100 mg de materia seca celular se mezclaron con cloroformo: metanol 1 ml (2:1; v/v) y se degradaron con un molino de perlas de tipo MM301 (Retsch, Haan). Después de la centrifugación durante 10 min a 16000 x g el sobrenadante orgánico se separó mediante TLC como se ha descrito para los ensayos de actividad WS/DGAT. El etil oleato sirvió como una sustancia patrón. Las manchas se visualizaron mediante tinción con vapor de yodo y las manchas de interés se separaron de la placa de TLC, se eluyeron con cloroformo: metanol (2:1, v/v) y se analizaron mediante CG o CG/EM. Los análisis de GC de extractos celulares 10-100 mg se realizaron con un cromatógrafo de gases capilar Agilent 6850 (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn) dotado de una columna capilar BP21 (longitud: 50 m; diámetro interno: 0,22 mm; grosor de la película 250 nm; SGE GmbH, Darmstadt) y de un detector de ionización de llama (FID, *Flame Ionisation Detector*). Se inyectaron 2 µl de muestra a una proporción de división de 1:152 con un automuesteador Agilent de la serie 6850 (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn). Como gas transportador se utilizó H₂ (99,999 %) a un caudal de 0,6 ml/min. Las temperaturas de entrada y las del detector fueron de 250 °C y 275 °C, respectivamente, la temperatura de la columna se mantuvo a 120 °C durante 5 min, seguido de un aumento de 3 °C/min a 180 °C, un segundo aumento de 10 °C/min a 220 °C y finalmente se mantuvo a 220 °C durante 31 min.

Los análisis CG/EM se realizaron en un sistema de CG Serie 6890 (Hewlett Packard, Waldbronn) dotado con una columna capilar BPX35 (longitud: 50 m; diámetro interno: 0,25 mm; grosor de la película 250 nm; SGE GmbH, Darmstadt). El CG se acopló con un detector selectivo de masa de ionización de electrones de la serie 5973 (EI-MSD) (Hewlett Packard, Waldbronn). El helio (99,999 %) sirvió como gas transportador con un caudal constante de 0,6 ml/min. 3 µl de la muestra se inyectaron con un autoinyector serie 7683 (Hewlett Packard, Waldbronn) con una proporción de división de 1:20. La temperatura de entrada fue de 250 °C, la de salida fue de 240 °C. Se aplicó el siguiente programa de temperatura: 5 min a 120 °C, aumento de 3 °C/min a 180 °C, seguido de un aumento de 5 °C/min a 210 °C y finalmente la temperatura se mantuvo durante 29 min a 210 °C. Los datos se analizaron con el programa de búsqueda espectral de masas NIST (Stein *et al.*, 1998).

Transferencia de plásmidos a *R. eutropha* Δ phaC1 y determinación de las actividades enzimáticas. Los dos plásmidos, pBBR1 MCS-3 como vector de control y pBBR1 MCS-3::atfA/pdc/adhB, se transfirieron por conjugación de *E. coli* S17-1 a *R. eutropha* Δ phaC1 dando como resultado las cepas de *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3 y *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3::atfA/pdc/adhB. Los transconjugantes pudieron seleccionarse en placas de agar con MSM que contenía gluconato sódico al 1 % (peso/vol) y tetraciclina (12,5 µg/ml) después de 12 h de incubación a 30 °C.

Confirmación de la presencia de WS/DGAT, PDC y ADHB activo funcional. La presencia de WS/DGAT, PDC y ADHB activo funcional en las cepas recombinantes se confirmó mediante análisis enzimáticos.

Ensayos enzimáticos fotométricos acoplados o directos que empleaban fracciones proteicas solubles obtenidas de células de las cepas recombinantes de *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3 y *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3::atfA/pdc/adhB cultivados durante 12 h a 30 °C en MSM que contenía gluconato sódico al 1 % (peso/vol) como única fuente de carbono, demostraron la presencia de PDC (18,73 U/mg) y ADH B (1,51 U/mg) activos en *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3::atfA/pdc/adhB, a diferencia de la cepa de control *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3 (PDC: 3,52 U/mg y ADH B: 0,25 U/mg). Los ensayos enzimáticos radiométricos para WS/DGAT revelaron la síntesis de ésteres cerosos y ésteres etílicos radiomarcados a partir de hexadecanol o etanol, respectivamente, y 1-¹⁴C-palmitoil CoA en las fracciones proteicas solubles de *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3::atfA/pdc/adhB aunque no de *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3, indicando de este modo la ausencia de WS/DGAT en la cepa de control negativo. Para la actividad de WS/DGAT no se determinaron actividades específicas.

Análisis de la biosíntesis de etanol y de EEAG mediante HPLC, CG, CG/EM y TLC. La biosíntesis de etanol y de EEAG se analizó en las cepas *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3 y *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3::atfA/pdc/adhB. Las células se desarrollaron en cultivos previos de MSM que contenían gluconato al 2 % (p/v) y tetraciclina o medio NB con tetraciclina durante 12 h a 30 °C y se utilizaron para inocular cultivos principales de los mismos medios en 11 matraces de Erlenmeyer con deflectores con 2,5 % del volumen de cultivo de 200 ml. Un cultivo de MSM adicional (400 ml) contenía adicionalmente oleato-Na al 0,4 % (p/v). Cada 4-8 h las muestras se retiraban y se centrifugaban. El sobrenadante se utilizó para la determinación del etanol mediante HPLC. Los sedimentos celulares se lavaron dos veces con solución salina estéril, se liofilizaron y se utilizaron para la determinación de los ésteres etílicos mediante CG, CG/EM y TLC.

Sin oleato-Na como cosustrato se encontraron cantidades de etanol máximas de 1,51 g/l después de 22 h en *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3::atfA/pdc/adhB que se desarrollaba en CN, mientras que la cepa de control alcanzaba 1,16 g/l después de 14 h. Con medio MSM las cantidades de etanol máximas alcanzaron 0,85 g/l para *R.*

eutropha Δ phaC1 pBBR1 MCS-3::atfA/pdc/adhB después de 32 h y 0,44 g/l para la cepa de control después de 8 h. Si se añadía oleato-Na al medio con MSM, la concentración máxima de etanol alcanzaba 4,38 g/l con *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3::atfA/pdc/adhB después de 36 h y 1,34 g/l con la cepa de control después de 30 h. Por tanto, pudo mostrarse que *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3::atfA/pdc/adhB podía sintetizar concentraciones de etanol tres veces más altas que las de la cepa de control si crecía en MSM con gluconato y oleato-Na.

Se analizaron posibles apariciones de EEAG mediante TLC y CG a partir de masas celulares liofilizadas. Sin la adición de oleato-Na ni las células crecían en CN ni las que crecían en MSM mostraron síntesis de etil oleato, como se revela mediante análisis de CG y TLC. Si se añadía oleato-Na a la masa seca celular en el medio de *R. eutropha* Δ phaC1 pBBR1MCS-3::atfA/pdc/adhB se mostraban concentraciones de etil oleato de 0,45 % (p/p) después de 36 h y de 0,23 % (p/p) después de 48 h. La masa seca celular de las cepas de control no dio picos correspondientes a etil oleato en análisis de CG. Comparables a los análisis de CG, los análisis de TLC de extractos brutos de las masas de células secas respectivas revelaron la aparición de sustancias correspondientes solo a etil oleato en la cepa Δ phaC1 de *R. eutropha* que contenía pBBR1MCS-3::atfA/pdc/adhB.

Aunque los análisis de CG/EM de la supuesta mancha de etil oleato separada de las placas de TLC no dieron resultados, los análisis de CG/EM del etil oleato que contenían una muestra de 36 h y la muestra de 48 h, revelaron la aparición de etil palmitoleato en la masa de células secas. No pudieron detectarse otros EEAG. Por tanto, si la cepa Δ phaC1 de *R. eutropha*, pBBR1MCS-3::atfA/pdc/adhB, se complementa con oleato-Na, puede sintetizar EEAG.

Referencias

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Altschul, S. F., T.L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- Anderson, R. L., and V. L. Sapico. 1975. D-fucose (D-manosa) kinase. *Methods Enzymol.* 42: 39-43.
- Aneja, K. K., R. D. Ashby, and D. K. Y. Solaiman. 2009. Altered composition of *Ralstonia eutropha* poly(hydroxyalcanoate) through expression of PHA synthase from *Allochrocatium vinosum* ATCC 35206. *Biotechnol. Lett.* 31: 1601-1612.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buchholz, B. Nordsiek, G., Meister, M. Bowien, B. 1994. Transfer of genes from *Pseudomonas saccharophila* a construct xylose-utilizing strains of *Alcaligenes eutrophus*. *Current Microbiology* 29: 157-162.
- Coulombel, C., M. J. Foglietti, and F. Percheron. 1982. Identification and kinetic studies of an inducible mannokinase from a *Streptomyces* strain. *Biochim. Biophys. Acta* 706: 117-122.
- Eliasson, A., E. Boles, B. Johansson, M. Osterberg, J. M. Thevelein, I. Spencer-Martins, H. Juhnke, and B. Hahn-Hägerdal. 2000. Xilulosa fermentation by mutant and wild-type strains of *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 376-382.
- Franklin, F. C. H., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian, and K. N. Timmis. 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7458-7462.
- Friedrich, B., C. Hogrefe, and H. G. Schlegel. 1981. Naturally occurring genetic transfer of hydrogen-oxidizing ability between strains of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 147: 198-205.
- Gao, Q., M. Zhang, J. D. McMillan, and D. S. Kompala. 2002. Characterization of heterologous and native enzyme activity profiles in metabolically engineered *Zymomonas mobilis* strains during batch fermentation of glucose and xylose mixtures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100:3 41-355.
- Gottschalk, G., U. Eberhardt, and H. G. Schlegel. 1964. Verwertung von Fucose durch *Hydrogenomonas* H16. *Arch. Mikrobiol.* 48: 95-108.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hirota, Y., H. Suzuki, Y. Nishimura, and S. Yasuda. 1977. On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a mutant of *E. coli* lacking a murein-lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 1417-1420.
- Jeffke, T., N.-H. Gropp, C. Kaiser, C. Grzesik, B. Kusian, and B. Bowien. 1999. Mutational analysis of the cbb operon (CO₂ Assimilation) promoter of *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* 181: 4374-4380.
- Kalscheuer, R., T. Stolting und A. Steinbuchel. 2006. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology* 152: 2529-2536
- Kang, S., and A. Markovitz. 1967. Induction of capsular polysaccharide synthesis by rho-fluorophenylalanine in *Escherichia coli* wild type and strains with altered phenylalanyl soluble ribonucleic acid synthetase. *J. Bacteriol.* 93: 584-591.
- König, C., I. Sammler, E. Wilde, and H. G. Schlegel. 1969. Constitutive glucose-6-phosphate dehydrogenase in mutants utilizing glucose, which are derived from cryptic wildtype strains. *Arch. Mikrobiol.* 67: 51-57.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop 2nd, and K. M. Peterson. 1995.

Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.

Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Meijnen, J.-P., J. H. de Winde, and H. J. Ruijsenaars. 2008. Engineering *Pseudomonas putida* S12 for efficient utilization of D-xylose and L-arabinosa. *Appl. Env. Microbiol.* 74: 5031-5037.

Park, H.-C., K.-J. Lim, J.-S. Park, Y.-H. Lee, and T.-L. Huh. 1995. High frequency transformation of *Alcaligenes eutrophus* producing poly- β -hydroxybutyric acid by electroporation. *Biotechnol. Tech.* 9: 31-34.

Parker, C., W. O. Barnell, J. L. Snoep, L. O. Ingram, and T. Conway. 1995. Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (*glf*) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. *Mol. Microbiol.* 15: 795-802.

Peplinski K., Ehrenreich A., Döring C., Bömeke M., Reinecke F., Hutmacher C. and Steinbüchel A., 2010, Genomewide transcriptome analyses of the 'Knallgas' bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiology*, 156: 2136-2152

Pohlmann, A., W. F. Fricke, F. Reinecke, B. Kusian, H. Liesegang, R. Cramm, T. Eitinger, C. Ewering, M. Potter, E. Schwartz, A. Strittmatter, I. Voss, G. Gottschalk, A. Steinbüchel, B. Friedrich, and B. Bowien. 2006. Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat. Biotechnol.* 24: 1257-1262. Pries, A., A. Steinbüchel, and H. G. Schlegel. 1990, Lactose and galactose utilizing strains of poly(hydroxyalkanoic acid) accumulating *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas saccharophila* obtained by recombinant DNA technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 410-417.

Porthun, A., M. Bernhard, B. Friedrich. 2002. Expression of a functional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase from the Gram-positive *Rhodococcus opacus* in the Gram-negative *Ralstonia eutropha*. *Arch. Microbiol.* 177: 159-166.

Reinecke, F., and A. Steinbüchel. 2009. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 16: 91-108. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schlegel, H. G., H. Kaltwasser, and G. Gottschalk. 1961. Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.* 38: 209-222.

Schlegel, H. G., and G. Gottschalk. 1965. Verwertung von Glucose durch eine Mutante von *Hydrogenomonas* H16. *Biochem. Z.* 341:2 49-259.

Schäferjohann, J., R. Bednarski, and B. Bowien. 1996. Regulation of CO₂ assimilation in *Ralstonia eutropha*: Premature transcription termination within the *cbb* operon. *J. Bacteriol.* 178: 6714-6719.

Schwartz, E., U. Gerischer, and B. Friedrich. 1998. Transcriptional regulation of *Alcaligenes eutrophus* hydrogenase genes. *J. Bacteriol.* 180: 3197-3204.

Sebastian, J., and C. Asensio. 1972. Purification and properties of the mannokinase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 151: 227-233.

Shamanna, D. K., and K. E. Sanderson. 1979. Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* 139: 64-70,

Siedow, A., R. Cramm, R. A. Siddiqui, and B. Friedrich. 1999. A megaplasmid-borne anaerobic ribonucleotide reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* 181: 4919-4928.

Simon R., Priefer U. and A. Punier. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria, *Biotechnology* 1:7 84-794

Solaiman, D. K. Y., and B. M. Swingle. 2010, Isolation of novel *Pseudomonas syringae* promoters and functional characterization in polyhydroxyalkanoate-producing pseudomonads. *New Biotechnol.* doi: 10. 1016/ j. nbt. 2009. 12. 003

Solaiman, D. K., B. M. Swingle, and R. D. Ashby. 2010, A new shuttle vector for gene expression in biopolymer-producing *Ralstonia eutropha*. *J. Microbiol. Methods* doi: 10. 1016/j. mimet. 2010. 04. 010,

Stein, S., Levitsky, A., Fateev, O. & Mallard, G. (1998) The NIST Mass Spectral Search Program. Windows-Software Version 1.6d.

Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A. Williams, C.D. and Radecka, I. 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* 102: 1437-1449.

Weber, K., Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.

West, S. E., H. P. Schweizer, C. Dall, A. K. Sample, and L. J. Runyen, Janecky. 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148: 81-86.

Windhövel, U., and B. Bowien. 1990, On the operon structure of the *cfx* gene clusters in *Alcaligenes eutrophus*. *Arch. Microbiol.* 154: 85-91.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Neste Oil OYJ

<120> Microorganismos con rango de utilización de sustrato ampliado

<130> BP204594

<150> EP10169808.2

<151> 16-07-2010

<150> US61/364898

<151> 16-07-2010

<160> 95

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 391

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 1

Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser Lys
1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Met Glu Asn Pro Ser Ser Gln Pro
20 25 30

Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Arg Val
35 40 45

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

Asp Lys Ser Thr Leu Leu Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe Gly Glu
65 70 75 80

Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Ala Gln Pro Leu Ser Ile
85 90 95

Gln Val His Pro Asn Lys His Asn Ser Glu Ile Gly Phe Ala Lys Glu
100 105 110

Asn Ala Ala Gly Ile Pro Met Asp Ala Ala Glu Arg Asn Tyr Lys Asp
115 120 125

Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala
130 135 140

Met Asn Ala Phe Arg Glu Phe Ser Glu Ile Val Ser Leu Leu Gln Pro
145 150 155 160

Val Ala Gly Ala His Pro Ala Ile Ala His Phe Leu Gln Gln Pro Asp
165 170 175

Ala Glu Arg Leu Ser Glu Leu Phe Ala Ser Leu Leu Asn Met Gln Gly
180 185 190

Glu Glu Lys Ser Arg Ala Leu Ala Ile Leu Lys Ser Ala Leu Asp Ser
195 200 205

Gln Gln Gly Glu Pro Trp Gln Thr Ile Arg Leu Ile Ser Glu Phe Tyr
210 215 220

Pro Glu Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys
225 230 235 240

Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala
245 250 255

Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val
260 265 270

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

Ala Asn Val Lys Phe Glu Ala Lys Pro Ala Asn Gln Leu Leu Thr Gln
290 295 300

Pro Val Lys Gln Gly Ala Glu Leu Asp Phe Pro Ile Pro Val Asp Asp
305 310 315 320

Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Ser Asp Lys Glu Thr Thr Ile Ser
325 330 335

Gln Gln Ser Ala Ala Ile Leu Phe Cys Val Glu Gly Asp Ala Thr Leu
340 345 350

Trp Lys Gly Ser Gln Gln Leu Gln Leu Lys Pro Gly Glu Ser Ala Phe
355 360 365

Ile Ala Ala Asn Glu Ser Pro Val Thr Val Lys Gly His Gly Arg Leu
370 375 380

Ala Arg Val Tyr Asn Lys Leu
385 390

<212> PRT

<213> *Zymomonas mobilis*

<400> 2

5

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

ES 2 571 757 T3

225					230						235					240
Leu	Thr	Ile	Gln	Lys	Ile	Lys	Ala	Gly	Phe	Asp	Lys	Ala	Met	Asp	Lys	
				245					250					255		
Ser	Ser	Ala	Gly	Leu	Phe	Ala	Phe	Gly	Ile	Thr	Val	Val	Phe	Ala	Gly	
			260					265					270			
Val	Ser	Val	Ala	Ala	Phe	Gln	Gln	Leu	Val	Gly	Ile	Asn	Ala	Val	Leu	
		275					280					285				
Tyr	Tyr	Ala	Pro	Gln	Met	Phe	Gln	Asn	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	Asp	Thr	
	290					295					300					
Ala	Leu	Leu	Gln	Thr	Ile	Ser	Ile	Gly	Val	Val	Asn	Phe	Ile	Phe	Thr	
305					310					315					320	
Met	Ile	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Lys	Pro	Leu	Leu	
				325					330					335		
Ile	Trp	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Ala	Ala	Met	Met	Ala	Val	Leu	Gly	Cys	
			340					345					350			
Cys	Phe	Trp	Phe	Lys	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser	Val	Leu	
		355					360					365				
Leu	Tyr	Ile	Ala	Val	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Gly	Pro	Val	Cys	Trp	Val	
	370					375					380					
Val	Leu	Ser	Glu	Met	Phe	Pro	Ser	Ser	Ile	Lys	Gly	Ala	Ala	Met	Pro	
385					390					395					400	
Ile	Ala	Val	Thr	Gly	Gln	Trp	Leu	Ala	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Phe	Leu	
				405					410					415		
Phe	Lys	Val	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Ala	Leu	Asn	Gln	Thr	Phe	Asn	His	
			420					425					430			
Gly	Phe	Ser	Tyr	Leu	Val	Phe	Ala	Ala	Leu	Ser	Ile	Leu	Gly	Gly	Leu	
		435					440					445				
Ile	Val	Ala	Arg	Phe	Val	Pro	Glu	Thr	Lys	Gly	Arg	Ser	Leu	Asp	Glu	
	450					455					460					
Ile	Glu	Glu	Met	Trp	Arg	Ser	Gln	Lys								
465					470											

<210> 3
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 3

```

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

Leu Gly Asp Ala Gly Glu Gln Leu Tyr Arg His Arg Leu Pro Thr Pro
           20           25           30

Arg Asp Asp Tyr Arg Gln Thr Ile Glu Thr Ile Ala Thr Leu Val Asp
           35           40           45

Met Ala Glu Gln Ala Thr Gly Gln Arg Gly Thr Val Gly Met Gly Ile
50           55           60

Pro Gly Ser Ile Ser Pro Tyr Thr Gly Val Val Lys Asn Ala Asn Ser
65           70           75           80

Thr Trp Leu Asn Gly Gln Pro Phe Asp Lys Asp Leu Ser Ala Arg Leu
           85           90           95

Gln Arg Glu Val Arg Leu Ala Asn Asp Ala Asn Cys Leu Ala Val Ser
           100          105          110

Glu Ala Val Asp Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gln Thr Val Phe Ala Val
115          120          125

Ile Ile Gly Thr Gly Cys Gly Ala Gly Val Ala Phe Asn Gly Arg Ala
130          135          140

His Ile Gly Gly Asn Gly Thr Ala Gly Glu Trp Gly His Asn Pro Leu
145          150          155          160

Pro Trp Met Asp Glu Asp Glu Leu Arg Tyr Arg Glu Glu Val Pro Cys
           165          170          175

Tyr Cys Gly Lys Gln Gly Cys Ile Glu Thr Phe Ile Ser Gly Thr Gly
           180          185          190

Phe Ala Met Asp Tyr Arg Arg Leu Ser Gly His Ala Leu Lys Gly Ser
           195          200          205

Glu Ile Ile Arg Leu Val Glu Glu Ser Asp Pro Val Ala Glu Leu Ala
210          215          220

```

Leu Arg Arg Tyr Glu Leu Arg Leu Ala Lys Ser Leu Ala His Val Val
225 230 235 240

Asn Ile Leu Asp Pro Asp Val Ile Val Leu Gly Gly Gly Met Ser Asn
245 250 255

Val Asp Arg Leu Tyr Gln Thr Val Gly Gln Leu Ile Lys Gln Phe Val
260 265 270

Phe Gly Gly Glu Cys Glu Thr Pro Val Arg Lys Ala Lys His Gly Asp
275 280 285

Ser Ser Gly Val Arg Gly Ala Ala Trp Leu Trp Pro Gln Glu
290 295 300

<210> 4
<211> 440
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 4

Met Gln Ala Tyr Phe Asp Gln Leu Asp Arg Val Arg Tyr Glu Gly Ser
1 5 10 15

Lys Ser Ser Asn Pro Leu Ala Phe Arg His Tyr Asn Pro Asp Glu Leu
20 25 30

Val Leu Gly Lys Arg Met Glu Glu His Leu Arg Phe Ala Ala Cys Tyr
35 40 45

Trp His Thr Phe Cys Trp Asn Gly Ala Asp Met Phe Gly Val Gly Ala
50 55 60

Phe Asn Arg Pro Trp Gln Gln Pro Gly Glu Ala Leu Ala Leu Ala Lys
65 70 75 80

Arg Lys Ala Asp Val Ala Phe Glu Phe Phe His Lys Leu His Val Pro
85 90 95

Phe Tyr Cys Phe His Asp Val Asp Val Ser Pro Glu Gly Ala Ser Leu
100 105 110

Lys Glu Tyr Ile Asn Asn Phe Ala Gln Met Val Asp Val Leu Ala Gly
115 120 125

Lys Gln Glu Glu Ser Gly Val Lys Leu Leu Trp Gly Thr Ala Asn Cys
130 135 140

5

10

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

ES 2 571 757 T3

Gly Gln Met Ser Leu Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ala Gln Glu His His
 405 410 415

Leu Ser Pro Val His Gln Ser Gly Arg Gln Glu Gln Leu Glu Asn Leu
 420 425 430

Val Asn His Tyr Leu Phe Asp Lys
 435 440

5
 <210> 5
 <211> 484
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 5

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

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

Gln Ile Ala Ala Asn Pro Glu Lys Ser Leu Ile Glu Leu Leu Pro Gln
 435 440 445

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

Tyr Gln Pro Arg Arg Glu Thr Phe Arg Arg Leu Tyr Gln Gln Leu Leu
 465 470 475 480

Pro Leu Met Ala

<210> 6
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<400> 6

Met Asn Thr Gln Tyr Asn Ser Ser Tyr Ile Phe Ser Ile Thr Leu Val
 1 5 10 15

Ala Thr Leu Gly Gly Leu Leu Phe Gly Tyr Asp Thr Ala Val Ile Ser
 20 25 30

Gly Thr Val Glu Ser Leu Asn Thr Val Phe Val Ala Pro Gln Asn Leu
 35 40 45

Ser Glu Ser Ala Ala Asn Ser Leu Leu Gly Phe Cys Val Ala Ser Ala
 50 55 60

Leu Ile Gly Cys Ile Ile Gly Gly Ala Leu Gly Gly Tyr Cys Ser Asn
 65 70 75 80

Arg Phe Gly Arg Arg Asp Ser Leu Lys Ile Ala Ala Val Leu Phe Phe
 85 90 95

Ile Ser Gly Val Gly Ser Ala Trp Pro Glu Leu Gly Phe Thr Ser Ile
 100 105 110

Asn Pro Asp Asn Thr Val Pro Val Tyr Leu Ala Gly Tyr Val Pro Glu
 115 120 125

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

Met Leu Ser Pro Met Tyr Ile Ala Glu Leu Ala Pro Ala His Ile Arg
 145 150 155 160

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

				405					410					415	
Leu	Ala	Asn	Tyr	Phe	Val	Ser	Trp	Thr	Phe	Pro	Met	Met	Asp	Lys	Asn
			420					425					430		
Ser	Trp	Leu	Val	Ala	His	Phe	His	Asn	Gly	Phe	Ser	Tyr	Trp	Ile	Tyr
		435					440					445			
Gly	Cys	Met	Gly	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Phe	Met	Trp	Lys	Phe	Val	Pro
	450					455					460				
Glu	Thr	Lys	Gly	Lys	Thr	Leu	Glu	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	Trp	Glu	Pro
465					470					475					480
Glu	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Gln	Thr	Ala	Thr	Leu					
				485					490						

<210> 7
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 7

5

ES 2 571 757 T3

Met Lys Ile Lys Asn Ile Leu Leu Thr Leu Cys Thr Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

Thr Asn Val Ala Ala His Ala Lys Glu Val Lys Ile Gly Met Ala Ile
20 25 30

Asp Asp Leu Arg Leu Glu Arg Trp Gln Lys Asp Arg Asp Ile Phe Val
35 40 45

Lys Lys Ala Glu Ser Leu Gly Ala Lys Val Phe Val Gln Ser Ala Asn
50 55 60

Gly Asn Glu Glu Thr Gln Met Ser Gln Ile Glu Asn Met Ile Asn Arg
65 70 75 80

Gly Val Asp Val Leu Val Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Gln Val Leu Ser
85 90 95

Asn Val Val Lys Glu Ala Lys Gln Glu Gly Ile Lys Val Leu Ala Tyr
100 105 110

Asp Arg Met Ile Asn Asp Ala Asp Ile Asp Phe Tyr Ile Ser Phe Asp
115 120 125

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

ES 2 571 757 T3

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

<210> 8
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<400> 8

ES 2 571 757 T3

Met Pro Tyr Leu Leu Glu Met Lys Asn Ile Thr Lys Thr Phe Gly Ser
1 5 10 15

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

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

His Ile Lys Arg Val Asn Asp Val Ser Phe Ser Leu Lys Arg Gly Glu
275 280 285

Ile Leu Gly Ile Ala Gly Leu Val Gly Ala Gly Arg Thr Glu Thr Ile
290 295 300

Gln Cys Leu Phe Gly Val Trp Pro Gly Gln Trp Glu Gly Lys Ile Tyr
305 310 315 320

Ile Asp Gly Lys Gln Val Asp Ile Arg Asn Cys Gln Gln Ala Ile Ala
325 330 335

Gln Gly Ile Ala Met Val Pro Glu Asp Arg Lys Arg Asp Gly Ile Val
340 345 350

Pro Val Met Ala Val Gly Lys Asn Ile Thr Leu Ala Ala Leu Asn Lys
355 360 365

Phe Thr Gly Gly Ile Ser Gln Leu Asp Asp Ala Ala Glu Gln Lys Cys
370 375 380

Ile Leu Glu Ser Ile Gln Gln Leu Lys Val Lys Thr Ser Ser Pro Asp
385 390 395 400

Leu Ala Ile Gly Arg Leu Ser Gly Gly Asn Gln Gln Lys Ala Ile Leu
405 410 415

Ala Arg Cys Leu Leu Leu Asn Pro Arg Ile Leu Ile Leu Asp Glu Pro
420 425 430

Thr Arg Gly Ile Asp Ile Gly Ala Lys Tyr Glu Ile Tyr Lys Leu Ile
435 440 445

Asn Gln Leu Val Gln Gln Gly Ile Ala Val Ile Val Ile Ser Ser Glu
450 455 460

Leu Pro Glu Val Leu Gly Leu Ser Asp Arg Val Leu Val Met His Glu
465 470 475 480

Gly Lys Leu Lys Ala Asn Leu Ile Asn His Asn Leu Thr Gln Glu Gln
485 490 495

Val Met Glu Ala Ala Leu Arg Ser Glu His His Val Glu Lys Gln Ser
500 505 510

Val

<210> 9
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 9

```

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

Gly Gly Phe Ser Gly Leu Lys Ser Leu Asn Leu Gln Val Phe Val Met
          20          25          30

Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ile Met Leu Phe Phe Thr Trp Thr Thr Asp
          35          40          45

Gly Ala Tyr Leu Ser Ala Arg Asn Val Ser Asn Leu Leu Arg Gln Thr
          50          55          60

Ala Ile Thr Gly Ile Leu Ala Val Gly Met Val Phe Val Ile Ile Ser
65          70          75          80

Ala Glu Ile Asp Leu Ser Val Gly Ser Met Met Gly Leu Leu Gly Gly
          85          90          95

Val Ala Ala Ile Cys Asp Val Trp Leu Gly Trp Pro Leu Pro Leu Thr
          100          105          110

Ile Ile Val Thr Leu Val Leu Gly Leu Leu Leu Gly Ala Trp Asn Gly
          115          120          125

Trp Trp Val Ala Tyr Arg Lys Val Pro Ser Phe Ile Val Thr Leu Ala
          130          135          140

Gly Met Leu Ala Phe Arg Gly Ile Leu Ile Gly Ile Thr Asn Gly Thr
145          150          155          160

Thr Val Ser Pro Thr Ser Ala Ala Met Ser Gln Ile Gly Gln Ser Tyr
          165          170          175

Leu Pro Ala Ser Thr Gly Phe Ile Ile Gly Ala Leu Gly Leu Met Ala
          180          185          190

Phe Val Gly Trp Gln Trp Arg Gly Arg Met Arg Arg Gln Ala Leu Gly
          195          200          205

Leu Gln Ser Pro Ala Ser Thr Ala Val Val Gly Arg Gln Ala Leu Thr
210          215          220

```

Ala Ile Ile Val Leu Gly Ala Ile Trp Leu Leu Asn Asp Tyr Arg Gly
225 230 235 240

Val Pro Thr Pro Val Leu Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Gly Gly Met
245 250 255

Phe Met Ala Thr Arg Thr Ala Phe Gly Arg Arg Ile Tyr Ala Ile Gly
260 265 270

Gly Asn Leu Glu Ala Ala Arg Leu Ser Gly Ile Asn Val Glu Arg Thr
275 280 285

Lys Leu Ala Val Phe Ala Ile Asn Gly Leu Met Val Ala Ile Ala Gly
290 295 300

Leu Ile Leu Ser Ser Arg Leu Gly Ala Gly Ser Pro Ser Ala Gly Asn
305 310 315 320

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

Leu Ala Gly Gly Val Gly Ser Val Ala Gly Ala Val Met Gly Ala Phe
340 345 350

Ile Met Ala Ser Leu Asp Asn Gly Met Ser Met Met Asp Val Pro Thr
355 360 365

Phe Trp Gln Tyr Ile Val Lys Gly Ala Ile Leu Leu Leu Ala Val Trp
370 375 380

Met Asp Ser Ala Thr Lys Arg Arg Ser
385 390

<210> 10
<211> 317
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 10

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

Asp Thr Gly Asp Ile Ala Ala Met Lys Leu Tyr Gln Pro Gln Asp Ala
20 25 30

Thr Thr Asn Pro Ser Leu Ile Leu Asn Ala Ala Gln Ile Pro Glu Tyr
35 40 45

Arg Lys Leu Ile Asp Asp Ala Val Ala Trp Ala Lys Gln Gln Ser Asn
 50 55 60

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

Ile Gly Leu Glu Ile Leu Lys Leu Val Pro Gly Arg Ile Ser Thr Glu
 85 90 95

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

Lys Arg Leu Ile Lys Leu Tyr Asn Asp Ala Gly Ile Ser Asn Asp Arg
 115 120 125

Ile Leu Ile Lys Leu Ala Ser Thr Trp Gln Gly Ile Arg Ala Ala Glu
 130 135 140

Gln Leu Glu Lys Glu Gly Ile Asn Cys Asn Leu Thr Leu Leu Phe Ser
 145 150 155 160

Phe Ala Gln Ala Arg Ala Cys Ala Glu Ala Gly Val Phe Leu Ile Ser
 165 170 175

Pro Phe Val Gly Arg Ile Leu Asp Trp Tyr Lys Ala Asn Thr Asp Lys
 180 185 190

Lys Glu Tyr Ala Pro Ala Glu Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Glu
 195 200 205

Ile Tyr Gln Tyr Tyr Lys Glu His Gly Tyr Glu Thr Val Val Met Gly
 210 215 220

Ala Ser Phe Arg Asn Ile Gly Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gly Cys Asp
 225 230 235 240

Arg Leu Thr Ile Ala Pro Ala Leu Leu Lys Glu Leu Ala Glu Ser Glu
 245 250 255

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

Pro Ala Arg Ile Thr Glu Ser Glu Phe Leu Trp Gln His Asn Gln Asp
 275 280 285

Pro Met Ala Val Asp Lys Leu Ala Glu Gly Ile Arg Lys Phe Ala Ile
 290 295 300

Asp Gln Glu Lys Leu Glu Lys Met Ile Gly Asp Leu Leu
 305 310 315

<210> 11
 <211> 663
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<400> 11

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

Asp Ala Val Gln Lys Ala Lys Ser Gly His Pro Gly Ala Pro Met Gly
 20 25 30

Met Ala Asp Ile Ala Glu Val Leu Trp Arg Asp Phe Leu Lys His Asn
 35 40 45

Pro Gln Asn Pro Ser Trp Ala Asp Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Asn
 50 55 60

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

Asp Leu Pro Met Glu Glu Leu Lys Asn Phe Arg Gln Leu His Ser Lys
 85 90 95

Thr Pro Gly His Pro Glu Val Gly Tyr Thr Ala Gly Val Glu Thr Thr
 100 105 110

Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ile Ala Asn Ala Val Gly Met Ala Ile
 115 120 125

Ala Glu Lys Thr Leu Ala Ala Gln Phe Asn Arg Pro Gly His Asp Ile
 130 135 140

Val Asp His Tyr Thr Tyr Ala Phe Met Gly Asp Gly Cys Met Met Glu
 145 150 155 160

Gly Ile Ser His Glu Val Cys Ser Leu Ala Gly Thr Leu Lys Leu Gly
 165 170 175

Lys Leu Ile Ala Phe Tyr Asp Asp Asn Gly Ile Ser Ile Asp Gly His
 180 185 190

Val Glu Gly Trp Phe Thr Asp Asp Thr Ala Met Arg Phe Glu Ala Tyr
 195 200 205

Gly Trp His Val Ile Arg Asp Ile Asp Gly His Asp Ala Ala Ser Ile
 210 215 220
 Lys Arg Ala Val Glu Glu Ala Arg Ala Val Thr Asp Lys Pro Ser Leu
 225 230 235 240
 Leu Met Cys Lys Thr Ile Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Lys Ala Gly
 245 250 255
 Thr His Asp Ser His Gly Ala Pro Leu Gly Asp Ala Glu Ile Ala Leu
 260 265 270
 Thr Arg Glu Gln Leu Gly Trp Lys Tyr Ala Pro Phe Glu Ile Pro Ser
 275 280 285
 Glu Ile Tyr Ala Gln Trp Asp Ala Lys Glu Ala Gly Gln Ala Lys Glu
 290 295 300
 Ser Ala Trp Asn Glu Lys Phe Ala Ala Tyr Ala Lys Ala Tyr Pro Gln
 305 310 315 320
 Glu Ala Ala Glu Phe Thr Arg Arg Met Lys Gly Glu Met Pro Ser Asp
 325 330 335
 Phe Asp Ala Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Lys Leu Gln Ala Asn Pro
 340 345 350
 Ala Lys Ile Ala Ser Arg Lys Ala Ser Gln Asn Ala Ile Glu Ala Phe
 355 360 365
 Gly Pro Leu Leu Pro Glu Phe Leu Gly Gly Ser Ala Asp Leu Ala Pro
 370 375 380
 Ser Asn Leu Thr Leu Trp Ser Gly Ser Lys Ala Ile Asn Glu Asp Ala
 385 390 395 400
 Ala Gly Asn Tyr Ile His Tyr Gly Val Arg Glu Phe Gly Met Thr Ala
 405 410 415
 Ile Ala Asn Gly Ile Ser Leu His Gly Gly Phe Leu Pro Tyr Thr Ser
 420 425 430
 Thr Phe Leu Met Phe Val Glu Tyr Ala Arg Asn Ala Val Arg Met Ala
 435 440 445
 Ala Leu Met Lys Gln Arg Gln Val Met Val Tyr Thr His Asp Ser Ile

450		455		460
Gly 465	Leu Gly Glu Asp	Gly 470	Pro Thr His Gln	Pro 475
	Val Glu Gln Val			Ala 480
Ser	Leu Arg Val Thr 485	Pro Asn Met	Ser Thr 490	Trp Arg Pro Cys Asp 495
Val	Glu Ser Ala 500	Val Ala Trp Lys	Tyr 505	Gly Val Glu Arg Gln 510
Pro	Thr Ala 515	Leu Ile Leu Ser	Arg 520	Gln Asn Leu Ala Gln 525
Thr	Glu 530	Glu Gln Leu Ala	Asn 535	Ile Ala Arg Gly 540
				Gly Tyr Val Leu Lys
Asp 545	Cys Ala Gly Gln	Pro 550	Glu Leu Ile Phe	Ile 555
				Ala Thr Gly Ser Glu 560
Val	Glu Leu Ala 565	Val Ala Ala Tyr	Glu 570	Lys Leu Thr Ala Glu 575
Lys	Ala Arg Val 580	Val Ser Met	Pro 585	Ser Thr Asp Ala Phe 590
Asp	Ala 595	Ala Tyr Arg Glu	Ser 600	Val Leu Pro Lys Ala 605
Val	Ala 610	Val Glu Ala Gly	Ile 615	Ala Asp Tyr Trp Tyr 620
Leu	Asn 625	Gly Ala Ile Val	Gly 630	Met Thr Thr Phe 635
				Gly Glu Ser Ala Pro 640
Ala	Glu 645	Leu Leu Phe	Glu 650	Glu Phe Thr Val Asp 655
				Asn Val Val
Ala	Lys 660	Ala Lys Glu	Leu Leu	

<210> 12
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<400> 12

Met Thr Lys Tyr Ala Leu Val Gly Asp Val Gly Gly Thr Asn Ala Arg

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

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

Lys Ala Ser Gly Phe Arg Ala Ala Phe Glu Asp Lys Gly Arg Phe Lys
275 280 285

Glu Tyr Val His Asp Ile Pro Val Tyr Leu Ile Val His Asp Asn Pro
290 295 300

Gly Leu Leu Gly Ser Gly Ala His Leu Arg Gln Thr Leu Gly His Ile
305 310 315 320

Leu

<210> 13

<211> 391

<212> PRT

<213> *Escherichia albertii*

<400> 13

Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser Lys
1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Met Glu Asn Pro Ser Asn Gln Pro
20 25 30

Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Arg Val
35 40 45

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

Asn Lys Ser Thr Leu Leu Gly Glu Ala Val Ala Gln Arg Phe Gly Glu
65 70 75 80

Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Ala Gln Pro Leu Ser Ile
85 90 95

Gln Val His Pro Asn Lys Arg Asn Ser Glu Ile Gly Phe Ala Lys Glu
100 105 110

Asn Ala Ala Gly Ile Pro Met Asp Ala Ala Glu Arg Asn Tyr Lys Asp
115 120 125

Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala
130 135 140

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

ES 2 571 757 T3

<210> 14
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> *Escherichia blattae*

5

<400> 14

```

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

Leu Gly Asp Ala Gly Glu Gln Leu Tyr Arg His Arg Leu Pro Thr Pro
          20          25          30

Arg Asp Asp Tyr Arg Gln Thr Ile Glu Thr Ile Ala Thr Leu Val Asp
          35          40          45

Met Ala Glu Gln Thr Thr Gly Gln Cys Gly Thr Val Gly Ile Gly Ile
          50          55          60

Pro Gly Ser Ile Ser Pro Tyr Thr Gly Val Val Lys Asn Ala Asn Ser
65          70          75          80

Thr Trp Leu Asn Gly Gln Pro Phe Asp Lys Asp Leu Ser Ala Arg Leu
          85          90          95

Gln Arg Glu Val Arg Leu Ala Asn Asp Ala Asn Cys Leu Ala Val Ser
          100          105          110

Glu Ala Val Asp Gly Ala Ala Ala Gly Ala Lys Thr Val Phe Ala Val
          115          120          125

Ile Ile Gly Thr Gly Cys Gly Ala Gly Val Ala Phe Asn Gly Arg Ala
          130          135          140

His Ile Gly Gly Asn Gly Thr Ala Gly Glu Trp Gly His Asn Pro Leu
145          150          155          160

Pro Trp Met Asp Thr Asp Glu Leu Arg Tyr Arg Glu Glu Val Pro Cys
          165          170          175

Tyr Cys Gly Lys Gln Gly Cys Ile Glu Thr Phe Ile Ser Gly Thr Gly
          180          185          190

Phe Ala Thr Asp Tyr His Arg Leu Ser Gly His Val Leu Lys Gly Ser
          195          200          205

Glu Ile Ile Arg Leu Val Glu Glu Asn Asp Pro Val Ala Glu Leu Ala
          210          215          220
  
```

Leu Asp Arg Tyr Glu Arg Arg Leu Ala Lys Ser Leu Ala His Val Val
225 230 235 240

Asn Ile Leu Asp Pro Asp Val Ile Val Leu Gly Gly Gly Met Ser Asn
245 250 255

Val Glu Arg Leu Tyr Gln Thr Val Pro Pro Leu Ile Lys Arg Phe Val
260 265 270

Phe Gly Gly Glu Cys Glu Thr Pro Val Arg Lys Ala Lys His Gly Asp
275 280 285

Ser Ser Gly Val Arg Gly Ala Ala Trp Leu Trp Pro Gln Glu
290 295 300

<210> 15

<211> 411

<212> PRT

<213> *Escherichia fergusonii*

<400> 15

Met Pro Glu Asn Ser Cys Phe Asn Asn Ala Asn Lys Leu His Met Lys
1 5 10 15

Gln Gly Leu Ile Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser Val Gln Asn Tyr Ala
20 25 30

Trp Gly Ser Lys Thr Ala Leu Thr Asp Leu Tyr Gly Ile Ala Asn Pro
35 40 45

Ser Gln Gln Pro Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser
50 55 60

Ser Ser Lys Val Glu Thr Ser Glu Gly Gln Ile Val Ser Leu Arg Asp
65 70 75 80

Val Ile Glu Asn Asp Lys Ser Ala Leu Leu Gly Asp Ala Val Ala Glu
85 90 95

Arg Phe Gly Glu Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Ala Gln
100 105 110

Pro Leu Ser Ile Gln Val His Pro Asn Lys Arg Asn Ser Glu Ile Gly
115 120 125

Phe Ala Lys Glu Asn Ala Ala Gly Ile Pro Met Asp Ala Ala Glu Arg
130 135 140

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

ES 2 571 757 T3

Asn	Gly	Arg	Leu	Ala	Arg	Val	Tyr	Asn	Lys	Leu
				405					410	

5

<210> 16
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> *Escherichia fergusonii*
 <400> 16

ES 2 571 757 T3

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

ES 2 571 757 T3

Leu Gly Arg Phe Met Gln Met Val Val Glu His Lys His Lys Ile Gly
 210 215 220
 Phe Gln Gly Thr Leu Leu Ile Glu Pro Lys Pro Gln Glu Pro Thr Lys
 225 230 235 240
 His Gln Tyr Asp Tyr Asp Ala Ala Thr Val Tyr Gly Phe Leu Lys Gln
 245 250 255
 Phe Gly Leu Glu Lys Glu Ile Lys Leu Asn Ile Glu Ala Asn His Ala
 260 265 270
 Thr Leu Ala Gly His Ser Phe His His Glu Ile Ala Thr Ala Ile Ala
 275 280 285
 Leu Gly Leu Phe Gly Ser Val Asp Ala Asn Arg Gly Asp Ala Gln Leu
 290 295 300
 Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Asn Ser Val Glu Glu Asn Ala Leu
 305 310 315 320
 Val Met Tyr Glu Ile Leu Lys Ala Gly Gly Phe Thr Thr Gly Gly Leu
 325 330 335
 Asn Phe Asp Ala Lys Val Arg Arg Gln Ser Thr Asp Lys Tyr Asp Leu
 340 345 350
 Phe Tyr Gly His Ile Gly Ala Met Asp Thr Met Ala Leu Ala Leu Lys
 355 360 365
 Val Ala Ala Arg Met Ile Glu Asp Gly Glu Leu Asp Lys Arg Val Ala
 370 375 380
 Gln Arg Tyr Ser Gly Trp Asn Ser Glu Leu Gly Gln Gln Ile Leu Lys
 385 390 395 400
 Gly Gln Met Ser Leu Ser Asp Leu Ala Lys Tyr Ala Gln Asp His Asn
 405 410 415
 Leu Ser Pro Val His Gln Ser Gly His Gln Glu Leu Leu Glu Ser Leu
 420 425 430
 Val Asn His Tyr Leu Phe Asp Lys
 435 440

<210> 17
 <211> 391

<212> PRT

<213> *Shigella flexneri*

<400> 17

5

Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser Lys
1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Met Glu Asn Pro Ser Ser Gln Pro
20 25 30

Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Arg Val
35 40 45

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

Asp Lys Ser Thr Leu Leu Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe Gly Glu
65 70 75 80

Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Ala Gln Pro Leu Ser Ile
85 90 95

Gln Val His Pro Asn Lys His Asn Ser Glu Ile Gly Phe Ala Lys Glu
100 105 110

Asn Ala Ala Gly Ile Pro Met Asp Ala Ala Glu Arg Asn Tyr Lys Asp
115 120 125

Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala
130 135 140

Met Asn Ala Phe Arg Glu Phe Ser Glu Ile Val Ser Leu Leu Gln Pro
145 150 155 160

Val Ala Gly Ala His Pro Ala Ile Ala His Phe Leu Gln Gln Pro His
165 170 175

Ala Glu Arg Leu Ser Glu Leu Phe Ala Asn Leu Leu Asn Met Gln Gly
180 185 190

Glu Glu Lys Ser Arg Ala Leu Ala Ile Leu Lys Ser Ala Leu Asp Ser
195 200 205

Gln Gln Gly Glu Pro Trp Gln Thr Ile Arg Leu Ile Ser Glu Phe Tyr
210 215 220

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

ES 2 571 757 T3

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

<210> 18
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> *Shigella sonnei*
 <400> 18

ES 2 571 757 T3

Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser Lys
1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Met Glu Asn Pro Ser Ser Gln Pro
20 25 30

Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Arg Val
35 40 45

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

50	55	60
Asp Lys Ser Thr Leu Leu Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe Gly Glu 65 70 75 80		
Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Ala Gln Pro Leu Ser Ile 85 90 95		
Gln Val His Pro Asn Lys Arg Asn Ser Glu Ile Gly Phe Ala Lys Glu 100 105 110		
Asn Ala Ala Gly Ile Pro Met Asp Ala Ala Glu Arg Asn Tyr Lys Asp 115 120 125		
Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala 130 135 140		
Met Asn Ala Phe Arg Glu Phe Ser Glu Ile Val Ser Leu Leu Gln Pro 145 150 155 160		
Val Ala Gly Ala His Pro Ala Ile Ala His Phe Leu Gln Gln Pro Asn 165 170 175		
Ala Glu Arg Leu Ser Glu Leu Phe Ala Ser Leu Leu Asn Met Gln Gly 180 185 190		
Glu Glu Lys Ser Arg Ala Leu Ala Ile Leu Lys Ser Ala Leu Asp Ser 195 200 205		
Gln Gln Gly Glu Pro Trp Gln Thr Ile Arg Leu Ile Ser Glu Phe Tyr 210 215 220		
Pro Glu Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys 225 230 235 240		
Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala 245 250 255		
Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val 260 265 270		
Leu Arg Ala Gly Leu Thr Pro Lys Tyr Ile Asp Ile Pro Glu Leu Val 275 280 285		
Ala Asn Val Lys Phe Glu Ala Lys Pro Ala Asn Gln Leu Leu Thr Gln 290 295 300		

ES 2 571 757 T3

Pro Val Lys Gln Gly Ala Glu Leu Asp Phe Pro Ile Pro Val Asp Asp
305 310 315 320

Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Ser Asp Lys Glu Thr Thr Ile Ser
325 330 335

Gln Gln Ser Ala Ala Ile Leu Phe Cys Val Glu Gly Asp Ala Thr Leu
340 345 350

Trp Lys Gly Ser Gln Gln Leu Gln Leu Lys Pro Gly Glu Ser Ala Phe
355 360 365

Ile Ala Ala Asn Glu Ser Pro Val Thr Val Lys Gly His Gly Arg Leu
370 375 380

Ala Arg Val Tyr Asn Lys Leu
385 390

<210> 19
<211> 440
<212> PRT
<213> *Shigella sonnei*

<400> 19

ES 2 571 757 T3

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

ES 2 571 757 T3

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

ES 2 571 757 T3

Gln Arg Tyr Ser Gly Trp Asn Ser Glu Leu Gly Gln Gln Ile Leu Lys
385 390 395 400

Gly Gln Met Ser Leu Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ala Gln Glu His Asn
405 410 415

Leu Ser Pro Val His Gln Ser Gly Arg Gln Glu Gln Leu Glu Asn Leu
420 425 430

Val Asn His Tyr Leu Phe Asp Lys
435 440

<210> 20

<211> 391

<212> PRT

<213> *Shigella dysenteriae*

<400> 20

5

ES 2 571 757 T3

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

Val Ala Gly Ala His Pro Ala Ile Ala His Phe Leu Gln Gln Pro His
165 170 175

Ala Glu His Leu Ser Glu Leu Phe Ala Ser Leu Leu Asn Met Gln Gly
180 185 190

Glu Glu Lys Ser Arg Ala Leu Ala Ile Leu Lys Ser Thr Leu Asp Ser
195 200 205

Gln Gln Gly Glu Pro Trp Gln Thr Ile Arg Leu Ile Ser Glu Phe Tyr
210 215 220

Pro Glu Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys
225 230 235 240

Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala
245 250 255

Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val
260 265 270

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

Ala Asn Val Lys Phe Glu Ala Lys Pro Ala Asn Gln Leu Leu Thr Gln
290 295 300

Pro Val Lys Gln Gly Ala Glu Leu Asp Phe Pro Ile Pro Val Asp Asp
305 310 315 320

Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Ser Asp Lys Glu Thr Thr Ile Ser
325 330 335

Gln Gln Ser Ala Ala Ile Leu Phe Cys Val Glu Gly Asp Ala Thr Leu
340 345 350

Trp Lys Gly Ser Gln Gln Leu Gln Leu Lys Pro Gly Glu Ser Ala Phe
355 360 365

Ile Ala Ala Asn Glu Ser Pro Val Thr Val Lys Gly His Gly Arg Leu
370 375 380

Ala Arg Val Tyr Asn Lys Leu
385 390

<210> 21
<211> 300

<212> PRT

<213> *Shigella dysenteriae*

<400> 21

5

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

Asn Ile Leu Asp Pro Asp Val Ile Val Leu Gly Gly Gly Met Ser Asn
245 250 255

Val Asp Arg Leu Tyr Gln Thr Val Pro Gln Leu Ile Lys Gln Phe Val
260 265 270

Phe Gly Gly Glu Cys Glu Thr Pro Val Arg Lys Ala Lys His Gly Asp
275 280 285

Ser Ser Gly Val Arg Gly Ala Ala Trp Leu Trp Pro
290 295 300

<210> 22

<211> 440

<212> PRT

<213> *Shigella dysenteriae*

<400> 22

5

ES 2 571 757 T3

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

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

ES 2 571 757 T3

405

410

415

Leu Ser Pro Val His Gln Ser Gly Arg Gln Glu Gln Leu Glu Asn Leu
420 425 430

Val Asn His Tyr Leu Phe Asp Lys
435 440

<210> 23

<211> 350

<212> PRT

<213> *Citrobacter koseri*

<400> 23

5

ES 2 571 757 T3

Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser Lys
1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Ile Ala Asn Pro Ser Gln Gln Pro
20 25 30

Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Arg Ile
35 40 45

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

Asp Lys Ala Thr Leu Leu Gly Glu Ser Val Ala Lys Arg Phe Gly Glu
65 70 75 80

Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Ala Gln Pro Leu Ser Ile
85 90 95

Gln Val His Pro Asn Lys His Asn Ser Glu Met Gly Phe Ala Lys Glu
100 105 110

Asn Ala Ala Gly Ile Pro Met Asp Ala Ala Glu Arg Asn Tyr Lys Asp
115 120 125

Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala
130 135 140

Met Asn Ala Phe Arg Glu Phe Ser Glu Val Val Ser Leu Leu Gln Pro
145 150 155 160

Val Ser Gly Ala His Thr Ala Ile Ala His Phe Leu Gln Glu Pro Asn
165 170 175

Ala Glu Arg Leu Ser Gln Leu Phe Ala Ser Leu Leu Asn Met Gln Gly

180	185	190
Asp Glu Lys Ser Arg Ala Leu Ala Val Leu Lys Ala Ala Leu Asn Ser		
195	200	205
Gln Gln Gly Glu Pro Trp Gln Thr Ile Arg Val Ile Ser Glu Phe Tyr		
210	215	220
Pro Asp Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys		
225	230	235
Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala		
245	250	255
Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val		
260	265	270
Leu Arg Ala Gly Leu Thr Pro Lys Tyr Ile Asp Ile Pro Glu Leu Val		
275	280	285
Ala Asn Val Lys Phe Val Ala Lys Pro Ala Asp Gln Leu Leu Thr Thr		
290	295	300
Pro Val Lys His Gly Thr Glu Leu Asp Phe Pro Ile Pro Val Glu Asp		
305	310	315
Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Ser Ala Gln Glu Thr Ala Ile Ser		
325	330	335
Gln Gln Ser Ala Ala Ile Leu Phe Cys Val Glu Gly Glu Ala		
340	345	350

<210> 24
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> *Citrobacter koseri*
 <400> 24

Met Glu Phe Ile Met Gln Ala Tyr Phe Asp Gln Leu Asp Arg Val Arg
1 5 10 15

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

Pro Asp Glu Ile Val Leu Gly Lys Arg Met Glu Asp His Leu Arg Phe
35 40 45

Ala Ala Cys Tyr Trp His Thr Phe Cys Trp Asn Gly Ala Asp Met Phe

ES 2 571 757 T3

50						55						60			
Gly	Val	Gly	Ala	Phe	Asn	Arg	Pro	Trp	Gln	Gln	Pro	Gly	Asp	Ala	Leu
65					70					75					80
Glu	Leu	Ala	Lys	Arg	Lys	Ala	Asp	Val	Ala	Phe	Glu	Phe	Phe	His	Lys
			85						90					95	
Leu	Asn	Val	Pro	Tyr	Tyr	Cys	Phe	His	Asp	Val	Asp	Val	Ser	Pro	Glu
			100					105					110		
Gly	Ala	Ser	Leu	Lys	Glu	Tyr	Lys	Asn	Asn	Phe	Ala	Gln	Met	Val	Asp
		115					120					125			
Val	Leu	Glu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gln	Ser	Gly	Val	Lys	Leu	Leu	Trp	Gly
	130					135					140				
Thr	Ala	Asn	Cys	Phe	Thr	Asn	Pro	Arg	Tyr	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Thr
145					150					155					160
Asn	Pro	Asp	Pro	Glu	Val	Phe	Ser	Trp	Ala	Ala	Thr	Gln	Val	Val	Asn
				165					170					175	
Ala	Met	Asn	Ala	Thr	His	Lys	Leu	Gly	Gly	Glu	Asn	Tyr	Val	Leu	Trp
			180					185					190		
Gly	Gly	Arg	Glu	Gly	Tyr	Glu	Thr	Leu	Leu	Asn	Thr	Asp	Leu	Arg	Gln
		195					200					205			
Glu	Arg	Glu	Gln	Ile	Gly	Arg	Phe	Met	Gln	Met	Val	Val	Glu	His	Lys
	210					215					220				
His	Lys	Thr	Gly	Phe	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Ile	Glu	Pro	Lys	Pro	Gln
225					230					235					240
Glu	Pro	Thr	Lys	His	Gln	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Val	Ala	Thr	Val	Tyr	Gly
				245					250					255	
Phe	Leu	Lys	Gln	Phe	Gly	Leu	Glu	Lys	Glu	Ile	Lys	Val	Asn	Ile	Glu
			260					265					270		
Ala	Asn	His	Ala	Thr	Leu	Ala	Gly	His	Ser	Phe	His	His	Glu	Ile	Ala
			275				280						285		
Ser	Ala	Ile	Ala	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Ser	Val	Asp	Ala	Asn	Arg	Gly
	290					295					300				

Asp Ala Gln Leu Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Val Ser Val Glu
305 310 315 320

Glu Asn Ala Leu Val Met Tyr Glu Ile Leu Lys Ala Gly Gly Phe Thr
325 330 335

Thr Gly Gly Leu Asn Phe Asp Ala Lys Val Arg Arg Gln Ser Thr Asp
340 345 350

Lys Tyr Asp Leu Phe Tyr Gly His Ile Gly Ala Met Asp Thr Met Ala
355 360 365

Leu Ser Leu Lys Val Ala Ala Arg Met Ile Glu Asp Gly Glu Leu Asp
370 375 380

Lys Arg Val Ala Lys Arg Tyr Ser Gly Trp Asn Ser Glu Leu Gly Gln
385 390 395 400

Gln Ile Leu Lys Gly Gln Leu Ser Leu Ser Asp Val Ala His Tyr Ala
405 410 415

Glu Gln Arg Asn Leu Ala Pro Val His Gln Ser Gly His Gln Glu Leu
420 425 430

Leu Glu Asn Leu Val Asn His Tyr Leu Phe Asp Lys
435 440

<210> 25
<211> 391
<212> PRT
<213> *Citrobacter rodentium*

<400> 25

Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser Lys
1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Ile Ala Asn Pro Gln Gln Leu Pro
20 25 30

Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Gln Val
35 40 45

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

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

Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Ala Gln Pro Leu Ser Ile
 85 90 95

Gln Val His Pro Asn Lys Arg Asn Ser Glu Leu Gly Phe Ala Lys Glu
 100 105 110

Asn Val Ala Gly Ile Pro Met Asp Ala Ala Glu Arg Asn Tyr Lys Asp
 115 120 125

Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala
 130 135 140

Met Asn Ala Phe Arg Glu Phe Ser Glu Ile Val Ser Leu Leu Gln Pro
 145 150 155 160

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

Ala Glu Arg Leu Ser Ala Leu Phe Ala Ala Leu Leu Asn Met Gln Gly
 180 185 190

Glu Glu Lys Ser Arg Ala Leu Ala Ile Leu Lys Ala Ala Leu Glu Thr
 195 200 205

Gln Ser Gly Glu Pro Trp Gln Thr Ile Arg Leu Ile Gly Glu Phe Tyr
 210 215 220

Pro Asp Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys
 225 230 235 240

Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala
 245 250 255

Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val
 260 265 270

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

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

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

Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Ser Ala Gln Gln Ala Glu Ile Ala
 325 330 335

Gln Gln Ser Ala Ala Ile Leu Phe Cys Val Glu Gly Glu Ala Thr Leu
340 345 350

Arg Lys Gly Glu Gln Ser Leu Thr Leu Lys Pro Gly Glu Ser Ala Phe
355 360 365

Ile Ser Ala Ala Glu Ser Pro Val Ser Val Ser Gly Ala Gly Arg Leu
370 375 380

Ala Arg Val Tyr Asn Lys Leu
385 390

<210> 26
<211> 302
<212> PRT
<213> *Citrobacter rodentium*
<400> 26

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

Leu Gly Glu Ser Gly Glu Gln Leu Phe Arg His Arg Leu Pro Thr Pro
20 25 30

Arg Asn Asp Tyr Arg Gln Thr Ile Glu Thr Ile Ala Thr Leu Val Glu
35 40 45

Met Ala Glu Lys Ala Thr Gly Gln Thr Gly Thr Val Gly Met Gly Ile
50 55 60

Pro Gly Ser Leu Ser Pro Tyr Thr Gly Val Val Lys Asn Ala Asn Ser
65 70 75 80

Thr Trp Leu Asn Gly Gln Pro Phe Asp Arg Asp Val Ser Ala Arg Leu
85 90 95

Gln Arg Glu Val Arg Leu Ala Asn Asp Ala Asn Cys Leu Ala Val Ser
100 105 110

Glu Ala Val Asp Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gln Thr Val Phe Ala Val
115 120 125

Ile Ile Gly Thr Gly Cys Gly Ala Gly Val Ala Leu Asn Gly Arg Ala
130 135 140

His Ala Gly Gly Asn Gly Thr Ala Gly Glu Trp Gly His Asn Pro Leu
145 150 155 160

Pro Trp Met Asp Asp Asp Glu Leu Arg Tyr Arg Glu Glu Val Pro Cys
165 170 175

Tyr Cys Gly Lys Gln Gly Cys Ile Glu Thr Phe Ile Ser Gly Thr Gly
180 185 190

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

Glu Ile Met Arg Arg Val Glu Glu Gln Asp Pro Leu Ala Glu Leu Ala
210 215 220

Leu Gly Arg Tyr Glu Leu Arg Leu Ala Lys Ser Leu Ala His Val Val
225 230 235 240

Asn Ile Leu Asp Pro Asp Val Ile Val Leu Gly Gly Gly Met Ser Asn
245 250 255

Val Asp Arg Leu Tyr Asn Thr Leu Pro Ala Leu Ile Gly Gln Phe Val
260 265 270

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

Ser Ser Gly Val Arg Gly Ala Ala Trp Leu Trp Pro Gln Arg
290 295 300

<210> 27

<211> 440

<212> PRT

<213> *Citrobacter rodentium*

<400> 27

Met Gln Ala Tyr Phe Asp Gln Leu Asp Arg Val Arg Phe Glu Gly Pro
1 5 10 15

Lys Ser Thr Asn Pro Leu Ala Phe Arg His Tyr Asn Pro Asp Glu Ile
20 25 30

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

Trp His Thr Phe Cys Trp Asn Gly Ala Asp Met Phe Gly Val Gly Ala
50 55 60

Phe Asp Arg Pro Trp Gln Gln Pro Gly Glu Ala Leu Ala Leu Ala Lys
65 70 75 80

5

10

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

Asn Phe Asp Ala Lys Val Arg Arg Gln Ser Thr Asp Lys Tyr Asp Leu
340 345 350

Phe Tyr Gly His Ile Gly Ala Met Asp Thr Met Ala Leu Ser Leu Lys
355 360 365

Ile Ala Ala Arg Met Ile Glu Asp Gly Glu Leu Asp Lys Arg Val Ala
370 375 380

Lys Arg Tyr Ala Gly Trp Asn Ser Glu Leu Gly Gln Gln Ile Leu Lys
385 390 395 400

Gly Gln Met Ser Leu Ser Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Glu Gln His Asn
405 410 415

Leu Ala Pro Val His Gln Ser Gly His Gln Glu Leu Leu Glu Asn Leu
420 425 430

Val Asn His Tyr Leu Phe Asn Lys
435 440

<210> 28

<211> 416

<212> PRT

<213> *Citrobacter youngae*

<400> 28

ES 2 571 757 T3

Met Cys Arg Leu Leu Pro Leu Gly Phe Leu Gly Leu Ile Ala Ala Glu
1 5 10 15

Asn Ser Thr Leu Lys Gln Gly Leu Arg Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser
20 25 30

Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser Lys Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr
35 40 45

Gly Met Ala Asn Pro Ala Gln Gln Pro Met Ala Glu Leu Trp Met Gly
50 55 60

Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Gln Val Leu Gly Ala Asp Gly Gln Thr
65 70 75 80

Ile Ala Leu Arg Asp Val Ile Glu Arg Asp Lys Ser Ala Leu Leu Gly
85 90 95

Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe Gly Glu Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val
100 105 110

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

ES 2 571 757 T3

355										360					365				
Phe	Cys	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Lys	Gly	Glu	Gln	Arg	Leu				
370					375					380									
Val	Leu	Gln	Pro	Gly	Glu	Ser	Ala	Phe	Ile	Ser	Ala	Asn	Glu	Ser	Pro				
385					390					395					400				
Val	Asn	Val	Ser	Gly	Thr	Gly	Arg	Leu	Ala	Arg	Val	Tyr	Asn	Lys	Leu				
405					410					415									

<210> 29
<211> 444
<212> PRT
<213> *Citrobacter youngae*

<400> 29

Met Glu Leu Ile Met Gln Ala Tyr Phe Asp Gln Leu Asp Arg Val Arg
1 5 10 15

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

Pro Asp Glu Ile Val Leu Gly Lys Arg Met Glu Asp His Leu Arg Phe
35 40 45

Ala Ala Cys Tyr Trp His Thr Phe Cys Trp Asn Gly Ala Asp Met Phe
50 55 60

Gly Met Gly Ala Phe Asp Arg Pro Trp Gln Gln Pro Gly Glu Ala Leu
65 70 75 80

Ala Leu Ala Lys Arg Lys Ala Asp Val Ala Phe Glu Phe Phe His Lys
85 90 95

Leu Asn Val Pro Tyr Tyr Cys Phe His Asp Val Asp Val Ser Pro Glu
100 105 110

Gly Ala Ser Leu Lys Glu Tyr Lys Asn Asn Phe Ala Gln Met Val Asp
115 120 125

Val Leu Ala Ala Lys Gln Glu Gln Ser Gly Val Lys Leu Leu Trp Gly
130 135 140

Thr Ala Asn Cys Phe Thr Asn Pro Arg Tyr Gly Ala Gly Ala Ala Thr
145 150 155 160

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

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

Glu Gln His Asn Leu Ala Pro Val His Gln Ser Gly His Gln Glu Gln
 420 425 430

Leu Glu Asn Leu Val Asn His Tyr Leu Phe Asp Lys
 435 440

<210> 30
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> *Salmonella enterica*

<400> 30

Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser Lys
 1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Ile Ala Asn Pro Gln Gln Gln Pro
 20 25 30

Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Arg Ile
 35 40 45

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

Asn Lys Thr Ala Met Leu Gly Glu Ala Val Ala Asn Arg Phe Gly Glu
 65 70 75 80

Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Ala Gln Pro Leu Ser Ile
 85 90 95

Gln Val His Pro Asn Lys Arg Asn Ser Glu Ile Gly Phe Ala Lys Glu
 100 105 110

Asn Ala Ala Gly Ile Pro Met Asp Ala Ala Glu Arg Asn Tyr Lys Asp
 115 120 125

Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala
 130 135 140

Met Asn Ala Phe Arg Glu Phe Ser Asp Ile Val Ser Leu Leu Gln Pro
 145 150 155 160

Val Ala Gly Ala His Ser Ala Ile Ala His Phe Leu Gln Ala Pro Asn
 165 170 175

Ala Glu Arg Leu Ser Gln Leu Phe Ala Ser Leu Leu Asn Met Gln Gly
 180 185 190

Glu Glu Lys Ser Arg Ala Leu Ala Val Leu Lys Ala Ala Leu Asn Ser
195 200 205

Gln Gln Gly Glu Pro Trp Gln Thr Ile Arg Val Ile Ser Glu Tyr Tyr
210 215 220

Pro Asp Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys
225 230 235 240

Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala
245 250 255

Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val
260 265 270

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

Ala Asn Val Lys Phe Glu Pro Lys Pro Ala Ser Glu Leu Leu Thr Ala
290 295 300

Pro Val Lys Ser Gly Ala Glu Leu Asp Phe Pro Ile Pro Val Asp Asp
305 310 315 320

Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Ala Leu Gln Glu Thr Ser Ile Gly
325 330 335

Gln His Ser Ala Ala Ile Leu Phe Cys Val Glu Gly Glu Ala Val Leu
340 345 350

Arg Lys Asp Glu Gln Arg Leu Val Leu Lys Pro Gly Glu Ser Ala Phe
355 360 365

Ile Gly Ala Asp Glu Ser Pro Val Asn Ala Ser Gly Thr Gly Arg Leu
370 375 380

Ala Arg Val Tyr Asn Lys Leu
385 390

<210> 31
<211> 440
<212> PRT
<213> *Salmonella enterica*

<400> 31

Met Gln Ala Tyr Phe Asp Gln Leu Asp Arg Val Arg Tyr Glu Gly Pro
1 5 10 15

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

Thr Leu Ala Gly His Ser Phe His His Glu Ile Ala Thr Ala Ile Ala
275 280 285

Leu Gly Ile Phe Gly Ser Val Asp Ala Asn Arg Gly Asp Ala Gln Leu
290 295 300

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

Val Met Tyr Glu Ile Leu Lys Ala Gly Gly Phe Thr Thr Gly Gly Leu
325 330 335

Asn Phe Asp Ala Lys Val Arg Arg Gln Ser Thr Asp Lys Tyr Asp Leu
340 345 350

Phe Tyr Gly His Ile Gly Ala Met Asp Thr Met Ala Leu Ser Leu Lys
355 360 365

Ile Ala Ala Arg Met Val Glu Asp Gly Glu Leu Asp Lys Arg Val Ala
370 375 380

Lys Arg Tyr Ala Gly Trp Asn Gly Glu Leu Gly Gln Gln Ile Leu Lys
385 390 395 400

Gly Gln Leu Ser Leu Gly Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Glu Gln His His
405 410 415

Leu Ala Pro Val His Gln Ser Gly His Gln Glu Leu Leu Glu Asn Leu
420 425 430

Val Asn Arg Tyr Leu Phe Asp Lys
435 440

<210> 32
<211> 391
<212> PRT
<213> *Salmonella typhimurium*
<400> 32

Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser Lys
1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Ile Ala Asn Pro Gln Gln Gln Pro
20 25 30

Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Arg Ile
35 40 45

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

Asn Lys Thr Ala Met Leu Gly Glu Ala Val Ala Asn Arg Phe Gly Glu
 65 70 75 80

Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Ala Lys Pro Leu Ser Ile
 85 90 95

Gln Val His Pro Asn Lys Arg Asn Ser Glu Ile Gly Phe Ala Lys Glu
 100 105 110

Asn Ala Ala Gly Ile Pro Met Asp Ala Ala Glu Arg Asn Tyr Lys Asp
 115 120 125

Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala
 130 135 140

Met Asn Ala Phe Arg Glu Phe Ser Asp Ile Val Ser Leu Leu Gln Pro
 145 150 155 160

Val Ala Gly Ala His Ser Ala Ile Ala His Phe Leu Gln Val Pro Asn
 165 170 175

Ala Glu Arg Leu Ser Gln Leu Phe Ala Ser Leu Leu Asn Met Gln Gly
 180 185 190

Glu Glu Lys Ser Arg Ala Leu Ala Val Leu Lys Ala Ala Leu Asn Ser
 195 200 205

Gln Gln Gly Glu Pro Trp Gln Thr Ile Arg Val Ile Ser Glu Tyr Tyr
 210 215 220

Pro Asp Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys
 225 230 235 240

Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala
 245 250 255

Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val
 260 265 270

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

Ala Asn Val Lys Phe Glu Pro Lys Pro Ala Gly Glu Leu Leu Thr Ala
 290 295 300

Pro Val Lys Ser Gly Ala Glu Leu Asp Phe Pro Ile Pro Val Asp Asp
305 310 315 320

Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Ala Leu Gln Glu Thr Ser Ile Gly
325 330 335

Gln His Ser Ala Ala Ile Leu Phe Cys Val Glu Gly Glu Ala Val Leu
340 345 350

Arg Lys Asp Glu Gln Arg Leu Val Leu Lys Pro Gly Glu Ser Ala Phe
355 360 365

Ile Gly Ala Asp Glu Ser Pro Val Asn Ala Ser Gly Thr Gly Arg Leu
370 375 380

Ala Arg Val Tyr Asn Lys Leu
385 390

<210> 33

<211> 391

<212> PRT

<213> *Enterobacter cloacae*

<400> 33

ES 2 571 757 T3

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

Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala
 130 135 140

Met Asn Ala Phe Arg Glu Phe Ser Glu Ile Ile Ser Leu Leu Gln Pro
 145 150 155 160

Val Ala Gly Ala His Asn Ala Ile Ala His Phe Leu Ala Asn Pro Asn
 165 170 175

Ala Glu Ser Leu Ser Gln Leu Phe Ala Ser Leu Leu Asn Met Gln Gly
 180 185 190

Asp Glu Lys Ser His Ala Arg Ala Val Leu Lys Ala Ala Leu Asp Gly
 195 200 205

Gln Gln Gly Glu Pro Trp Asp Thr Ile Arg Leu Ile Ser Ala Phe Tyr
 210 215 220

Pro Asp Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys
 225 230 235 240

Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala
 245 250 255

Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val
 260 265 270

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

Ala Asn Val Lys Phe Val Ala Lys Pro Ala Ala Glu Leu Leu Thr Gln
 290 295 300

Pro Val Lys Asn Gly Ala Glu Leu Asp Phe Pro Ile Pro Val Asp Asp
 305 310 315 320

Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Ser Gln Thr Glu Thr Thr Ile Ala
 325 330 335

Gln Glu Ser Ala Ala Ile Leu Phe Cys Val Glu Gly Glu Ala Thr Leu
 340 345 350

His Lys Gly Glu Gln Arg Leu Val Leu Lys Pro Gly Glu Ser Ala Phe
 355 360 365

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

370

375

380

Ala Arg Val Phe Asn Lys Leu
385 390

5

<210> 34
<211> 461
<212> PRT
<213> *Enterobacter cloacae*

<400> 34

ES 2 571 757 T3

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

195					200					205					
Trp	Gly	Gly	Arg	Glu	Gly	Tyr	Glu	Thr	Leu	Leu	Asn	Thr	Asp	Leu	Arg
210						215					220				
Gln	Glu	Arg	Glu	Gln	Ile	Gly	Arg	Phe	Met	Gln	Met	Val	Val	Glu	His
225					230					235					240
Lys	His	Lys	Ile	Gly	Phe	Arg	Gly	Thr	Leu	Leu	Ile	Glu	Pro	Lys	Pro
				245					250					255	
Gln	Glu	Pro	Thr	Lys	His	Gln	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Val	Ala	Thr	Val	Tyr
			260					265					270		
Gly	Phe	Leu	Lys	Gln	Phe	Gly	Leu	Glu	Lys	Glu	Ile	Lys	Val	Asn	Ile
	275						280					285			
Glu	Ala	Asn	His	Ala	Thr	Leu	Ala	Gly	His	Ser	Phe	His	His	Glu	Ile
	290					295					300				
Ala	Ser	Ala	Ile	Ala	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Ser	Val	Asp	Ala	Asn	Arg
305					310					315					320
Gly	Asp	Ala	Gln	Leu	Gly	Trp	Asp	Thr	Asp	Gln	Phe	Pro	Asn	Ser	Val
			325						330					335	
Glu	Glu	Asn	Ala	Leu	Val	Met	Tyr	Glu	Ile	Ile	Lys	Ala	Gly	Gly	Phe
			340					345					350		
Thr	Thr	Gly	Gly	Leu	Asn	Phe	Asp	Ala	Lys	Val	Arg	Arg	Gln	Ser	Thr
		355					360					365			
Asp	Lys	Tyr	Asp	Leu	Phe	Tyr	Gly	His	Ile	Gly	Ala	Met	Asp	Thr	Met
	370					375					380				
Ala	Leu	Ala	Leu	Lys	Val	Ala	Ala	Arg	Met	Ile	Glu	Asp	Gly	Glu	Leu
385					390					395					400
Asp	Lys	Arg	Val	Ala	Lys	Arg	Tyr	Ser	Gly	Trp	Asn	Ser	Glu	Leu	Gly
				405					410					415	
Gln	Gln	Ile	Leu	Lys	Gly	Gln	Leu	Ser	Leu	Ala	Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr
			420					425					430		
Ala	Glu	Gln	His	Gln	Leu	Ala	Pro	Gln	His	Gln	Ser	Gly	His	Gln	Glu
		435					440					445			

ES 2 571 757 T3

Leu Leu Glu Asn Leu Val Asn His Tyr Leu Phe Asp Lys
 450 455 460

- <210> 35
- <211> 391
- <212> PRT
- <213> *Enterobacter cancerogenus*
- <400> 35

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

Gln Gln Gly Glu Pro Trp Asp Thr Ile Arg Val Ile Ser Glu Phe Tyr
210 215 220

Pro Asp Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys
225 230 235 240

Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala
245 250 255

Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val
260 265 270

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

Ala Asn Val Lys Phe Val Ala Lys Pro Ala Ala Glu Leu Leu Thr Gln
290 295 300

Pro Val Lys Asn Gly Ala Glu Leu Asp Phe Pro Ile Pro Val Asp Asp
305 310 315 320

Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Ser Ala Asp Glu Thr Ala Ile Ala
325 330 335

Gln Glu Ser Ala Ala Ile Leu Phe Cys Val Glu Gly Glu Ala Thr Leu
340 345 350

His Lys Gly Glu Gln Arg Leu Val Leu Lys Pro Gly Glu Ser Ala Phe
355 360 365

Val Ala Ala Asn Glu Ser Pro Val Ser Ile Ser Gly Lys Gly Arg Leu
370 375 380

Ala Arg Val Phe Asn Lys Leu
385 390

<210> 36

<211> 392

<212> PRT

<213> *Cronobacter turicensis*

<400> 36

Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser Lys
1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Val Ala Asn Pro Glu Gly Leu Pro
20 25 30

Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Lys Ile
 35 40 45
 Gln Asp Asp Gln Gly Gln Thr Arg Ala Leu Arg Glu Val Ile Asp Ala
 50 55 60
 Asp Lys Thr Ala Leu Leu Gly Ala Pro Val Ala Glu Arg Phe Gly Glu
 65 70 75 80
 Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Asp Gln Pro Leu Ser Ile
 85 90 95
 Gln Val His Pro Asn Lys Gln Ala Ser Glu Glu Gly Phe Ala Arg Glu
 100 105 110
 Asn Ala Ala Gly Ile Pro Leu Asp Ala Ala Glu Arg Asn Tyr Lys Asp
 115 120 125
 Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala
 130 135 140
 Met Asn Ala Phe Arg Glu Phe Ser Glu Ile Val Ser Leu Leu Gln Pro
 145 150 155 160
 Val Ala Gly Ala His Thr Ala Ile Ala His Phe Leu Ala Glu Pro Asn
 165 170 175
 Ala Asp Arg Leu Arg Asp Leu Phe Ala Gly Leu Leu Asn Met Gln Gly
 180 185 190
 Glu Glu Lys Ser Arg Ala Leu Ala Val Leu Lys Ala Thr Val Ala Ser
 195 200 205
 Gln Gln Gly Glu Pro Trp Asp Thr Ile Arg Phe Ile Ala Gln Phe Tyr
 210 215 220
 Pro Asp Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys
 225 230 235 240
 Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala
 245 250 255
 Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val
 260 265 270
 Leu Arg Ala Gly Leu Thr Pro Lys Tyr Ile Asp Ile Pro Glu Leu Val
 275 280 285

Ala Asn Val Lys Phe Val Ala Lys Pro Ala Ala Gln Leu Leu Thr Gln
290 295 300

Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Leu Glu Phe Pro Ile Pro Val Glu Asp
305 310 315 320

Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Gln Ser Gln Pro Gln Arg Leu Ala
325 330 335

Gln Glu Ser Ala Ala Ile Leu Phe Cys Val Glu Gly Glu Ala Val Leu
340 345 350

Ser Lys Gly Asp Glu Arg Leu Thr Leu Lys Pro Gly Glu Ser Ala Phe
355 360 365

Val Ala Ala Asn Glu Ser Pro Val Asn Val Ser Gly Val Gly Arg Leu
370 375 380

Ala Arg Val Tyr Asn Lys Leu Asn
385 390

<210> 37

<211> 392

<212> PRT

<213> *Cronobacter sakazakii*

<400> 37

Met Gln Lys Leu Ile Asn Ser Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser Lys
1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Val Ala Asn Pro Glu Gly Leu Pro
20 25 30

Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Lys Ile
35 40 45

Gln Asp Ala Gln Gly Gln Thr Arg Ala Leu Arg Glu Val Ile Asp Ala
50 55 60

Asp Lys Thr Ala Leu Leu Gly Ala Pro Val Ala Glu Arg Phe Gly Glu
65 70 75 80

Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Asp Gln Pro Leu Ser Ile
85 90 95

Gln Val His Pro Asn Lys Gln Ala Ser Glu Glu Gly Phe Ala Arg Glu
100 105 110

Asn Ala Ala Gly Ile Pro Leu Ser Ala Ala Glu Arg Asn Tyr Lys Asp
 115 120 125

Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala
 130 135 140

Met Asn Ala Phe Arg Glu Phe Ser Glu Ile Val Ser Leu Leu Gln Pro
 145 150 155 160

Val Ala Gly Ala His Thr Ala Ile Ala His Phe Leu Ala Glu Pro Asn
 165 170 175

Ala Asp Arg Leu Arg Glu Leu Phe Ala Gly Leu Leu Asn Met Gln Gly
 180 185 190

Glu Glu Lys Ser Arg Ala Leu Ala Val Leu Lys Ala Thr Val Ala Ser
 195 200 205

Gln Gln Gly Glu Pro Trp Glu Thr Ile Arg Phe Ile Ala Gln Phe Tyr
 210 215 220

Pro Asp Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys
 225 230 235 240

Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala
 245 250 255

Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val
 260 265 270

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

Ala Asn Val Lys Phe Val Ala Lys Pro Ala Gly Glu Leu Leu Thr Gln
 290 295 300

Pro Val Lys Gln Glu Ser Ala Leu Glu Phe Pro Ile Pro Val Glu Asp
 305 310 315 320

Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Asn Ser Gln Pro Gln Ser Leu Ala
 325 330 335

Gln Glu Ser Ala Ala Ile Leu Phe Cys Val Glu Gly Glu Ala Val Leu
 340 345 350

Ser Lys Gly Asp Glu Arg Leu Thr Leu Lys Pro Gly Glu Ser Ala Phe
 355 360 365

Val Ala Ala Ser Glu Ser Pro Val Arg Ala Ser Gly Val Gly Arg Leu
 370 375 380

Ala Arg Val Tyr Asn Lys Leu Asn
 385 390

<210> 38
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 38

Met Gln Lys Leu Ile Asn Ala Val Gln Asn Tyr Ala Trp Gly Ser His
 1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Ile Ala Asn Pro Asp Asn Leu Pro
 20 25 30

Met Ala Glu Leu Trp Met Gly Ala His Pro Lys Ser Ser Ser Gln Ile
 35 40 45

Leu Ala Ala Asp Gly Gln Pro Arg Ser Leu Arg Glu Val Ile Asp Ala
 50 55 60

Asp Lys Thr Ala Leu Leu Gly Asp Lys Val Ala Ala Arg Phe Gly Glu
 65 70 75 80

Leu Pro Phe Leu Phe Lys Val Leu Cys Ala Ala Gln Pro Leu Ser Ile
 85 90 95

Gln Val His Pro Asn Lys Gln Ala Ser Glu Glu Gly Phe Ala Arg Glu
 100 105 110

Asn Ala Ala Gly Ile Pro Leu Ser Ala Ala Glu Arg Asn Tyr Lys Asp
 115 120 125

Pro Asn His Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Leu Thr Pro Phe Leu Ala
 130 135 140

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

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

Ala Thr His Leu Ser Gln Leu Phe Ala Ser Leu Leu Asn Met Gln Gly
 180 185 190

Glu Glu Lys Ala Lys Ala Leu Gln Val Leu Arg Asp Val Leu Ala Arg
 195 200 205

Glu Gln Gly Glu Pro Trp Gln Thr Ile Arg Leu Ile Ala Glu Phe Tyr
 210 215 220

Pro Asp Asp Ser Gly Leu Phe Ser Pro Leu Leu Leu Asn Val Val Lys
 225 230 235 240

Leu Asn Pro Gly Glu Ala Met Phe Leu Phe Ala Glu Thr Pro His Ala
 245 250 255

Tyr Leu Gln Gly Val Ala Leu Glu Val Met Ala Asn Ser Asp Asn Val
 260 265 270

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

Ala Asn Val Lys Phe Glu Ala Lys Pro Ala Gly Glu Leu Leu Thr Gln
 290 295 300

Pro Gln Gln His Gly Ala Glu Leu Asp Phe Pro Ile Pro Val Glu Asp
 305 310 315 320

Phe Ala Phe Ser Leu His Asp Leu Ser Ala Glu Ala Ser Asp Leu Ala
 325 330 335

Gln Ala Ser Ala Ala Ile Ile Phe Cys Val Asp Gly Glu Ala Val Leu
 340 345 350

His Lys Gly Asp Gln Ser Leu Thr Leu Lys Pro Gly Glu Ser Ala Phe
 355 360 365

Val Ala Ala Asn Glu Ser Pro Val Gln Val Ser Gly Arg Gly Arg Val
 370 375 380

Ala Arg Val Phe Asn Lys Leu Gln
 385 390

<210> 39
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 39

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

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

ES 2 571 757 T3

260 265 270
 Phe Gly Gly Glu Cys Glu Thr Pro Ile Arg Lys Ala Leu His Gly Asp
 275 280 285
 Ser Ser Gly Val Arg Gly Ala Ala Trp Leu Trp Pro Leu Gln Gly Thr
 290 295 300

- 5
- <210> 40
 - <211> 392
 - <212> PRT
 - <213> *Serratia odorifera*
 - <400> 40

ES 2 571 757 T3

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

[illegible]

<210> 41
<211> 491
<212> PRT
<213> *Escherichia fergusonii*

<400> 41

ES 2 571 757 T3

Met Ser Thr Gln Tyr Asn Ser Ser Tyr Ile Phe Ser Ile Thr Leu Val

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

Lys His Ser Leu Asp His Gly Arg Lys Thr Gly Gly Arg Leu Leu Met
 260 265 270
 Phe Gly Val Gly Val Ile Val Ile Gly Val Met Leu Ser Ile Phe Gln
 275 280 285
 Gln Phe Val Gly Ile Asn Val Val Leu Tyr Tyr Ala Pro Glu Val Phe
 290 295 300
 Lys Thr Leu Gly Ala Ser Thr Asp Ile Ala Leu Leu Gln Thr Ile Ile
 305 310 315 320
 Val Gly Val Ile Asn Leu Thr Phe Thr Val Leu Ala Ile Met Thr Val
 325 330 335
 Asp Lys Phe Gly Arg Lys Pro Leu Gln Ile Ile Gly Ala Leu Gly Met
 340 345 350
 Ala Ile Gly Met Phe Ser Leu Gly Thr Ala Phe Tyr Thr Gln Ala Pro
 355 360 365
 Gly Ile Val Ala Leu Leu Ser Met Leu Phe Tyr Val Ala Ala Phe Ala
 370 375 380
 Met Ser Trp Gly Pro Val Cys Trp Val Leu Leu Ser Glu Ile Phe Pro
 385 390 395 400
 Asn Ala Ile Arg Gly Lys Ala Leu Ala Ile Ala Val Ala Ala Gln Trp
 405 410 415
 Leu Ala Asn Tyr Phe Val Ser Trp Thr Phe Pro Met Met Asp Lys Asn
 420 425 430
 Ser Trp Leu Val Ala His Phe His Asn Gly Phe Ser Tyr Trp Ile Tyr
 435 440 445
 Gly Cys Met Gly Val Leu Ala Ala Leu Phe Met Trp Lys Phe Val Pro
 450 455 460
 Glu Thr Lys Gly Lys Thr Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Trp Glu Pro
 465 470 475 480
 Glu Thr Lys Lys Thr Gln Gln Thr Ala Thr Leu
 485 490

<212> PRT

<213> *Shigella flexneri*

<400> 42

5

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

Arg Lys Ile Met Gly Asn Thr Leu Ala Thr Gln Ala Val Gln Glu Ile
 245 250 255
 Lys His Ser Leu Asp His Gly Arg Lys Thr Gly Gly Arg Leu Leu Met
 260 265 270
 Phe Gly Val Gly Val Ile Val Ile Gly Val Met Leu Ser Ile Phe Gln
 275 280 285
 Gln Phe Val Gly Ile Asn Val Val Leu Tyr Tyr Ala Pro Glu Val Phe
 290 295 300
 Lys Thr Leu Gly Ala Ser Thr Asp Ile Ala Leu Leu Gln Thr Ile Ile
 305 310 315 320
 Val Gly Val Ile Asn Leu Thr Phe Thr Val Leu Ala Ile Met Thr Val
 325 330 335
 Asp Lys Phe Gly Arg Lys Pro Leu Gln Ile Ile Gly Ala Leu Gly Met
 340 345 350
 Ala Ile Gly Met Phe Ser Leu Gly Thr Ala Phe Tyr Thr Gln Ala Ser
 355 360 365
 Gly Ile Val Ala Leu Leu Ser Met Leu Phe Tyr Val Ala Ala Phe Ala
 370 375 380
 Met Ser Trp Gly Pro Val Cys Trp Val Leu Leu Ser Glu Ile Phe Pro
 385 390 395 400
 Asn Ala Ile Arg Gly Lys Ala Leu Ala Ile Ala Val Ala Ala Gln Trp
 405 410 415
 Leu Ala Asn Tyr Phe Val Ser Trp Thr Phe Pro Met Met Asp Lys Asn
 420 425 430
 Ser Trp Leu Val Ala His Phe His Asn Gly Phe Ser Tyr Trp Ile Tyr
 435 440 445
 Gly Cys Met Gly Val Leu Ala Ala Leu Phe Met Trp Lys Phe Val Pro
 450 455 460
 Glu Thr Lys Gly Lys Thr Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Trp Glu Pro
 465 470 475 480
 Glu Thr Lys Lys Thr Gln Gln Thr Ala Thr
 485 490

<210> 43
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> *Salmonella enterica*

5

<400> 43

```

Met Asn Thr His Tyr Asn Ser Arg Tyr Ile Phe Ser Ile Thr Leu Val
1           5           10           15

Ala Thr Leu Gly Gly Leu Leu Phe Gly Tyr Asp Thr Ala Val Ile Ser
          20           25           30

Gly Thr Val Glu Ser Leu Asn Thr Val Phe Val Ala Pro Gln His Leu
          35           40           45

Ser Glu Ser Ala Ala Asn Ser Leu Leu Gly Phe Cys Val Ala Ser Ala
          50           55           60

Leu Ile Gly Cys Ile Ile Gly Gly Ala Leu Gly Gly Tyr Cys Ser Asn
65           70           75           80

Arg Phe Gly Arg Arg Asp Ser Leu Lys Ile Ala Ala Leu Leu Phe Phe
          85           90           95

Ile Ser Gly Ile Gly Ser Ala Trp Pro Glu Leu Gly Phe Thr Thr Ile
          100          105          110

Asn Pro Asp Asn Ala Val Pro Val Tyr Leu Ala Gly Tyr Val Pro Glu
          115          120          125

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

Met Leu Ser Pro Met Tyr Ile Ala Glu Leu Ala Pro Ala His Ile Arg
145          150          155          160

Gly Lys Leu Val Ser Phe Asn Gln Phe Ala Ile Ile Phe Gly Gln Leu
          165          170          175

Leu Val Tyr Cys Val Asn Tyr Phe Ile Ala Arg Ser Gly Asp Ala Asn
          180          185          190

Trp Leu Asn Thr Asp Gly Trp Arg Tyr Met Phe Ala Ser Glu Ser Ile
          195          200          205

Pro Ala Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Tyr Thr Val Pro Glu Ser Pro
210          215          220

```

Arg Trp Leu Met Ala Arg Gly Lys His Glu Gln Ala Glu Gly Ile Leu
 225 230 235 240
 Arg Lys Ile Met Gly Ser Ser Leu Thr Thr Gln Ala Met Gln Glu Ile
 245 250 255
 Asn Gln Ser Leu Glu His Gly Arg Lys Thr Gly Gly Arg Leu Leu Met
 260 265 270
 Phe Gly Val Gly Val Ile Val Ile Gly Val Met Leu Ser Val Phe Gln
 275 280 285
 Gln Phe Val Gly Ile Asn Val Val Leu Tyr Tyr Ala Pro Glu Val Phe
 290 295 300
 Lys Thr Leu Gly Ala Ser Thr Asp Val Ala Leu Leu Gln Thr Ile Ile
 305 310 315 320
 Val Gly Val Ile Asn Leu Ser Phe Thr Val Leu Ala Ile Met Thr Val
 325 330 335
 Asp Lys Phe Gly Arg Lys Pro Leu Gln Ile Ile Gly Ala Leu Gly Met
 340 345 350
 Ala Leu Gly Met Phe Ser Leu Gly Thr Ala Phe Tyr Thr Gln Ala Ser
 355 360 365
 Gly Leu Ile Ala Leu Leu Ser Met Leu Phe Tyr Val Ala Ala Phe Ala
 370 375 380
 Met Ser Trp Gly Pro Val Cys Trp Val Leu Leu Ala Glu Ile Phe Pro
 385 390 395 400
 Asn Ala Ile Arg Gly Lys Ala Leu Ala Ile Ala Val Ala Ala Gln Trp
 405 410 415
 Leu Ala Asn Tyr Phe Val Ser Trp Thr Phe Pro Met Met Asp Lys Asn
 420 425 430
 Ser Trp Leu Val Ser His Phe His Asn Gly Phe Ser Tyr Trp Ile Tyr
 435 440 445
 Gly Cys Met Gly Ile Leu Ala Ala Leu Phe Met Trp Lys Phe Val Pro
 450 455 460
 Glu Thr Lys Gly Lys Thr Leu Glu Glu Leu Glu Lys Leu Trp Thr Pro

465 470 475 480

Ala Glu Glu Lys Thr Pro Lys Ala Ala Ile Gln
485 490

5

<210> 44
<211> 491
<212> PRT
<213> *Citrobacter youngae*

<400> 44

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

195					200					205					
Pro	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Tyr	Thr	Val	Pro	Glu	Ser	Pro
210							215				220				
Arg	Trp	Leu	Met	Ala	Arg	Gly	Lys	His	Glu	Gln	Ala	Glu	Gly	Ile	Leu
225						230					235				240
Arg	Lys	Ile	Met	Gly	Asn	Ser	Leu	Ala	Thr	Gln	Ala	Met	Gln	Glu	Ile
				245					250					255	
Asn	Gln	Ser	Leu	Glu	His	Gly	Arg	Lys	Thr	Gly	Gly	Arg	Leu	Leu	Met
			260					265					270		
Phe	Gly	Val	Gly	Val	Ile	Val	Ile	Gly	Val	Met	Leu	Ser	Ile	Phe	Gln
		275					280					285			
Gln	Phe	Val	Gly	Ile	Asn	Val	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Pro	Glu	Val	Phe
	290						295				300				
Lys	Thr	Leu	Gly	Ala	Ser	Thr	Asp	Val	Ala	Leu	Leu	Gln	Thr	Ile	Ile
305						310					315				320
Val	Gly	Val	Ile	Asn	Leu	Ser	Phe	Thr	Val	Leu	Ala	Ile	Met	Thr	Val
				325					330					335	
Asp	Lys	Phe	Gly	Arg	Lys	Pro	Leu	Gln	Ile	Ile	Gly	Ala	Leu	Gly	Met
			340					345					350		
Ala	Leu	Gly	Met	Phe	Ser	Leu	Gly	Thr	Ala	Phe	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser
		355					360					365			
Gly	Leu	Ile	Ala	Leu	Leu	Ser	Met	Leu	Phe	Tyr	Val	Ala	Ala	Phe	Ala
	370						375				380				
Met	Ser	Trp	Gly	Pro	Val	Cys	Trp	Val	Leu	Leu	Ala	Glu	Ile	Phe	Pro
385						390					395				400
Asn	Ala	Ile	Arg	Gly	Lys	Ala	Leu	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	Ala	Gln	Trp
				405					410					415	
Leu	Ala	Asn	Tyr	Phe	Val	Ser	Trp	Thr	Phe	Pro	Met	Met	Asp	Lys	Asn
			420					425					430		
Ser	Trp	Leu	Val	Ser	His	Phe	His	Asn	Gly	Phe	Ser	Tyr	Trp	Ile	Tyr
		435					440					445			

Gly Cys Met Gly Ile Leu Ala Ala Leu Phe Met Trp Lys Phe Val Pro
 450 455 460

Glu Thr Lys Gly Lys Thr Leu Glu Glu Leu Glu Glu Leu Trp Glu Pro
 465 470 475 480

Ala Ala Glu Lys Ala Lys Pro Ala Ser Ala Gln
 485 490

<210> 45

<211> 484

<212> PRT

<213> *Acidobacterium capsulatum*

<400> 45

Met Ala Arg Leu Asn Lys Tyr Val Val Phe Leu Ala Leu Ile Ala Thr
 1 5 10 15

Phe Gly Gly Leu Leu Phe Gly Tyr Asp Thr Ala Val Ile Asn Gly Ala
 20 25 30

Val Asp Ser Leu Lys Ala Tyr Phe Ile Asn Pro Arg Phe Ser Asp Leu
 35 40 45

Ala Asn Pro Ala Gln Ala Asp Ala Ala Ser Ser Leu Leu Gly Phe Val
 50 55 60

Val Ser Ser Ala Leu Ile Gly Cys Ile Ile Gly Gly Leu Met Gly Gly
 65 70 75 80

Trp Val Ser Thr Val Ile Gly Arg Lys Arg Gly Leu Val Ile Ala Ala
 85 90 95

Val Leu Phe Leu Ile Ser Ala Leu Gly Ala Ser Ala Pro Glu Phe Pro
 100 105 110

Phe Ala Pro Ile Gly His Gly Gly Pro Ala Tyr Met Trp Asn Phe Val
 115 120 125

Ile Tyr Arg Ile Leu Gly Gly Ile Gly Val Gly Leu Ala Ser Met Leu
 130 135 140

Ser Pro Met Tyr Ile Ala Glu Ile Ala Pro Pro Lys Val Arg Gly Asn
 145 150 155 160

Leu Val Ala Trp Asn Gln Phe Ala Ile Ile Phe Gly Met Leu Val Ile
 165 170 175

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

Val Lys His Phe His His Gly Phe Ala Tyr Trp Ile Tyr Gly Val Met
435 440 445

Ser Ile Leu Ala Ala Leu Phe Val Trp Arg Lys Val Pro Glu Thr Lys
450 455 460

Gly Arg Thr Leu Glu Gln Met Glu Ser Leu Trp Gly Ser Leu Lys Lys
465 470 475 480

Ala Ala Ile Gly

<210> 46

<211> 484

<212> PRT

<213> *Shigella flexneri*

<400> 46

Met Tyr Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Ser Gly Val Lys Val Ile Leu
1 5 10 15

Leu Asn Glu Gln Gly Glu Val Val Ala Ser Gln Thr Glu Lys Leu Thr
20 25 30

Val Ser Arg Pro His Pro Leu Trp Ser Glu Gln Asp Pro Glu Gln Trp
35 40 45

Trp Gln Ala Thr Asp Arg Ala Met Lys Ala Leu Gly Asp Gln His Ser
50 55 60

Leu Gln Asp Val Lys Ala Leu Gly Ile Ala Gly Gln Met His Gly Ala
65 70 75 80

Thr Leu Leu Asp Ala Gln Gln Arg Val Leu Arg Pro Ala Ile Leu Trp
85 90 95

Asn Asp Gly Arg Cys Ala Gln Glu Cys Thr Leu Leu Glu Ala Arg Val
100 105 110

Pro Gln Ser Arg Val Ile Thr Gly Asn Leu Met Met Pro Gly Phe Thr
115 120 125

Ala Pro Lys Leu Leu Trp Val Gln Arg His Glu Pro Glu Ile Phe Arg
130 135 140

Gln Ile Asp Lys Val Leu Leu Pro Lys Asp Tyr Leu Arg Leu Arg Met
145 150 155 160

5

10

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

Arg Thr Gly Gly Asp Val Gly Pro Ala Leu Gly Ala Ala Arg Leu Ala
420 425 430

Gln Ile Ala Ala Asn Pro Glu Lys Ser Leu Ile Glu Leu Leu Pro Gln
435 440 445

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

Tyr Gln Pro Arg Arg Glu Thr Phe Arg Arg Leu Tyr Gln Gln Leu Leu
465 470 475 480

Pro Leu Met Ala

<210> 47

<211> 484

<212> PRT

<213> *Citrobacter rodentium*

<400> 47

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

Leu Asn Glu Gln Gly Glu Val Val Ala Ala Gln Thr Glu Lys Leu Thr
20 25 30

Val Ser Arg Pro His Pro Leu Trp Ser Glu Gln Asp Pro Glu Gln Trp
35 40 45

Trp Leu Ala Thr Asp Arg Ala Val Lys Ala Leu Gly Lys Gln His Ser
50 55 60

Leu Ser Glu Val Lys Ala Leu Gly Ile Ala Gly Gln Met His Gly Ala
65 70 75 80

Thr Leu Leu Asp Asp Gln Gln Arg Val Leu Arg Pro Ala Ile Leu Trp
85 90 95

Asn Asp Gly Arg Cys Gly Glu Glu Cys Ala Leu Leu Glu Ala Gln Ala
100 105 110

Pro Gln Ser Arg Ala Ile Thr Gly Asn Leu Met Met Pro Gly Phe Thr
115 120 125

Ala Pro Lys Leu Leu Trp Val Lys Cys His Glu Pro Glu Ile Phe Arg
130 135 140

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

385 390 395 400

Tyr Trp Arg Gln Met Leu Ala Asp Ile Ser Gly Leu Gln Leu Asp Tyr
405 410 415

Arg Thr Gly Gly Asp Val Gly Pro Ala Leu Gly Ala Ala Arg Leu Ala
420 425 430

Gln Ile Ala Met Asn Pro Glu Lys Pro Leu Ser Asp Leu Leu Pro Gln
435 440 445

Leu Pro Leu Glu Gln Thr His Arg Pro Asp Ala Gln Arg His Ala Asp
450 455 460

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

Pro Leu Met Ser

<210> 48

<211> 356

<212> PRT

<213> *Shigella flexneri*

<400> 48

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

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

<210> 49
 <211> 330

<212> PRT

<213> *Citrobacter koseri*

<400> 49

5

Met Lys Ile Lys Asn Ile Leu Leu Thr Val Cys Thr Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Thr Ser Ile Thr Gly His Ala Lys Glu Val Lys Ile Gly Met Ala Ile
 20 25 30

Asp Asp Leu Arg Leu Glu Arg Trp Gln Lys Asp Arg Asp Ile Phe Val
 35 40 45

Ser Lys Ala Glu Ser Leu Gly Ala Lys Val Phe Val Gln Ser Ala Asn
 50 55 60

Gly Asn Glu Glu Thr Gln Met Ser Gln Ile Glu Asn Met Ile Asn Arg
 65 70 75 80

Gly Val Asp Val Leu Val Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Gln Val Leu Ser
 85 90 95

Asn Val Val Lys Glu Ala Lys Gln Glu Gly Ile Lys Val Leu Ala Tyr
 100 105 110

Asp Arg Met Ile Asn Asp Ala Asp Ile Asp Phe Tyr Ile Ser Phe Asp
 115 120 125

Asn Glu Lys Val Gly Glu Leu Gln Ala Gln Ala Leu Val Asp Lys Val
 130 135 140

Pro Glu Gly Asn Tyr Phe Leu Met Gly Gly Ser Pro Val Asp Asn Asn
 145 150 155 160

Ala Lys Leu Phe Arg Ala Gly Gln Met Lys Val Leu Lys Pro Tyr Ile
 165 170 175

Asp Ser Gly Lys Ile Asn Val Val Gly Asp Gln Trp Val Asp Gly Trp
 180 185 190

Leu Pro Glu Asn Ala Leu Lys Ile Met Glu Asn Ala Leu Thr Ala Asn
 195 200 205

Asn Asn Lys Ile Asp Ala Val Val Ala Ser Asn Asp Ala Thr Ala Gly
 210 215 220

Gly Ala Ile Gln Ala Leu Ser Ala Gln Gly Leu Ser Gly Lys Val Ala
225 230 235 240

Ile Ser Gly Gln Asp Ala Asp Leu Ala Gly Ile Lys Arg Ile Val Ala
245 250 255

Gly Thr Gln Thr Met Thr Val Tyr Lys Pro Ile Thr Leu Leu Ala Asn
260 265 270

Thr Ala Ala Glu Ile Ala Val Glu Leu Gly Asn Gly Gln Gln Pro Lys
275 280 285

Ala Asp Ala Thr Leu Asn Asn Gly Leu Lys Asp Val Pro Ser Arg Leu
290 295 300

Leu Thr Pro Ile Asp Val Asn Lys Thr Asn Ile Asp Glu Thr Val Ile
305 310 315 320

Lys Asp Gly Phe His Lys Lys Ser Asp Leu
325 330

<210> 50
<211> 513
<212> PRT
<213> *Shigella boydii*
<400> 50

Met Pro Tyr Leu Leu Glu Met Lys Asn Ile Thr Lys Thr Phe Gly Ser
1 5 10 15

Val Lys Ala Ile Asp Asn Val Ser Leu Arg Leu Asn Ala Gly Glu Ile
20 25 30

Val Ser Leu Cys Gly Glu Asn Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Met Lys
35 40 45

Val Leu Cys Gly Ile Tyr Pro His Gly Ser Tyr Glu Gly Glu Ile Ile
50 55 60

Phe Ala Gly Glu Glu Ile Gln Ala Ser His Ile Arg Asp Thr Glu Arg
65 70 75 80

Lys Gly Ile Ala Ile Ile His Gln Glu Leu Ala Leu Val Lys Glu Leu
85 90 95

Thr Val Leu Glu Asn Ile Phe Leu Gly Asn Glu Ile Thr His Asn Gly
100 105 110

5

10

Ile Met Asp Tyr Asp Leu Met Thr Leu Arg Cys Gln Lys Leu Leu Ala
 115 120 125

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

Leu Gly Gln Gln Gln Leu Val Glu Ile Ala Lys Ala Leu Asn Lys Gln
 145 150 155 160

Val Arg Leu Leu Ile Leu Asp Glu Pro Thr Ala Ser Leu Thr Glu Gln
 165 170 175

Glu Thr Ser Val Leu Leu Asp Ile Ile Arg Asp Leu Gln Gln His Gly
 180 185 190

Ile Ala Cys Ile Tyr Ile Ser His Lys Leu Asn Glu Val Lys Ala Ile
 195 200 205

Ser Asp Thr Ile Cys Val Ile Arg Asp Gly Gln His Ile Gly Thr Arg
 210 215 220

Asp Ala Ala Gly Met Ser Glu Asp Asp Ile Ile Thr Met Met Val Gly
 225 230 235 240

Arg Glu Leu Thr Ala Leu Tyr Pro Asn Glu Pro His Thr Thr Gly Asp
 245 250 255

Glu Ile Leu Arg Ile Glu His Leu Thr Ala Trp His Pro Val Asn Arg
 260 265 270

His Ile Lys Arg Val Asn Asp Val Ser Phe Ser Leu Lys Arg Gly Glu
 275 280 285

Ile Leu Gly Ile Ala Gly Leu Val Gly Ala Gly Arg Thr Glu Thr Ile
 290 295 300

Gln Cys Leu Phe Gly Val Trp Pro Gly Gln Trp Glu Gly Lys Ile Tyr
 305 310 315 320

Ile Asp Gly Lys Gln Val Asp Ile Arg Asn Cys Gln Gln Ala Ile Ala
 325 330 335

Gln Gly Ile Ala Met Val Pro Glu Asp Arg Lys Arg Asp Gly Ile Val
 340 345 350

Pro Val Met Ala Val Gly Lys Asn Ile Thr Leu Ala Ala Leu Asn Lys
 355 360 365

Phe Thr Gly Gly Ile Ser Gln Leu Asp Asp Ala Ala Glu Gln Lys Cys
370 375 380

Ile Leu Glu Ser Ile Gln Gln Leu Lys Val Lys Thr Ser Ser Pro Asp
385 390 395 400

Leu Ala Ile Gly Arg Leu Ser Gly Gly Asn Gln Gln Lys Ala Ile Leu
405 410 415

Ala Arg Cys Leu Leu Leu Asn Pro Arg Ile Leu Ile Leu Asp Glu Pro
420 425 430

Thr Arg Gly Ile Asp Ile Gly Val Lys Tyr Glu Ile Tyr Lys Leu Ile
435 440 445

Asn Gln Leu Val Gln Gln Gly Ile Ala Val Ile Val Ile Ser Ser Glu
450 455 460

Leu Pro Glu Val Leu Gly Leu Ser Asp Arg Val Leu Val Met His Glu
465 470 475 480

Gly Lys Leu Lys Ala Asn Leu Ile Asn His Asn Leu Thr Gln Glu Gln
485 490 495

Val Met Glu Ala Ala Leu Arg Ser Glu His His Val Glu Lys Gln Ser
500 505 510

Val

<210> 51

<211> 513

<212> PRT

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 51

Met Ala Trp Leu Leu Glu Met Lys Asn Ile Thr Lys Thr Phe Gly Ala
1 5 10 15

Val Lys Ala Val Asp Asn Val Ser Leu Arg Leu Asn Ala Gly Glu Val
20 25 30

Val Ser Leu Cys Gly Glu Asn Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Met Lys
35 40 45

Val Leu Cys Gly Ile Tyr Pro His Gly Ser Tyr Glu Gly Glu Ile Ile
50 55 60

5

10

Phe Ala Gly Glu Thr Leu Gln Ala Asn His Ile Arg Asp Thr Glu Arg
 65 70 75 80
 Lys Gly Ile Ala Ile Ile His Gln Glu Leu Ala Leu Val Lys His Leu
 85 90 95
 Thr Val Leu Glu Asn Ile Phe Leu Gly Ala Glu Ile Ser Arg His Gly
 100 105 110
 Leu Leu Asp Tyr Glu Thr Met Thr Leu Arg Cys Gln Lys Leu Leu Ala
 115 120 125
 Gln Val Asn Leu Pro Ile Ser Pro Asp Thr Arg Val Gly Asp Leu Gly
 130 135 140
 Leu Gly Gln Gln Gln Leu Val Glu Ile Ala Lys Ala Leu Asn Lys Gln
 145 150 155 160
 Val Arg Leu Leu Ile Leu Asp Glu Pro Thr Ala Ser Leu Thr Glu Gln
 165 170 175
 Glu Thr Ala Thr Leu Leu Thr Ile Ile Arg Asp Leu Gln Asn His Gly
 180 185 190
 Ile Ala Cys Ile Tyr Ile Ser His Lys Leu Asn Glu Val Lys Ala Ile
 195 200 205
 Ser Asp Thr Ile Cys Val Ile Arg Asp Gly Gln His Ile Gly Thr Arg
 210 215 220
 Asp Ala Ser Gly Met Ser Glu Asp Asp Ile Ile Thr Met Met Val Gly
 225 230 235 240
 Arg Glu Leu Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Glu Pro His Ala His Gly Glu
 245 250 255
 Glu Ile Leu Arg Val Glu His Leu Thr Ala Trp His Pro Val Asn Arg
 260 265 270
 His Ile Lys Arg Val Asn Asp Val Ser Phe Ser Leu Arg Arg Gly Glu
 275 280 285
 Ile Leu Gly Ile Ala Gly Leu Val Gly Ala Gly Arg Thr Glu Ala Val
 290 295 300
 Gln Cys Leu Phe Gly Val Trp Pro Gly Arg Trp Gln Gly Glu Ile Phe
 305 310 315 320

Ile Asp Gly Gln Pro Val Ser Ile Ser Asn Cys Gln Gln Ala Ile Ala
325 330 335

His Gly Ile Ala Met Val Pro Glu Asp Arg Lys Lys Asp Gly Ile Val
340 345 350

Pro Val Met Ala Val Gly Lys Asn Ile Thr Leu Ala Ala Leu Asn Gln
355 360 365

Phe Thr Gly Ala Met Ser Ser Leu Asp Asp Ala Ala Glu Gln His Cys
370 375 380

Ile Gln Gln Ser Ile Gln Arg Leu Lys Ile Lys Thr Ser Ser Pro Glu
385 390 395 400

Leu Ala Ile Gly Arg Leu Ser Gly Gly Asn Gln Gln Lys Ala Ile Leu
405 410 415

Ala Arg Cys Leu Leu Leu Asn Pro Arg Ile Leu Ile Leu Asp Glu Pro
420 425 430

Thr Arg Gly Ile Asp Ile Gly Ala Lys Tyr Glu Ile Tyr Lys Leu Ile
435 440 445

Asn Gln Leu Val Gln Gln Gly Ile Ala Val Ile Val Ile Ser Ser Glu
450 455 460

Leu Pro Glu Val Leu Gly Leu Ser Asp Arg Val Leu Val Met His Glu
465 470 475 480

Gly Arg Leu Lys Ala Asn Leu Val Asn Gln His Leu Thr Gln Glu Gln
485 490 495

Val Met Glu Ala Ala Leu Arg Ser Glu Arg His Val Glu Glu His Val
500 505 510

Val

<210> 52

<211> 393

<212> PRT

<213> *Citrobacter koseri*

<400> 52

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

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

ES 2 571 757 T3

	260		265		270
Gly Asn Leu Glu Ala Ala Arg Leu Ser Gly Ile Asn Val Glu Arg Thr	275		280		285
Lys Leu Ala Val Phe Ala Ile Asn Gly Leu Met Val Ala Ile Ala Gly	290		295		300
Leu Ile Leu Ser Ser Arg Leu Gly Ala Gly Ser Pro Ser Ala Gly Asn	305		310		315
Ile Ala Glu Leu Asp Ala Ile Ala Ala Cys Val Ile Gly Gly Thr Ser		325		330	335
Leu Ala Gly Gly Val Gly Ser Val Ala Gly Ala Val Met Gly Ala Phe		340		345	350
Ile Met Ala Ser Leu Asp Asn Gly Met Ser Met Met Asp Val Pro Thr		355		360	365
Phe Trp Gln Tyr Ile Val Lys Gly Ala Ile Leu Leu Leu Ala Val Trp		370		375	380
Met Asp Ser Ala Thr Lys Arg Arg Ser	385		390		

<210> 53
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> *Shigella dysenteriae*
 <400> 53

ES 2 571 757 T3

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

Gly Gly Phe Ser Gly Leu Lys Ser Leu Asn Leu Gln Val Phe Val Met
20 25 30

Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ile Met Leu Phe Phe Thr Trp Thr Thr Asp
35 40 45

Gly Ala Tyr Leu Ser Ala Arg Asn Val Ser Asn Leu Leu His Gln Thr
50 55 60

Ala Ile Thr Gly Ile Leu Ala Val Gly Met Val Phe Val Ile Ile Ser
65 70 75 80

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

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

ES 2 571 757 T3

Leu Ala Gly Gly Val Gly Ser Val Ala Gly Ala Val Met Gly Ala Phe
340 345 350

Ile Met Ala Ser Leu Asp Asn Gly Met Ser Met Met Asp Val Pro Thr
355 360 365

Phe Trp Gln Tyr Ile Val Lys Gly Ala Ile Leu Leu Leu Ala Val Trp
370 375 380

Met Asp Ser Ala Thr Lys Arg Arg Ser
385 390

<210> 54

<211> 393

<212> PRT

<213> *Enterobacter cloacae*

<400> 54

5

ES 2 571 757 T3

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

Thr Val Ser Pro Thr Ser Ala Ala Met Ser Gln Ile Gly Gln Ser Tyr
 165 170 175

Leu Ser Asp Ser Met Gly Phe Thr Ile Gly Val Val Gly Leu Leu Ala
 180 185 190

Phe Val Val Trp Gln Trp Arg Gly Arg Met Arg Arg Gln Ser Leu Gly
 195 200 205

Leu Ala Ser Ser Pro Ser Thr Ser Val Val Gly Arg Gln Ala Leu Thr
 210 215 220

Ala Val Ile Val Leu Gly Ala Ile Trp Leu Leu Asn Asp Tyr Arg Gly
 225 230 235 240

Val Pro Thr Pro Val Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Gly Gly Met
 245 250 255

Phe Met Ala Thr Arg Thr Ala Phe Gly Arg Arg Ile Tyr Ala Ile Gly
 260 265 270

Gly Asn Leu Glu Ala Ala Arg Leu Ser Gly Ile Asn Val Glu Arg Thr
 275 280 285

Lys Leu Ala Val Phe Ala Ile Asn Gly Leu Met Val Ala Ile Ala Gly
 290 295 300

Leu Ile Leu Ser Ser Arg Leu Gly Ala Gly Ser Pro Ser Ala Gly Asn
 305 310 315 320

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

Leu Ala Gly Gly Val Gly Ser Val Ala Gly Ala Val Met Gly Ala Phe
 340 345 350

Ile Met Ala Ser Leu Asp Asn Gly Met Ser Met Met Asp Val Pro Thr
 355 360 365

Phe Trp Gln Tyr Ile Val Lys Gly Ala Ile Leu Leu Leu Ala Val Trp
 370 375 380

Met Asp Ser Ala Thr Lys Arg Arg Thr
 385 390

5
<210> 55
<211> 321
<212> PRT
<213> *Shigella dysenteriae*

<400> 55

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

Met Gly Arg Phe Gly Gly Asn Leu Ala Leu Asn Leu Gly Thr Phe Gly
245 250 255

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

Lys Ala Ser Gly Phe Arg Ala Ala Phe Glu Asp Lys Gly Arg Phe Lys
275 280 285

Glu Tyr Val His Asp Ile Pro Val Tyr Leu Ile Val His Asp Asn Pro
290 295 300

Gly Leu Leu Gly Ser Gly Ala His Leu Arg Gln Thr Leu Gly His Ile
305 310 315 320

Leu

<210> 56

<211> 321

<212> PRT

<213> *Escherichia fergusonii*

<400> 56

Met Thr Lys Tyr Ala Leu Val Gly Asp Val Gly Gly Thr Asn Ala Arg
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Asp Ile Ala Ser Gly Glu Ile Ser Gln Ala Lys Thr
20 25 30

Tyr Ser Gly Leu Asp Tyr Pro Ser Leu Glu Ala Val Ile Arg Val Tyr
35 40 45

Leu Glu Glu His Asn Val Glu Val Gln Asp Gly Cys Ile Ala Ile Ala
50 55 60

Cys Pro Ile Thr Gly Asp Trp Val Ala Met Thr Asn His Thr Trp Ala
65 70 75 80

Phe Ser Ile Ala Glu Met Lys Lys Asn Leu Gly Phe Ser His Leu Glu
85 90 95

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

Lys Glu His Leu Ile Gln Phe Gly Gly Ala Glu Pro Val Glu Gly Lys
115 120 125

Pro Ile Ala Val Tyr Gly Ala Gly Thr Gly Leu Gly Val Ala His Leu
130 135 140

Val His Val Asp Lys Arg Trp Val Ser Leu Pro Gly Glu Gly Gly His
145 150 155 160

Val Asp Phe Ala Pro Asn Ser Glu Glu Glu Gly Ile Ile Leu Glu Ile
165 170 175

Leu Arg Ala Glu Ile Gly His Val Ser Ala Glu Arg Val Leu Ser Gly
180 185 190

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

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

Asp Ser Cys Thr Asp Cys Arg Arg Ala Leu Ser Leu Phe Cys Val Ile
225 230 235 240

Met Gly Arg Phe Gly Gly Asn Leu Ala Leu Thr Leu Gly Thr Phe Gly
245 250 255

Gly Val Tyr Ile Ala Gly Gly Ile Val Pro Arg Phe Leu Glu Phe Phe
260 265 270

Lys Ala Ser Gly Phe Arg Ala Ala Phe Glu Asp Lys Gly Arg Phe Lys
275 280 285

Glu Tyr Val His Asp Ile Pro Val Tyr Leu Ile Val His Asp Asn Pro
290 295 300

Gly Leu Leu Gly Ser Gly Ala His Leu Arg Gln Thr Leu Gly His Ile
305 310 315 320

Leu

<210> 57
<211> 371
5 <212> PRT
<213> *Shigella dysenteriae*
<400> 57

Met Tyr Lys Asn Gly Gly Arg Tyr Gln Arg Ser Val Arg Asn Pro Lys
1 5 10 15

Gln Ser Arg Leu Ala Ile Thr Val Leu Ser Ala Val Ala Leu Thr Leu
 20 25 30

Arg Arg Asp Ile Ile Arg Ala Asp Arg Leu His Pro Leu Thr Ser Cys
 35 40 45

Leu Lys Arg Asn Thr Ile Met Thr Asp Lys Leu Thr Ser Leu Arg Gln
 50 55 60

Tyr Thr Thr Val Val Ala Asp Thr Gly Asp Ile Ala Ala Met Lys Leu
 65 70 75 80

Tyr Gln Pro Gln Asp Ala Thr Thr Asn Pro Ser Leu Ile Leu Asn Ala
 85 90 95

Ala Gln Ile Pro Glu Tyr Arg Lys Leu Ile Asp Asp Ala Val Ala Trp
 100 105 110

Ala Lys Gln Gln Ser Asn Asp Arg Ala Gln Gln Ile Val Asp Ala Thr
 115 120 125

Asp Lys Leu Ala Val Asn Ile Gly Leu Glu Ile Leu Lys Leu Val Pro
 130 135 140

Gly Arg Ile Ser Thr Glu Val Asp Ala Arg Leu Ser Tyr Asp Thr Glu
 145 150 155 160

Ala Ser Ile Ala Lys Ala Lys Arg Leu Ile Lys Leu Tyr Asn Asp Ala
 165 170 175

Gly Ile Ser Asn Asp Arg Ile Leu Ile Lys Leu Ala Ser Thr Trp Gln
 180 185 190

Gly Ile Arg Ala Ala Glu Gln Leu Glu Lys Glu Gly Ile Asn Cys Asn
 195 200 205

Leu Thr Leu Leu Phe Ser Phe Ala Gln Ala Arg Ala Cys Ala Glu Ala
 210 215 220

Gly Val Phe Leu Ile Ser Pro Phe Val Gly Arg Ile Leu Asp Trp Tyr
 225 230 235 240

Lys Ala Asn Thr Asp Lys Lys Glu Tyr Ala Pro Ala Glu Asp Pro Gly
 245 250 255

Val Val Ser Val Ser Glu Ile Tyr Gln Tyr Tyr Lys Glu His Gly Tyr
 260 265 270

Glu Thr Val Val Met Gly Ala Ser Phe Arg Asn Ile Gly Glu Ile Leu
275 280 285

Glu Leu Ala Gly Cys Asp Arg Leu Thr Ile Ala Pro Ala Leu Leu Lys
290 295 300

Glu Leu Ala Glu Ser Glu Gly Ala Ile Glu Arg Lys Leu Ser Tyr Thr
305 310 315 320

Gly Glu Val Lys Ala Arg Pro Ala Arg Ile Thr Glu Ser Glu Phe Leu
325 330 335

Trp Gln His Asn Gln Asp Pro Met Ala Val Asp Lys Leu Ala Glu Gly
340 345 350

Ile Arg Lys Phe Ala Ile Asp Gln Glu Lys Leu Glu Lys Met Ile Gly
355 360 365

Asp Leu Leu
370

<210> 58

<211> 317

<212> PRT

<213> *Escherichia fergusonii*

<400> 58

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

Asp Thr Gly Asp Ile Ala Ala Met Lys Leu Tyr Gln Pro Gln Asp Ala
20 25 30

Thr Thr Asn Pro Ser Leu Ile Leu Asn Ala Ala Gln Ile Pro Glu Tyr
35 40 45

Arg Lys Leu Ile Asp Asp Ala Val Ala Trp Ala Lys Gln Gln Ser Ser
50 55 60

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

Ile Gly Leu Glu Ile Leu Lys Leu Val Pro Gly Arg Ile Ser Thr Glu
85 90 95

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

Lys Arg Leu Ile Lys Leu Tyr Asn Asp Ala Gly Ile Ser Asn Asp Arg
115 120 125

Ile Leu Ile Lys Leu Ala Ser Thr Trp Gln Gly Ile Arg Ala Ala Glu
130 135 140

Gln Leu Glu Lys Glu Gly Ile Asn Cys Asn Leu Thr Leu Leu Phe Ser
145 150 155 160

Phe Ala Gln Ala Arg Ala Cys Ala Glu Ala Gly Val Tyr Leu Ile Ser
165 170 175

Pro Phe Val Gly Arg Ile Leu Asp Trp Tyr Lys Ala Asn Thr Asp Lys
180 185 190

Lys Glu Tyr Ala Pro Ala Glu Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Glu
195 200 205

Ile Tyr Gln Tyr Tyr Lys Glu His Gly Tyr Glu Thr Val Val Met Gly
210 215 220

Ala Ser Phe Arg Asn Met Gly Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gly Cys Asp
225 230 235 240

Arg Leu Thr Ile Ala Pro Ala Leu Leu Lys Glu Leu Ala Glu Ser Glu
245 250 255

Gly Ala Val Glu Arg Lys Leu Ser Phe Ser Gly Glu Val Lys Ala Arg
260 265 270

Pro Glu Arg Ile Thr Glu Ser Glu Phe Leu Trp Gln His Asn Gln Asp
275 280 285

Pro Met Ala Val Asp Lys Leu Ala Asp Gly Ile Arg Lys Phe Ala Val
290 295 300

Asp Gln Glu Lys Leu Glu Lys Met Ile Gly Glu Leu Leu
305 310 315

<210> 59
<211> 673
<212> PRT
<213> *Shigella dysenteriae*

<400> 59

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

Leu Ala Asn Ala Ile Arg Ala Leu Ser Met Asp Ala Val Gln Lys Ala
 20 25 30

Lys Ser Gly His Pro Gly Ala Pro Met Gly Met Ala Asp Ile Ala Glu
 35 40 45

Val Leu Trp Arg Asp Phe Leu Lys His Asn Pro Gln Asn Pro Ser Trp
 50 55 60

Ala Asp Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Asn Gly His Gly Ser Met Leu
 65 70 75 80

Ile Tyr Ser Leu Leu His Leu Thr Gly Tyr Asp Leu Pro Met Glu Glu
 85 90 95

Leu Lys Asn Phe Arg Gln Leu His Ser Lys Thr Pro Gly His Pro Glu
 100 105 110

Val Gly Tyr Thr Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Gly Pro Leu Gly Gln
 115 120 125

Gly Ile Ala Asn Ala Val Gly Met Ala Ile Ala Glu Lys Thr Leu Ala
 130 135 140

Ala Gln Phe Asn Arg Pro Gly His Asp Ile Val Asp His Tyr Thr Tyr
 145 150 155 160

Ala Phe Met Gly Asp Gly Cys Met Met Glu Gly Ile Ser His Glu Val
 165 170 175

Cys Ser Leu Ala Gly Thr Leu Lys Leu Gly Lys Leu Ile Ala Phe Tyr
 180 185 190

Asp Asp Asn Gly Ile Ser Ile Asp Gly His Val Glu Gly Trp Phe Thr
 195 200 205

Asp Asp Thr Ala Met Arg Phe Glu Ala Tyr Gly Trp His Val Ile Arg
 210 215 220

Asp Ile Asp Gly His Asp Ala Ala Ser Ile Lys Arg Ala Val Glu Glu
 225 230 235 240

Ala Arg Ala Val Thr Asp Lys Pro Ser Leu Leu Met Cys Lys Thr Ile
 245 250 255

Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Lys Ala Gly Thr His Asp Ser His Gly

					260						265					270
Ala	Pro	Leu	Gly	Asp	Ala	Glu	Ile	Ala	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Leu	Gly	
		275					280					285				
Trp	Lys	Tyr	Ala	Pro	Phe	Glu	Ile	Pro	Ser	Glu	Ile	Tyr	Ala	Gln	Trp	
	290					295					300					
Asp	Ala	Lys	Glu	Ala	Gly	Gln	Ala	Lys	Glu	Ser	Ala	Trp	Asn	Glu	Lys	
305					310					315					320	
Phe	Ala	Ala	Tyr	Ala	Lys	Ala	Tyr	Pro	Gln	Glu	Ala	Ala	Glu	Phe	Thr	
				325					330					335		
Arg	Arg	Met	Lys	Gly	Glu	Met	Pro	Ser	Asp	Phe	Asp	Ala	Lys	Ala	Lys	
			340					345					350			
Glu	Phe	Ile	Ala	Lys	Leu	Gln	Ala	Asn	Pro	Ala	Lys	Ile	Ala	Ser	Arg	
		355					360					365				
Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Ala	Ile	Glu	Ala	Phe	Gly	Pro	Leu	Leu	Pro	Glu	
	370					375					380					
Phe	Leu	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Leu	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Thr	Leu	Trp	
385					390					395					400	
Ser	Gly	Ser	Lys	Ala	Ile	Asn	Glu	Asp	Ala	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ile	His	
				405					410					415		
Tyr	Gly	Val	Arg	Glu	Phe	Gly	Met	Thr	Ala	Ile	Ala	Asn	Gly	Ile	Ser	
			420					425					430			
Leu	His	Gly	Gly	Phe	Leu	Pro	Tyr	Thr	Ser	Thr	Phe	Leu	Met	Phe	Val	
		435					440					445				
Glu	Tyr	Ala	Arg	Asn	Ala	Val	Arg	Met	Ala	Ala	Leu	Met	Lys	Gln	Arg	
	450					455					460					
Gln	Val	Met	Val	Tyr	Thr	His	Asp	Ser	Ile	Gly	Leu	Gly	Glu	Asp	Gly	
465					470					475					480	
Pro	Thr	His	Gln	Pro	Val	Glu	Gln	Val	Ala	Ser	Leu	Arg	Val	Thr	Pro	
				485					490					495		
Asn	Met	Ser	Thr	Trp	Arg	Pro	Cys	Asp	Gln	Val	Glu	Ser	Ala	Val	Ala	
			500					505					510			

Trp Lys Tyr Gly Val Glu Arg Gln Asp Gly Pro Thr Ala Leu Ile Leu
515 520 525

Ser Arg Gln Asn Leu Ala Gln Gln Glu Arg Thr Glu Glu Gln Leu Ala
530 535 540

Asn Ile Ala Arg Gly Gly Tyr Val Leu Lys Asp Cys Ala Gly Gln Pro
545 550 555 560

Glu Leu Ile Phe Ile Ala Thr Gly Ser Glu Val Glu Leu Ala Val Ala
565 570 575

Ala Tyr Glu Lys Leu Thr Ala Glu Gly Val Lys Ala Arg Val Val Ser
580 585 590

Met Pro Ser Thr Asp Ala Phe Asp Lys Gln Asp Ala Ala Tyr Arg Glu
595 600 605

Ser Val Leu Pro Lys Ala Val Thr Ala Arg Val Ala Val Glu Ala Gly
610 615 620

Ile Ala Asp Tyr Trp Tyr Lys Tyr Val Gly Leu Asn Gly Ala Ile Val
625 630 635 640

Gly Met Thr Thr Phe Gly Glu Ser Ala Pro Ala Glu Leu Leu Phe Glu
645 650 655

Glu Phe Gly Phe Thr Val Asp Asn Val Val Ala Lys Ala Lys Glu Leu
660 665 670

Leu

<210> 60

<211> 663

<212> PRT

<213> *Escherichia fergusonii*

<400> 60

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

Asp Ala Val Gln Lys Ala Lys Ser Gly His Pro Gly Ala Pro Met Gly
20 25 30

Met Ala Asp Ile Ala Glu Val Leu Trp Arg Asp Phe Leu Lys His Asn
35 40 45

Pro Gln Asn Pro Ser Trp Ala Asp Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Asn
50 55 60

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

Asp Leu Pro Met Glu Glu Leu Lys Asn Phe Arg Gln Leu His Ser Lys
85 90 95

Thr Pro Gly His Pro Glu Val Gly Tyr Thr Ala Gly Val Glu Thr Thr
100 105 110

Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ile Ala Asn Ala Val Gly Met Ala Ile
115 120 125

Ala Glu Lys Thr Leu Ala Ala Gln Phe Asn Arg Pro Gly His Asp Ile
130 135 140

Val Asp His Tyr Thr Tyr Ala Phe Met Gly Asp Gly Cys Met Met Glu
145 150 155 160

Gly Ile Ser His Glu Val Cys Ser Leu Ala Gly Thr Leu Lys Leu Gly
165 170 175

Lys Leu Ile Ala Phe Tyr Asp Asp Asn Gly Ile Ser Ile Asp Gly His
180 185 190

Val Glu Gly Trp Phe Thr Asp Asp Thr Ala Met Arg Phe Glu Ala Tyr
195 200 205

Gly Trp His Val Ile Arg Gly Ile Asp Gly His Asp Ala Ala Ser Ile
210 215 220

Lys Arg Ala Val Glu Glu Ala Arg Ala Val Thr Asp Lys Pro Ser Leu
225 230 235 240

Leu Met Cys Lys Thr Ile Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Lys Ala Gly
245 250 255

Thr His Asp Ser His Gly Ala Pro Leu Gly Asp Ala Glu Ile Ala Leu
260 265 270

Thr Arg Glu Gln Leu Gly Trp Lys Tyr Ala Pro Phe Glu Ile Pro Ser
275 280 285

Glu Ile Tyr Ala Gln Trp Asp Ala Lys Glu Ala Gly Gln Ala Lys Glu
290 295 300

Ser Ala Trp Asn Glu Lys Phe Ala Ala Tyr Ala Lys Ala Tyr Pro Gln
305 310 315 320

Glu Ala Ala Glu Phe Thr Arg Arg Met Lys Gly Glu Met Pro Ser Asp
325 330 335

Phe Asp Ala Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Lys Leu Gln Ala Asn Pro
340 345 350

Ala Lys Ile Ala Ser Arg Lys Ala Ser Gln Asn Ala Ile Glu Ala Phe
355 360 365

Gly Pro Leu Leu Pro Glu Phe Leu Gly Gly Ser Ala Asp Leu Ala Pro
370 375 380

Ser Asn Leu Thr Leu Trp Ser Gly Ser Lys Ala Ile Asn Glu Asp Ala
385 390 395 400

Ala Gly Asn Tyr Ile His Tyr Gly Val Arg Glu Phe Gly Met Thr Ala
405 410 415

Ile Ala Asn Gly Ile Ser Leu His Gly Gly Phe Leu Pro Tyr Thr Ser
420 425 430

Thr Phe Leu Met Phe Val Glu Tyr Ala Arg Asn Ala Val Arg Met Ala
435 440 445

Ala Leu Met Lys Gln Arg Gln Val Met Val Tyr Thr His Asp Ser Ile
450 455 460

Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Val Glu Gln Val Ala
465 470 475 480

Ser Leu Arg Val Thr Pro Asn Met Ser Thr Trp Arg Pro Cys Asp Gln
485 490 495

Val Glu Ser Ala Val Ala Trp Lys Tyr Gly Val Glu Arg Gln Asp Gly
500 505 510

Pro Thr Ala Leu Ile Leu Ser Arg Gln Asn Leu Ala Gln Gln Glu Arg
515 520 525

Thr Glu Glu Gln Leu Ala Asn Ile Ala Arg Gly Gly Tyr Val Leu Lys
530 535 540

Asp Cys Ala Gly Gln Pro Glu Leu Ile Phe Ile Ala Thr Gly Ser Glu
545 550 555 560

ES 2 571 757 T3

Val Glu Leu Ala Val Ala Ala Tyr Glu Lys Leu Thr Ala Glu Gly Val
565 570 575

Lys Ala Arg Val Val Ser Met Pro Ser Thr Asp Ala Phe Asp Lys Gln
580 585 590

Asp Ala Ala Tyr Arg Glu Ser Val Leu Pro Lys Ala Val Thr Ala Arg
595 600 605

Val Ala Val Glu Ala Gly Ile Ala Asp Tyr Trp Tyr Lys Tyr Val Gly
610 615 620

Leu Asn Gly Ala Ile Ile Gly Met Asn Thr Phe Gly Glu Ser Ala Pro
625 630 635 640

Ala Glu Gln Leu Phe Glu Glu Phe Gly Phe Thr Val Asp Asn Val Val
645 650 655

Ala Lys Ala Lys Ala Leu Leu
660

<210> 61
<211> 51
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 61
ggtaccaagg aaggactgat catgagttct gaaagtagtc agggcttagt c 51

<210> 62
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 62
ctgcagctac ttctgggagc gccacatc 28

<210> 63
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 63
ctgcagaagg aaggactgat cgtgcgtata ggtatcgatt taggcg 46

<210> 64
<211> 30
<212> ADN

	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido		
5	<400> 64 tctagattac tcttgtggcc ataaccacgc	30	
	<210> 65		
10	<211> 51 <212> ADN <213> Artificial		
	<220>		
15	<223> oligonucleótido		
	<400> 65 tctagaagg aaggtcgact catgcaaaaa ctcatctact cagtgcacaa c	51	
20	<210> 66 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial		
25	<220>		
	<223> oligonucleótido		
	<400> 66 gagctcttac agctgtgtgt aaacacgcgc taaac	35	
30	<210> 67 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial		
35	<220>		
	<223> oligonucleótido		
40	<400> 67 gttctatcga ttgggttaac gccagtgg	28	
	<210> 68 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial		
45	<220>		
	<223> oligonucleótido		
50	<400> 68 ggaacatctg cgggtcataa tacagc	26	
	<210> 69 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial		
55	<220>		
	<223> oligonucleótido		
60	<400> 69 gagaggttgc agcggaagt g	21	
	<210> 70 <211> 27 <212> ADN		
65			

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
5	<400> 70 aatttcactg ccttcagcg catgtcc	27
	<210> 71	
10	<211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> oligonucleótido	
	<400> 71 cgctgacgcc ttcctgcg at	22
20	<210> 72 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 72 gcggtgttc agcgaacagg aaca	24
30	<210> 73 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 73 cgactacta tagggagagc ggc	23
40	<210> 74 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> oligonucleótido	
50	<400> 74 aagaacatcg atttccatg gcag	24
	<210> 75 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> oligonucleótido	
60	<400> 75 gtaaaacgac ggccagt	17
	<210> 76 <211> 25 <212> ADN	
65		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
5	<400> 76 ctcgagccgg aattgccagc tgggg	25
	<210> 77	
10	<211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> oligonucleótido	
	<400> 77 catatgaaac gatcctcatc ctgtctcttg	30
20	<210> 78 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
25	<223> oligonucleótido	
	<400> 78 catatgacaa agtatgcatt agtcggtgat gtggg	35
30	<210> 79 <211> 42 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 79 gtcgacttac agaattgtgac ctaaggctcg gcgtaaatgt gc	42
40	<210> 80 <211> 52 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> oligonucleótido	
50	<400> 80 ggatccatga ggatcggttc gcatgagttc tgaaagtagt cagggtctag tc	52
	<210> 81 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> oligonucleótido	
60	<400> 81 gagctctac ttctgggagc gccacatctc ctcg	34
	<210> 82 <211> 45 <212> ADN	
65		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
5	<400> 82 attagggccc aaggaggta cagcatgcaa gcctatttg accag	45
10	<210> 83 <211> 31 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> oligonucleótido	
	<400> 83 attgccggg ttattgtcg aacagataat g	31
20	<210> 84 <211> 45 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido	
30	<400> 84 attgccggg aaggaggta cagcatgtat atcgggatag atctt	45
35	<210> 85 <211> 31 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido	
40	<400> 85 cccgactagt ttacgccatt aatggcagaa g	31
45	<210> 86 <211> 44 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido	
50	<400> 86 cccgactagt aaggaggta cagcatgaat acccagtata attc	44
55	<210> 87 <211> 31 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> oligonucleótido	
	<400> 87 attgccgcg ttacagcgta gcagtttgtt g	31
65	<210> 88 <211> 46 <212> ADN	

	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido		
5	<400> 88 cccgactagt aaggaggcta cagcatgaaa ataaagaaca ttctac	46	
	<210> 89		
10	<211> 30 <212> ADN <213> Artificial		
	<220>		
15	<223> oligonucleótido		
	<400> 89 attgccgcgg tcaagaacgg cgtttggtg	30	
20	<210> 90 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial		
	<220>		
25	<223> oligonucleótido		
	<400> 90 aaaaccgcgg cggctcggaa gtcg	24	
30	<210> 91 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial		
35	<220>		
	<223> oligonucleótido		
	<400> 91 cgactacta tagggagagc ggc	23	
40	<210> 92 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial		
45	<220>		
	<223> oligonucleótido		
50	<400> 92 aagaacatcg atttccatg gcag	24	
	<210> 93 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial		
55	<220>		
	<223> oligonucleótido		
60	<400> 93 gtaaaacgac ggccagt	17	
	<210> 94 <211> 17 <212> ADN		
65			

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
5	<400> 94	
	gtaaaacgac ggccagt	17
10	<210> 95	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 95	
	aacagctatg accatg	16
20		

REIVINDICACIONES

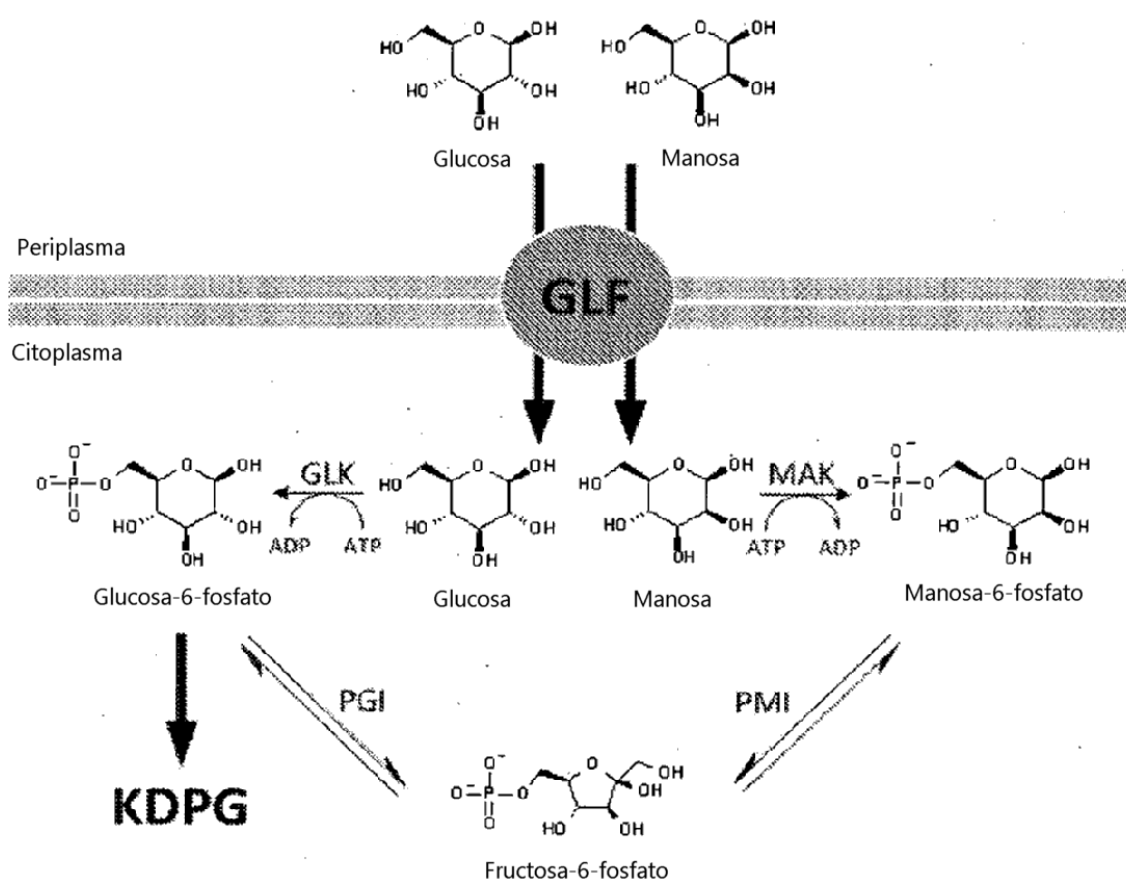
1. Un microorganismo del género *Cupriavidus* o *Ralstonia* modificado genéticamente para expresar la fosfomanosa isomerasa (EC 5.3.1.8) y la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa y opcionalmente la manofructoquinasa (EC 2.7.1.4), en donde dicho microorganismo tiene la capacidad de desarrollarse en manosa y opcionalmente también en glucosa como fuente de carbono.
2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el microorganismo está modificado genéticamente para expresar la xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5), la xiluloquinasa (EC 2.7.1.17) y un transportador ABC de alta afinidad y/o un simportador E de protones y xilosa, en donde dicho microorganismo tiene la capacidad de desarrollarse en manosa, xilosa o xilosa y arabinosa, y opcionalmente también en glucosa y/o galactosa como fuente de carbono.
3. El microorganismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el microorganismo está modificado genéticamente para expresar la transaldolasa (EC 2.2.1.2) y/o la transcetolasa (EC 2.2.1.1).
4. El microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el microorganismo está modificado genéticamente para expresar la glucoquinasa (EC 2.7.1.2).
5. El microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el microorganismo pertenece a la especie *R. eutropha* (*C. necator*).
6. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la fosfomanosa isomerasa (EC 5.3.1.8) y una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de difusión facilitada para la captación de manosa y opcionalmente una secuencia de nucleótidos que codifica la manofructoquinasa (EC 2.7.1.4), y elementos reguladores para regular la expresión de dichos genes en *Cupriavidus* o *Ralstonia*.
7. Un vector de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5), una secuencia de nucleótidos que codifica la xiluloquinasa (EC 2.7.1.17) y una secuencia de nucleótidos que codifica un transportador ABC de alta afinidad y/o una secuencia de nucleótidos que codifica el simportador E de xilosa y protones, y elementos reguladores para regular la expresión de dichos genes en *Cupriavidus* o *Ralstonia*.
8. Un vector de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la transaldolasa (EC 2.2.1.2) y/o la transcetolasa (EC 2.2.1.1).
9. Un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 u 8 que comprende un gen que codifica la glucoquinasa (EC 2.7.1.2).
10. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el elemento regulador comprende un promotor constitutivo fuerte.
11. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el vector es un vector con una amplia gama de hospedadores.
12. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que el promotor es un promotor de neokanamicina, un promotor *lac*, un promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, P2, un promotor de hidrogenasa (SH) o P_L.
13. Un sistema vectorial que comprende
 - el vector de la reivindicación 6 y
 - un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5), una secuencia de nucleótidos que codifica la xiluloquinasa (EC 2.7.1.17), y una secuencia de nucleótidos que codifica un transportador ABC de alta afinidad y/o una secuencia de nucleótidos que codifica el simportador E de xilosa y protones, y elementos reguladores para regular la expresión de dichos genes en *Cupriavidus* o *Ralstonia*.
 - y opcionalmente uno de dichos vectores comprende un gen que codifica la glucoquinasa (EC 2.7.1.2) o una secuencia de nucleótidos que codifica la transaldolasa (EC 2.2.1.2) y/o la transcetolasa (EC 2.2.1.1).
14. Un método para cultivar el microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un microorganismo de *Cupriavidus* o *Ralstonia* que comprende el vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, que comprende que el medio de cultivo contenga, como fuente de carbono, manosa, glucosa, xilosa, arabinosa o galactosa, o una combinación de las mismas.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende permitir que el microorganismo sintetice, opcionalmente después de modificación genética, un producto químico, tal como un lípido, y recuperar el producto

químico del medio de cultivo o de las células.

16. El método de acuerdo con las reivindicaciones 14 o 15, que comprende permitir que el microorganismo sintetice polihidroxicarboxilatos, tales como PHB o ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos.

5

17. Uso del microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, posiblemente después de una modificación genética, para producir un producto químico deseado.

**Fig. 1**

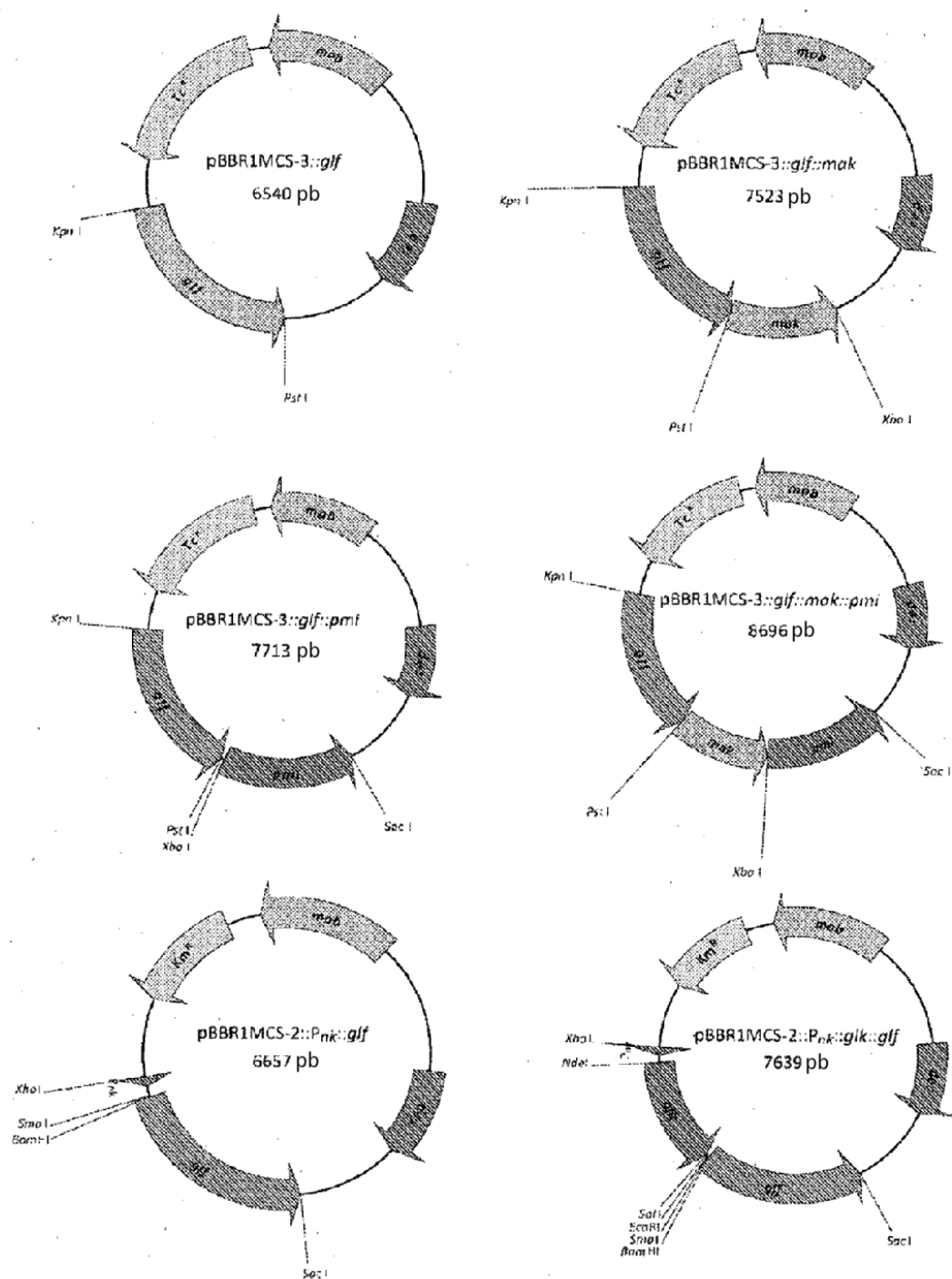


Fig. 2

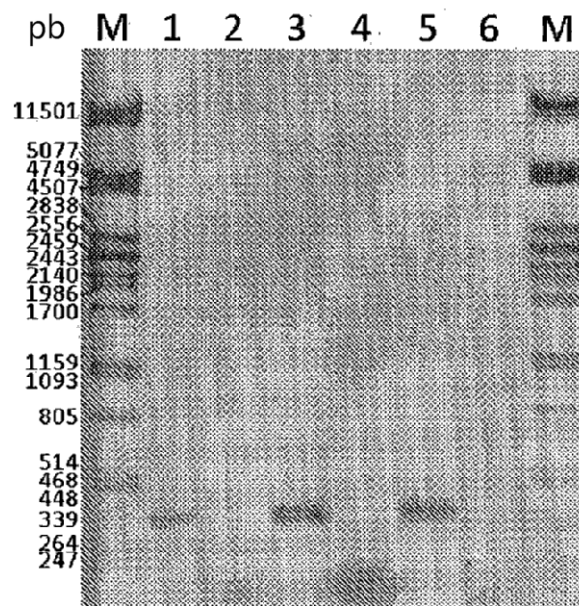


Fig. 3

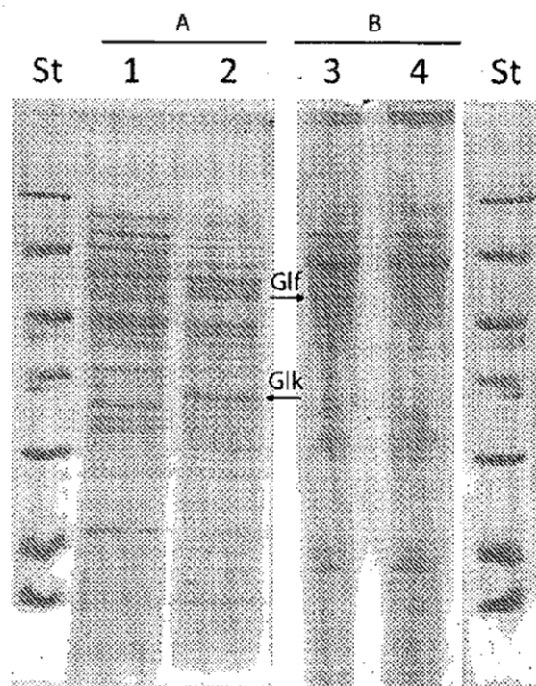


Fig. 4

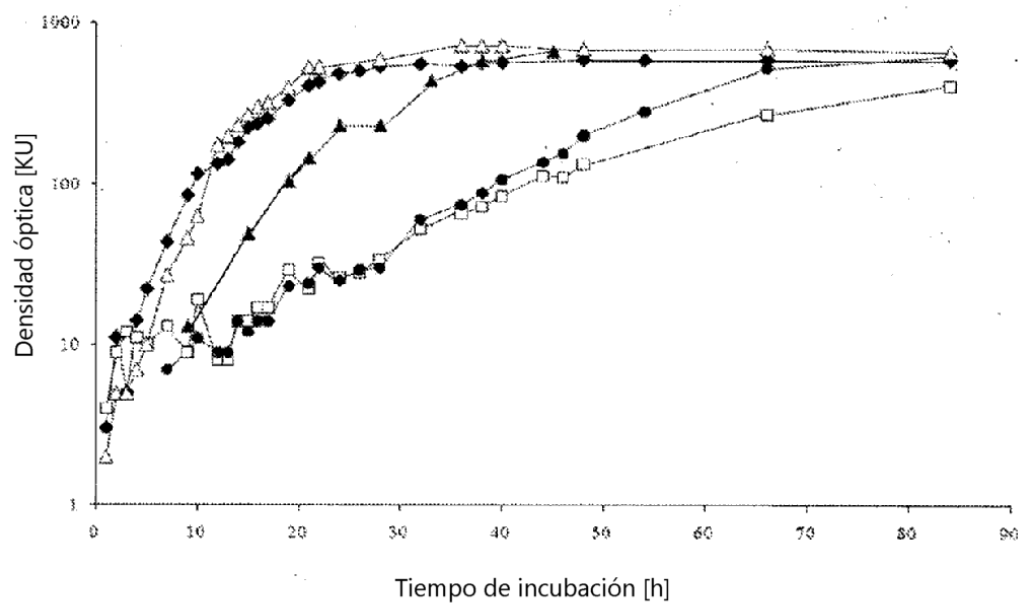


Fig. 5

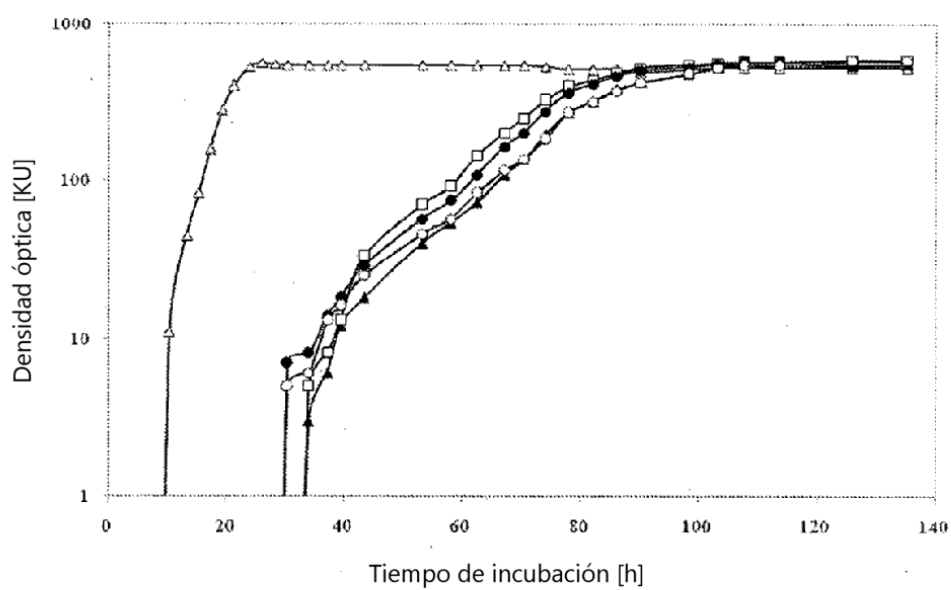


Fig. 6

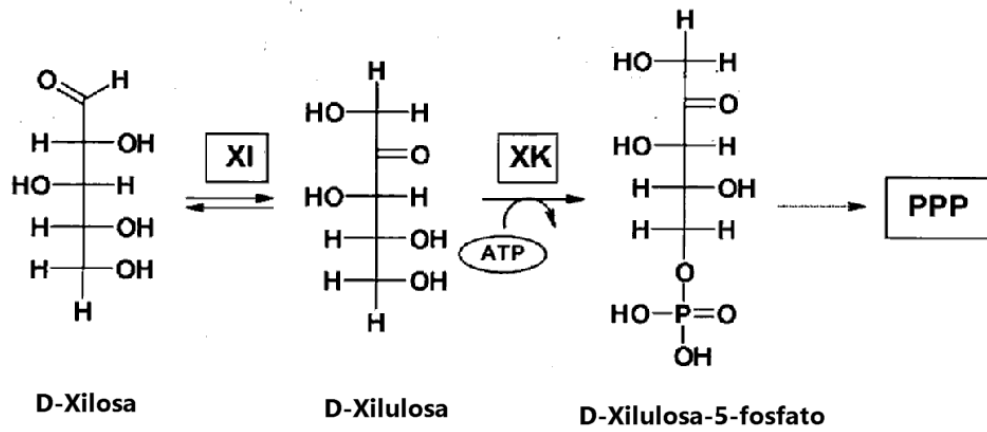


Fig. 7

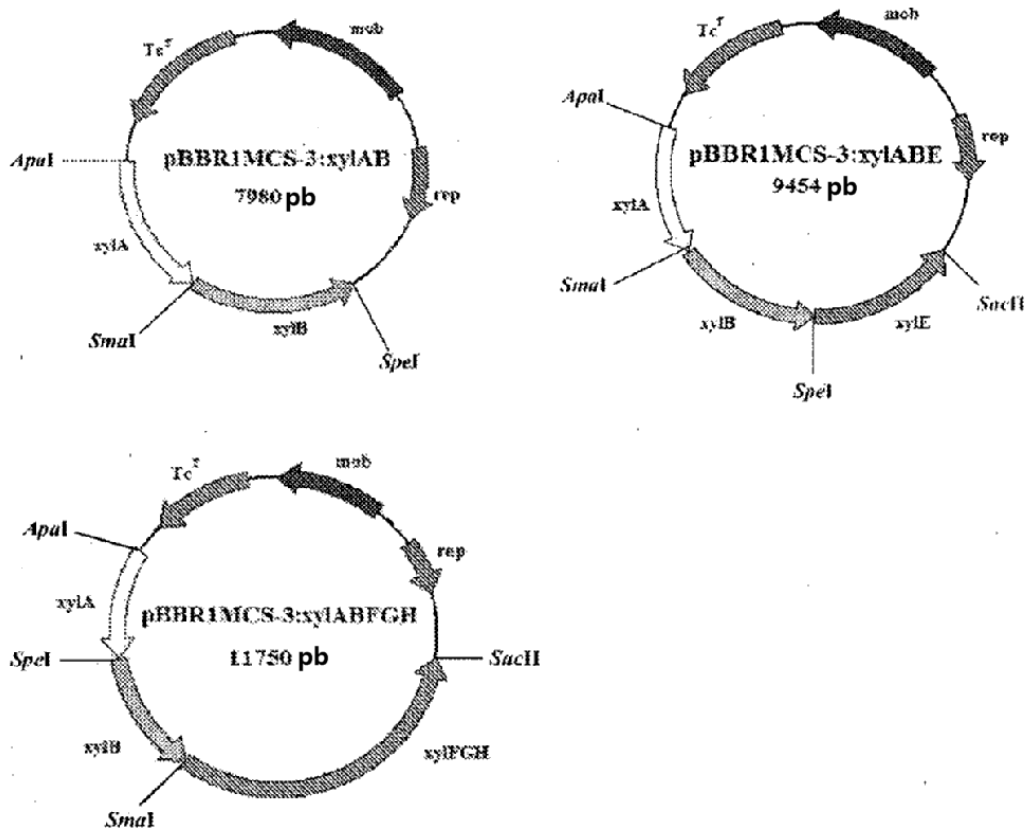
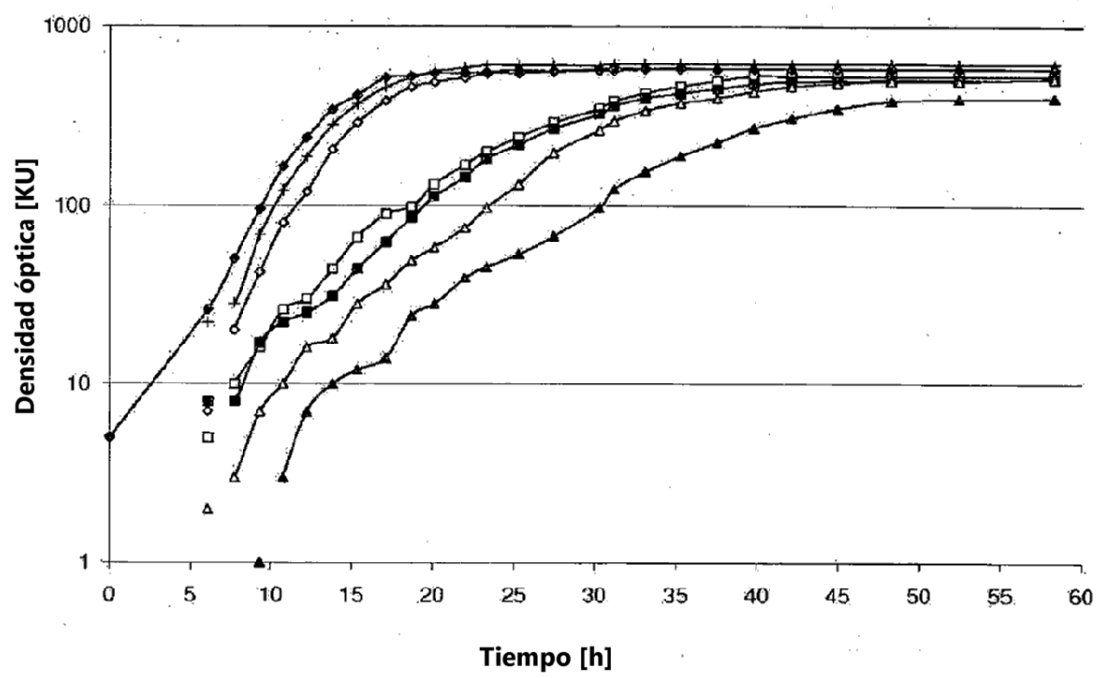


Fig. 8

**Fig. 9**