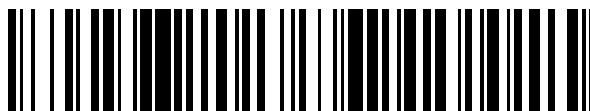


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 413**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2008** **E 13177890 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016** **EP 2677028**

54 Título: **Cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADH**

30 Prioridad:

20.12.2007 US 15346 P

29.10.2008 US 109297 P

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

28.06.2016

73 Titular/es:

BUTAMAX (TM) ADVANCED BIOFUELS LLC
(100.0%)

Route 141 & Henry Clay, DuPont Experimental
Station, Building 356

Wilmington, DE 19880-0356, US

72 Inventor/es:

LI, YUGEN;
NELSON, MARK J.;
LIAO, DER-ING y
O'KEEFE, DANIEL P.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 575 413 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

Cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADH

Esta solicitud reivindica el beneficio de las aplicaciones provisionales de EE.UU. 61/015346, presentada el 20 de diciembre de 2007, y 61/109297 presentada 29 de octubre 2008.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a la evolución de proteínas. Específicamente, las enzimas cetol-ácido reductoisomerasa han evolucionado para utilizar el cofactor NADH en lugar del NADPH.

Antecedentes de la invención

10 Las enzimas cetol-ácido reductoisomerasa son de naturaleza ubicua y están involucradas en la producción de valina e isoleucina, rutas que pueden afectar a la síntesis biológica de isobutanol. El isobutanol se produce específicamente del catabolismo de L-valina como un subproducto de la fermentación de la levadura. Es un componente de "aceite de fusel" que se forma como resultado del metabolismo incompleto de los aminoácidos por las levaduras. Después de que el grupo amino de la L-valina se cosecha como fuente de nitrógeno, el α -ceto-ácido resultante es descarboxilado y se reduce a isobutanol por las enzimas de la ruta de Ehrlich (Dickinson, et al., J. Biol. Chem. 273, 25752-25756, 1998).

15 La adición de L-valina exógena para la fermentación aumenta el rendimiento de isobutanol, como se describe por Dickinson et al., supra, en donde se informa de que se obtiene un rendimiento de isobutanol de 3 g/l proporcionando L-valina en una concentración de 20 g/l en la fermentación. Además, se ha mostrado la producción de n-propanol, isobutanol y alcohol isoamílico mediante células de *Zymomonas mobilis* inmovilizadas en alginato de calcio (Oaxaca, et al., Acta Biotechnol., 11, 523-532, 1991).

Se mostraba un incremento en el rendimiento de alcoholes C3-C5 a partir de hidratos de carbono cuando se añadían los aminoácidos leucina, isoleucina y/o valina al medio de crecimiento como fuente de nitrógeno (WO 2005040392).

25 Mientras que los procedimientos descritos anteriormente indican el potencial de la producción de isobutanol a través de medios biológicos estos procedimientos tienen un coste prohibitivo para la producción de isobutanol escala industrial. La biosíntesis de isobutanol directamente a partir de azúcares sería económicamente viable y representaría un avance en la técnica. Sin embargo, hasta la fecha las únicas enzimas cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) conocidas son aquellas que unen NADPH en su forma nativa, reduciendo la eficiencia energética de la ruta. Una KARI que uniera NADH sería beneficiosa y mejoraría la productividad de la ruta biosintética de isobutanol mediante la capitalización de la NADH producido por las rutas glucolíticas existentes y otras metabólicas en las células microbianas más habitualmente utilizadas. El descubrimiento de una enzima KARI que puede utilizar NADH como cofactor en lugar de NADPH sería un avance en la técnica.

35 La evolución de enzimas que tienen especificidad para el cofactor NADH en lugar de por el NADPH es conocida por algunas enzimas y se conoce normalmente como "intercambio/conmutación de cofactor". Véase, por ejemplo Eppink, et al. J. Mol. Biol., (1999), 292, 87-96, que describe la conmutación de la especificidad del cofactor de p-hidroxibenzoato hidroxilasa (PHBH) dependiente estrictamente de NADPH a partir de *Pseudomonas fluorescens* mediante mutagénesis dirigida al sitio; y Nakanishi, et al., J. Biol. Chem., (1997), 272, 2218-2222, que describe el uso de mutagénesis dirigida al sitio en una carbonilo reductasa de pulmón de ratón en la que Thr-38 fue sustituida por Asp (T38D) dando como resultado una enzima que tiene un aumento de 200 veces en los valores K_m para NADP(H) y una disminución correspondiente de más de 7 veces en aquellos de NAD(H). La conmutación del cofactor de conmutación se ha aplicado a una variedad de enzimas que incluyen monooxigenasas (Kamerbeek, et al, Eur J, Biochem, (2004), 271, 2107-2116); deshidrogenasas; Nishiyama, et al., J. Biol. Chem, (1993), 268, 4656-4660; Ferredoxin-NADP reductasa, Martínez-Julvez, et al., Biophys. Chem, (2005), 115, 219-224); y oxidorreductasas (US2004/0248250).

45 Rane et al., (Arch. Biochem. Biophys., (1997), 338, 83-89) comentan la conmutación del cofactor de una cetol-ácido reductoisomerasa aislada de *E. coli* dirigiendo cuatro restos a la enzima para la mutagénesis (R68, K69, K75, y R76); sin embargo, se duda de la eficacia de este procedimiento.

50 Aunque los procedimientos citados anteriormente sugieren que es posible, por lo general, conmutar la especificidad del cofactor entre NADH y NADPH, los procedimientos son específicos de la enzima y los resultados impredecibles. El desarrollo de un cetol-ácido reductoisomerasa que tiene una alta especificidad por NADH en lugar de por NADPH mejoraría enormemente su eficacia en la ruta biosintética de isobutanol, sin embargo, no se ha informado de tal enzima KARI.

Los solicitantes han resuelto el problema planteado identificando una serie de enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutante que tienen una preferencia por unir NADH en lugar de NADPH.

Compendio de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para la evolución de enzimas de cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) desde unir el cofactor NADPH hasta unir NADH. El procedimiento implica la mutagénesis de ciertos restos específicos en la enzima KARI de ellos para producir la conmutación del co-factor.

- 5 Por consiguiente, la invención proporciona una enzima cetol-ácido reductoisomerasa como se expone en la ID de SEC N°: 17 en donde
 - a) el resto 52 se muta; o
 - b) los restos 47, 50 y 52 se mutan; o
 - c) el resto 52 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en 24, 33, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170 se mutan; o
 - d) los restos 47, 50, 52 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en 24, 33, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170 se mutan; yen donde dicha enzima cetol-ácido reductoisomerasa tiene una preferencia por unir NADH en lugar de por NADPH, y
- 15 en donde dicha mutación es una sustitución de aminoácidos.

En una realización de dicha invención, la enzima comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC N°: 29. También se describe en el presente documento una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC N°: 29
- 20 Alternativamente, la invención proporciona una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC N°: 19, 24, 25, 26, 27, 28, 67, 68, 69 y 70.

También se describe en el presente documento una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante como se expone en la ID de SEC N°: 17 que comprende al menos una mutación en un resto seleccionado del grupo consistente en 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170.
- 25 En una realización específica, la invención proporciona una enzima cetol-ácido reductoisomerasa como se expone en la ID de SEC N°: 17 en la que el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N, y S.

En algunas realizaciones,

 - a) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, F, G, I, L, N, P e Y;
 - b) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, M, N, V y W; y
 - c) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N, y S.

En algunas realizaciones, en la enzima cetol-ácido reductoisomerasa de la invención
- 35
 - a) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de V;
 - b) el resto en la posición 165 tiene una sustitución de aminoácidos de M;
 - c) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
 - d) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de A;
 - e) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
- 40
 - f) el resto en la posición 33 tiene una sustitución de aminoácidos de L;
 - g) el resto en la posición 80 tiene una sustitución de aminoácidos de I;
 - h) el resto en la posición 115 tiene una sustitución de aminoácidos de L; y
 - i) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, H, I y W.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para la evolución de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:

- a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADPH que tiene una secuencia de aminoácidos nativa específica;
- 5 b) identificar un resto de conmutación del cofactor en la enzima de a) basado en la secuencia de aminoácidos de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa *Pseudomonas fluorescens* como se expone en la ID de SEC N°: 17 en la que el resto de conmutación del cofactor en la ID de SEC N°: 17 está en la posición 52;
- c) crear una mutación en el resto de conmutación del cofactor identificado en b) para crear una enzima mutante en la que dicha enzima mutante ligue NADH.
- 10 También se describe en el presente documento un procedimiento para la evolución de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:
 - a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADPH que tiene una secuencia de aminoácidos nativa específica;
 - b) identificar los restos de conmutación del cofactor en la enzima de a) basado en la secuencia de aminoácidos de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa *Pseudomonas fluorescens* como se expone en la ID de SEC N°: 17 en la que los restos de conmutación del cofactor están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170;
 - c) crear mutaciones en al menos uno de los restos de conmutación del cofactor de b) para crear una enzima mutante en la que dicha enzima mutante ligue NADH.
- 20 En otra realización alternativa, la invención proporciona un procedimiento para la producción de isobutanol, que comprende:
 - a) proporcionar una célula anfitriona microbiana recombinante que comprende los siguientes constructos genéticos:
 - i) al menos un constructo genético que codifica una enzima acetolactato sintasa para la transformación de piruvato en acetolactato;
 - 25 ii) al menos un constructo genético que codifica una enzima cetol-ácido reductoisomerasa de la invención;
 - iii) al menos un constructo genético que codifica una acetohidroxiácido deshidratasa para la transformación de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato (ruta de la etapa c);
 - iv) al menos un constructo genético que codifica una cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, para la transformación de α -cetoisovalerato en isobutiraldehído (ruta de la etapa d);
 - 30 v) al menos un constructo genético que codifica un alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada para la transformación de isobutiraldehído en isobutanol (ruta de la etapa e); y
 - b) cultivar la célula anfitriona de (a) en condiciones en las que se produzca iso-butanol.

Breve descripción de las descripciones de las secuencias de las figuras

- 35 La invención puede ser entendida más completamente a partir de la siguiente descripción detallada, las Figuras y las descripciones de las secuencias que se adjuntan, que forman parte de esta solicitud.

Figura 1 - Muestra cuatro diferentes rutas de biosíntesis de isobutanol. Las etapas marcadas "a", "b", "c", "d", "e", "f", "g", "h", "i", "j" y "k" representan las transformaciones de sustrato a producto que se describen a continuación.

- Figura 2 - Alineamiento múltiple de secuencias (MSA) de enzimas KARI de diferentes fuentes. (a) MSA entre tres enzimas KARI que requieren NADPH; (b) MSA entre PF5-KARI y otras enzimas KARI, con especificidad promiscua de nucleótidos, donde MMC5 - es de *Methanococcus maripaludis* C5; MMS2 - es de *Methanococcus maripaludis* S2; 40 MNSB - es de *Methanococcus vanniellii* SB; ilv5 - es de *Saccharomyces cerevisiae* ilv5; KARI-D1 - es de *Sulfolobus solfataricus* P2 ilvC; KARI-D2 - es de *Pyrobaculum aerophilum* P2ilvC; y KARI-S1 es de *Ralstonia solanacearum* GM11000 ilvC.

Figura 3 - Interacción de bucle de unión fosfato con NADPH basado en el modelado de homología.

- 45 Figura 4 - Actividades KARI de mejor desempeño de la biblioteca C que utilizan cofactores NADH frente a NADPH. La actividad y la desviación estándar se derivaron de experimentos triples. La información de la mutación es la siguiente: C3A7 = R47Y/S50A/T52D/V53W; C3A10 = R47Y/S50A/T52G/V53W; C3B11 = R47F/S50A/T52D/V53W; C3C8 = R47G/S50M/T52D/V53W; y C4D12 = R47C/S50MT52DN53W

Figura 5 - (a) Actividades KARI de mejor desempeño de las bibliotecas E, F y G que utilizan cofactores NADH frente a NADPH. (b) actividades KARI de control positivo frente a Pf5-ilvC de tipo silvestre que utilizan cofactores NADH. La actividad y la desviación estándar se derivaron de al menos tres experimentos paralelos. "Wt" representa el tipo silvestre de Pf5-ilvC y "Neg" significa control negativo.

5 Los experimentos de las reacciones NADH y NADPH en (a) duraron 30 minutos; en (b) duraron 10 minutos.

Figura 6 - Actividades de mejor desempeño de la biblioteca H que utilizan cofactores NADH frente NADPH. La actividad y la desviación estándar se derivaron de experimentos triples. La información de la mutación es la siguiente: 24F9 = R47P/S50G/T52D; 68F10 = R47P/T52S; 83G10 = R47P/S50D/T52S; 39G4 = R47P/S50C/T52D; 91A9 = R47P/S50CT52D; y C3B11 = R47F/S50A/T52D/V53W

10 Figura 7 - Termoestabilidad de PF5-ilvC. La actividad restante de la enzima después de calentar a ciertas temperaturas durante 10 min era el número promedio de experimentos triples y se normalizó a la actividad medida a temperatura ambiente.

15 Figura 8 - Alineamiento múltiple de secuencias entre 5 moléculas KARI que existen en la naturaleza. Las posiciones resaltadas en negrita y gris fueron identificados por PCR propensa a error y de las posiciones solo resaltadas en gris fueron objeto de mutagénesis.

Figura 9 - Alineamiento de las veinticuatro secuencias KARI funcionalmente verificadas. El motivo GxGXX(G/A) involucrado en la unión de NAD(P)H se indica debajo del alineamiento.

Figura 10 - Un ejemplo del alineamiento de Pf5-KARI *Pseudomonas fluorescens* para el perfil HMM de KARI. Las once posiciones que son responsables de conmutación del co-factor están en negrita y sombreadas en gris.

20 Tabla 9-es una tabla del perfil HMM de las enzimas KARI descritas en el Ejemplo 5. Los once posiciones en el perfil HMM que representan las columnas en el alineamiento que corresponden a las once posiciones de conmutación del cofactor en Pf-5-KARI *Pseudomonas fluorescens* están identificadas como posiciones 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156 y 170. Las líneas correspondientes a estas posiciones en el archivo de modelo se resaltan en amarillo. La Tabla 9 se presenta adjunta electrónicamente.

25 Las siguientes secuencias se ajustan a 37 C.F.R. 1.821-1.825 ("Requisitos para las solicitudes de patente que contienen secuencias de nucleótidos y/o divulgaciones de secuencias de aminoácidos - las Reglas de Secuencias") y son compatibles con la Norma ST.25 (1998) de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO) y los requisitos del listado de secuencias de los de EPO y PCT (Reglas 5.2 y 49.5 (a-bis), y la Sección 208 y el Anexo C de las Instrucciones Administrativas). Los símbolos y formato utilizados para los datos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos cumplen con las reglas establecidas en 37 CFR §1.822.

30

Tabla 1

Cebadores de oligonucleótidos utilizados en esta invención

Cebadores de oligonucleótidos utilizados en esta invención		
ID de SECUENCIA No.	SECUENCIA	Descripción
1	TGATGAACATCTTCGCGTATTCGCCGTCCT	Cebador inverso para el vector <i>pBAD</i>
2	GCGTAGACGTGACTGTTGGCCTGNNTAAAGGCNN GGCTNNCTGGGCCAAGGCT GAAGCCCACGGCTTG	Cebador directo de biblioteca C
3	GCGTAGACGTGACTGTTGGCCTGNNTAAAGGCTCG GCTACCGTTGCCAAGGCTGAAGCCCACGGCTTG	Cebador directo de biblioteca E
4	GCGTAGACGTGACTGTTGGCCTGCGTAAAGGCNNT GCTACCGTTGCCAAGGCTGAAGCCCACGGCTTG	Cebador directo de biblioteca F
5	GCGTAGACGTGACTGTTGGCCTGCGTAAAGGCTCG GCTNNTGTTGCCAAGGCTGAAGCCCACGGCTTG	Cebador directo de biblioteca G
6	GCGTAGACGTGACTGTTGGCCTGNNTAAAGGCNNT GCTNNTGTTGCCAAGGCTGAAGCCCACGGCTTG	Cebador directo de biblioteca H
7	AAGATTAGCGGATCCTACCT	Cebador de secuenciación

Cebadores de oligonucleótidos utilizados en esta invención		
ID de SECUENCIA No.	SECUENCIA	Descripción
		(directo)
8	AACAGCCAAGCTTTTAGTTC	Cebador de secuenciación (inverso)
20	CTCTCTACTGTTTCTCCATACCCG	pBAD_266-021308f
21	CAAGCCGTGGGCTTCAGCCTTGGCKNN	PF5_53Mt022908r
22	CGGTTTCAGTCTCGTCCTTGAAG	pBAD_866-021308
49	GCTCAAGCANNKAACCTGAAGG	pBAD-405-C33_090808f
50	CCTTCAGGTTKNNTGCTTGAGC	pBAD-427-C33_090808r
51	GTAGACGTGNNKGTGGCCTG	pBAD-435-T43_090808f
52	CAGGCCAACKNNCACGTCTAC	pBAD-456-T43_090808r
53	CTGAAGCCNNKGGCNNKAAAGTGAC	pBAD-484-H59L61_090808f
54	GTCACCTTKNNGCCKNNGGCTTCAG	pBAD-509-H59L61_090808r
55	GCAGCCGTTNNKGGTGCCGACT	pBAD-519-A71_090808f
56	AGTCGGCACCKNNAACGGCTGC	pBAD-541-A71_090808r
57	CATGATCCTGNNKCCGGACGAG	pBAD-545-T80_090808f
58	CTCGTCCGGKNNCAGGATCATG	pBAD-567-T80_090808r
59	CAAGAAGGGCNNKACTCTGGCCT	pBAD-608-A101_090808f
60	AGGCCAGAGTKNNGCCCTTCTTG	pBAD-631-A101_090808r
61	GTTGTGCCTNNKGCCGACCTCG	pBAD-663-R119_090808f
62	CGAGGTCGGCKNNAGGCACAAC	pBAD-685-R119_090808r

Las secuencias adicionales utilizadas en la aplicación se enumeran a continuación. En esta divulgación se utilizan los nombres abreviados de los genes entre paréntesis.

ID de SEC N°: 9: *Methanococcus maripaludis* C5-ilvC (MMC5) - Número de Acceso al Banco de Genes NC_009135.1 Región: 901034..902026

- 5 ID de SEC N°: 10: es la *Methanococcus maripaludis* S2-ilvC (MMS2) - Número de Acceso al Banco de Genes NC_005791.1 Región: 645729..646721

ID de SEC N°: 11: es la *Methanococcus vannielii* SB-ilv5 (MVSB) - Número de Acceso al Banco de Genes NZ_AAWX01000002.1 Región: 302214..303206

- 10 ID de SEC N°: 12: es la *Saccharomyces cerevisiae* ilv5 (ilv5) - Número de Acceso al Banco de Genes NC_001144.4 Región: 838065..839252

ID de SEC N°: 13: es la *Sulfolobus solfataricus* P2 ilvC (KARI-D1) - Número de Acceso al Banco de Genes NC_002754.1 Región: 506253..507260

ID de SEC N°: 14: es la *Pyrobaculum aerophilum* str. IM2 ilvC (KARI-D2) - Número de Acceso al Banco de Genes NC_003364.1 Región: 1976281..1977267

- 15 ID de SEC N°: 15: es la *Ralstonia solanacearum* GMI1000 ilvC (KARI-S1) - Número de Acceso al Banco de Genes NC_003295.1 Región: 2248264..2249280

ID de SEC N°: 16: es la *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ilvC - Número de Acceso al Banco de Genes NC_002516 Región: 5272455..5273471

- 20 ID de SEC N°: 17: es la *Pseudomonas fluorescens* PF5 ilvC - Número de Acceso al Banco de Genes NC_004129 Región: 6017379..6018395

ES 2 575 413 T3

ID de SEC Nº: 18: es la *Spinacia oleracea* ilvC (Spinach-KARI) - Número de Acceso al Banco de Genes NC_002516
Región: 1..2050.

ID de SEC Nº: 19: es la secuencia de aminoácidos del mutante (Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/G170A) de la proteína nativa ilvC de *Pseudomonas fluorescens*.

- 5 SEQ ID NO: 23 es la SEC de ADN del mutante (Y24F/R47Y/S50A/ T52D/V53A/L61 F/ G170A) de la proteína nativa ilvC de *Pseudomonas fluorescens*.

ID de SEC Nº: 24: es la SEC de aminoácidos de la ZB1 mutante (Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61 F/A156V)

ID de SEC Nº: 25: es la SEC de aminoácidos de la ZF3 mutante (Y24F/C33L/R47YIS50A/T52D/V53A/L61F)

ID de SEC Nº: 26: es la SEC de aminoácidos de la ZF2 mutante (Y24F/C33L/R47Y/S50AIT52D/V53A/L61 F/A156V)

- 10 ID de SEC Nº: 27: es la SEC de aminoácidos de la ZB3 mutante (Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/G170A)

ID de SEC Nº: 28: es la SEC de aminoácidos del Z4B8 mutante (C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A1L61F/T801IA156V/G170A)

ID de SEC Nº: 29: es una secuencia de aminoácidos de consenso que comprende todas las mutaciones puntuales KARI verificadas experimentalmente basadas en la ID de SEC Nº: 17.

- 15 ID de SEC Nº: 30: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Natronomonas pharaonis* DSM 2160

ID de SEC Nº: 31: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168

ID de SEC Nº: 32: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

ID de SEC Nº: 33: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Phaeosporium molischianum*

ID de SEC Nº: 34: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4

- 20 ID de SEC Nº: 35: es la secuencia de aminoácidos para KARI *Alkalilimnicola ehrlichei* MLHE-1

ID de SEC Nº: 36: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Campylobacter lari* RM2100

ID de SEC Nº: 37: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Marinobacter aquaeolei* VT8

ID de SEC Nº: 38: es la secuencia de aminoácidos para KARI *Psychrobacter arcticus* 273-4

ID de SEC Nº: 39: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Hahella chejuensis* KCTC2396

- 25 ID de SEC Nº: 40: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Thiobacillus denitrificans* ATCC25259

ID de SEC Nº: 41: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Azotobacter vinelandii* AvOP

ID de SEC Nº: 42: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a

ID de SEC Nº: 43: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000

ID de SEC Nº: 44: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Pseudomonas putida* KT2440

- 30 ID de SEC Nº: 45: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Pseudomonas entomophila* L48

ID de SEC Nº: 46: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Pseudomonas mendocina* ymp

ID de SEC Nº: 47: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Bacillus cereus* ATCC10987 NP_977840.1

ID de SEC Nº: 48: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Bacillus cereus* ATCC10987 NP_978252.1

- 35 ID de SEC Nº: 63: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Escherichia coli*-Número de Acceso al Banco de Genes P05793

ID de SEC Nº: 64: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Marine Gamma Proteobacterium* HTCC2207 - Número de Acceso al Banco de Genes ZP_01224863.1

ID de SEC Nº: 65: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Desulfuromonas acetoxidans* - Número de Acceso al Banco de Genes ZP_01313517.1

- 40 ID de SEC Nº: 66: es la secuencia de aminoácidos para KARI de *Pisum sativum* (Pea) - Número de Acceso al Banco de Genes 082043

ID de SEC N°: 67: es la secuencia de aminoácidos para el mutante 3361 G8 (C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T80I)

ID de SEC N°: 68: es la secuencia de aminoácidos del 2H10 mutante (Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53I/L61F/T80I/A156V)

5 ID de SEC N°: 69: es la secuencia de aminoácidos del 1 D2 mutante (Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T80I/A156V)

ID de SEC N°: 70: es la secuencia de aminoácidos del 3F12 mutante (Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T80I/A156V).

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se refiere a la generación de enzimas KARI mutadas para usar NADH en lugar de NADPH. Estas enzimas de co-factor conmutado funcionan de manera más eficaz en los sistemas microbianos diseñados para producir isobutanol. Isobutanol es un importante producto químico industrial de entre los productos básicos con una variedad de aplicaciones, donde su potencial como un combustible o un aditivo de combustible es particularmente significativo. Aunque sólo un alcohol de cuatro carbonos, butanol tiene un contenido de energía
15 similar al de la gasolina y se puede mezclar con cualquier combustible fósil. Isobutanol está favorecido como un combustible o un aditivo del combustible, ya que produce sólo CO₂ y poco o ningún SO_x o NO_x cuando se quema en un motor estándar de combustión interna. Además el butanol es menos corrosivo que el etanol, el aditivo de combustible más preferido hasta la fecha.

20 Las siguientes definiciones y abreviaturas se han de utilizar para la interpretación de las reivindicaciones y de la memoria descriptiva.

El término "invención" o la expresión "presente invención" como se utiliza en el presente documento está destinado a aplicarse en general a todas las realizaciones de la invención descritas en las reivindicaciones como presentadas o más tarde modificadas y complementadas, o en la memoria descriptiva.

25 La expresión "ruta biosintética del isobutanol" se refiere a la ruta enzimática para producir isobutanol. Rutas biosintéticas de isobutanol preferidas se ilustran en la Figura 1 y se describen en el presente documento.

La expresión "ensayo de consumo de NADPH" se refiere a un ensayo enzimático para la determinación de la actividad específica de la enzima KARI, que implica medir la desaparición del cofactor KARI, NADPH, de la reacción enzimática.

"KARI" es la abreviatura de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa.

30 La expresión "proximidad cercana" cuando se refiere a la posición de diversos restos de aminoácidos de una enzima KARI con respecto al adenosil 2'-fosfato de NADPH significa aminoácidos en el modelo tridimensional para la estructura de la enzima que se encuentran a unos 4,5 Å del átomo de fósforo del adenosil 2'-fosfato de NADPH ligado a la enzima.

35 La expresión "Cetol-ácido reductoisomerasa " (abreviado "KARI"), y "Acetohidroxiácido isomerorreductasa" se utilizarán de forma intercambiable y se refieren a la enzima que tiene el número de la CE, EC 1.1.1.86 (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego). La cetol-ácido reductoisomerasa cataliza la reacción de (S)-acetolactato a 2,3-dihidroxiisovalerato, como se describe más completamente a continuación. Estas enzimas están disponibles a partir de una serie de fuentes, que incluyen, pero no se limitan a E. coli con Número de Acceso al Banco de Genes NC-000913 REGIÓN: 3955993..3957468, Vibrio cholerae con Número de Acceso al Banco de Genes NC-002505 REGIÓN: 157441..158925, Pseudomonas aeruginosa con Número de Acceso al Banco de Genes NC-002516, (ID de SEC N°: 16) REGIÓN: 5272455..5273471, y Pseudomonas fluorescens con Número de Acceso al Banco de Genes NC-004129 (ID de SEC N°: 17) REGIÓN: 6017379..6018395. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "enzima cetol-ácido reductoisomerasa de Clase I" significa la forma corta que tiene típicamente entre 330 y 340 restos de aminoácidos, y es distinta de la forma larga, llamada clase II, que tiene
45 típicamente aproximadamente 490 restos.

La expresión "acetolactato sintasa" se refiere a una enzima que cataliza la transformación de piruvato en acetolactato y CO₂. Acetolactato tiene dos estereoisómeros ((R)- y (S)-); la enzima prefiere el (S)-isómero, que se produce mediante sistemas biológicos. Acetolactato sintasas preferidas son conocidas por el número EC 2.2.1.6 9 (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego). Estas enzimas están disponibles a partir de una serie de
50 fuentes, que incluyen, pero no se limitan a Bacillus subtilis (N° en el Banco de Genes: CAB15618, Z99122, secuencia de aminoácidos NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) y secuencia de nucleótidos NCBI, respectivamente), Klebsiella pneumoniae (N° en el Banco de Genes: AAA25079 (ID de SEC N°: 2), M73842 (ID de SEC N°: 1)), y Lactococcus lactis (N° en el Banco de Genes: AAA25161, L16975).

La expresión "acetohidroxiácido deshidratasa" se refiere a una enzima que cataliza la transformación de 2,3-

dihidroxi-isovalerato a α -cetoisovalerato. Las acetohidroxiácido deshidratasa preferidas son conocidas por el número EC 4.2.1.9. Estas enzimas están disponibles a partir de en una amplia variedad de microorganismos, que incluyen, pero no se limitan a *E. coli* (Nº en el Banco de Genes: YP_026248, NC_000913, *S. cerevisiae* (Nº en el Banco de Genes: NP_012550, NC_001142), *M. maripaludis* (Nº en el Banco de Genes: CAF29874, BX957219), y *B. subtilis* (Nº en el Banco de Genes: CAB14105, Z99115).

La expresión " α -cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada" se refiere a una enzima que cataliza la transformación de α -cetoisovalerato a isobutiraldehído y CO₂. Las α -cetoácido descarboxilasas de cadena ramificada preferidas son conocidas por el número EC 4.1.1.72 y están disponibles a partir de una serie de fuentes, que incluyen, pero no se limitan a *Lactococcus lactis* (Nº en el Banco de Genes: AAS49166, AY548760; CAG34226, AJ746364, *Salmonella typhimurium* (Nº en el Banco de Genes: NP-461346, NC-003197), y *Clostridium acetobutylicum* (Nº en el Banco de Genes: NP-149189, NC-001988).

La expresión "alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada" se refiere a una enzima que cataliza la transformación de isobutiraldehído a isobutanol. Las alcohol deshidrogenasas de cadena ramificada preferidas son conocidas por el número EC 1.1.1.265, pero también pueden ser clasificadas bajo otras alcohol deshidrogenasas (específicamente, EC 1.1.1.1 o 1.1.1.2). Estas enzimas utilizan NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducida) y/o NADPH como donante de electrones y están disponibles a partir de una serie de fuentes, que incluyen, pero no se limitan a *S. cerevisiae* (Nº en el Banco de Genes: NP-010656, NC-001136; NP-014051, NC-001145), *E. coli* (Nº en el Banco de Genes: NP-417484, y *C. acetobutylicum* (Nº en el Banco de Genes: NP-349892, NC-003030).

La expresión "ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada" se refiere a una enzima que cataliza la transformación de α -cetoisovalerato a isobutiril-CoA (isobutiril-cofactor A), utilizando NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido) como aceptor de electrones. Las cetoácido deshidrogenasas de cadena ramificada preferidas son conocidas por el número EC 1.2.4.4. Estas cetoácido deshidrogenasas de cadena ramificada comprenden cuatro subunidades, y las secuencias de todas las subunidades están disponibles en una amplia variedad de microorganismos, que incluyen, pero no se limitan a *B. subtilis* (Nº en el Banco de Genes: CAB14336, Z99116; CAB14335, Z99116; CAB14334, Z99116, y CAB14337, Z99116) y *Pseudomonas putida* (Nº en el Banco de Genes: AAA65614, M57613; AAA65615, M57613; AAA65617, M57613, y AAA65618, M57613).

Los términos " k_{cat} " y " K_m " son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en Enzyme structure and Mechanism, 2ª ed. (Ferst; W.H. Freeman: NY, 1985; pág. 98-120). La expresión " k_{cat} ", a menudo llamado el "número de rotación", se define como el número máximo de moléculas de sustrato transformadas a productos por sitio activo por unidad de tiempo, o el número de veces que la enzima da la vuelta por unidad de tiempo. $k_{cat} = V_{max}/[E]$, donde $[E]$ es la concentración de la enzima (Ferst, supra). Los términos "rotación total" y "número de rotación total" se utilizan en el presente documento para referirse a la cantidad de producto formado por la reacción de una enzima KARI con sustrato.

La expresión "eficiencia catalítica" se define como la k_{cat}/K_m de una enzima. La eficiencia catalítica se utiliza para cuantificar la especificidad de una enzima por un sustrato.

La expresión "molécula de ácido nucleico aislada", "fragmento de ácido nucleico aislado" y "construcción genética" se usan de forma intercambiable y significará un polímero de ARN o ADN que es monocatenario o bicatenario, que contiene opcionalmente, bases de nucleótidos sintéticas, no natural o alteradas. Un fragmento de ácido nucleico aislado en forma de un polímero de ADN puede estar compuesto de uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

El término "aminoácido" se refiere a la unidad estructural química básica de una proteína o polipéptido. Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento para identificar aminoácidos específicos:

Aminoácido	Abreviaturas de tres letras	Abreviaturas de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	Su	H
Leucina	Leu	L

Aminoácido	Abreviaturas de tres letras	Abreviaturas de una letra
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

El término "Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que es capaz de ser expresado como una proteína específica, incluyendo opcionalmente secuencias reguladoras que preceden (secuencias 5' no codificantes) y que siguen (secuencias 3' no codificantes) a la secuencia codificante. "Gen nativo" se refiere a un gen tal como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente que la encontrada en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "foráneo" se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo anfitrión, pero que se introduce en el organismo anfitrión por transferencia génica. Los genes foráneos pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que ha sido introducido en el genoma por un procedimiento de transformación.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "Secuencia codificante" se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia específica de aminoácidos. "Secuencias reguladoras adecuadas" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias 5' no codificantes), dentro de, o aguas abajo (secuencias 3' no codificantes) de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, en el procesamiento del ARN o en la estabilidad, o en la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitio de procesamiento del ARN, sitio de unión efector y estructura de bucle en horquilla.

La expresión "Promotor" se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En general, una secuencia codificante se encuentra en 3' a una secuencia promotora. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Los expertos en la técnica entenderán que promotores diferentes pueden dirigir la expresión de un gen en tejidos o tipos de células diferentes, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. Los promotores que causan que un gen se exprese en la mayoría de los tipos de células en la mayoría de veces se denominan comúnmente "promotores constitutivos". Se reconoce además que, dado que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no han sido completamente definidos, fragmentos de ADN de diferentes longitudes puedan tener idéntica actividad promotora.

La expresión "unido operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de una se ve afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante cuando es capaz de efectuar la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control de la transcripción del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse operativamente a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

El término "expresión", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la transcripción y acumulación estable de derivados de ARN sentido (ARNm) o ARN antisentido derivados del fragmento de ácido nucleico de la invención. Expresión también puede referirse a la traducción de ARNm en un polipéptido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en el genoma de un organismo anfitrión, dando como resultado una herencia genéticamente estable. Organismos anfitrión que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos "transgénicos" o "recombinantes" o "transformados".

Los términos "plásmido", "vector" y "casete" se refieren a un elemento cromosómico extra que llevan a menudo genes que no son parte del metabolismo central de la célula, y habitualmente en forma de fragmentos de ADN

circulares de doble cadena. Tales elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias que se integran en el genoma, fago o secuencias de nucleótidos, lineales o circulares, de un ADN o ARN monocatenario o bicatenario, derivadas de cualquier fuente, en el que una serie de secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una única construcción que es capaz de introducir un fragmento promotor y la secuencia de ADN en un producto génico seleccionado junto con la secuencia no traducida 3' apropiada en una célula. "Casete de transformación" se refiere a un vector específico que contiene un gen foráneo y que tiene elementos, además del gen foráneo, que facilitan la transformación de una célula anfitriona particular. "Casete de expresión" se refiere a un vector específico que contiene un gen foráneo y que tiene elementos, además del gen foráneo, que permiten una realizada expresión de ese gen en un anfitrión foráneo.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "Degeneración del codón" se refiere a la naturaleza en el código genético que permite la variación de la secuencia de nucleótidos sin afectar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado. El experto en la materia es muy consciente del "sesgo del codón" exhibido por una célula anfitriona específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Por lo tanto, cuando se sintetiza un gen para mejorar la expresión en una célula anfitriona, es deseable diseñar el gen de manera que su frecuencia de uso de codón se aproxime a la frecuencia de uso del codón preferida de la célula anfitriona.

La expresión "optimizado del codón" que se refiere a genes o regiones codificantes de moléculas de ácido nucleico para la transformación de diversos anfitriones, se refiere a la alteración de los codones en el gen o regiones codificantes de las moléculas de ácido nucleico para reflejar el uso de codones típico del organismo anfitrión sin alterar el polipéptido codificado por el ADN.

Técnicas estándar de ADN recombinante y de clonación molecular utilizadas en el presente documento son bien conocidas en la técnica y son descritas por Sambrook et al. (Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) (en adelante "Maniatis"); y por Silhavy et al. (Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY, 1984); y por Ausubel, F.M. et al., (Current Protocols in Molecular Biology, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience, 1987).

La presente invención se refiere a una necesidad que surge en la producción microbiana de isobutanol, donde la enzima cetol-ácido reductoisomerasa desempeña una función vital. Las enzimas cetol-ácido reductoisomerasa de tipo silvestre normalmente utilizan NADPH como su cofactor. Sin embargo, en la formación de isobutanol un exceso de NADH se produce por rutas metabólicas auxiliares. La invención proporciona enzimas KARI de Clase I mutantes que han evolucionado para utilizar NADH como cofactor, superando el problema del cofactor y aumentando la eficiencia de la ruta biosintética de isobutanol.

La producción de isobutanol utiliza la ruta de la glucólisis presente en el organismo anfitrión. Durante la producción de dos moléculas de piruvato a partir de glucosa durante la glucólisis, existe una producción neta de dos moléculas de NADH a partir de NAD^+ por la reacción de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Durante producción posterior de una molécula de isobutanol a partir de dos moléculas de piruvato, existe consumo neto de una molécula de NADPH, por la reacción de la KARI, y una molécula de NADH por la reacción de isobutanol deshidrogenasa. La reacción global de la glucosa a isobutanol conduce así a la producción neta de una molécula de NADH y al consumo neto de una molécula de NADPH. La intertransformación de NADH con NADPH es generalmente lenta e ineficiente; por ello, el NADPH consumido se genera por el metabolismo (por ejemplo, por la ruta del fosfato de pentosa) que consume sustrato en el proceso. Mientras tanto, la célula se esfuerza por mantener la homeostasis en la relación NAD^+/NADH , lo que lleva al exceso de NADH producido en la producción de isobutanol siendo consumido en la reducción excesiva de otros intermediarios metabólicos; p. ej., mediante la producción de lactato a partir de piruvato. Por ello, el desequilibrio entre NADH producido y NADPH consumido por la ruta de isobutanol conduce a una reducción en el rendimiento molar de isobutanol producido a partir de la glucosa de dos maneras: 1) la operación innecesaria de metabolismo para producir NADPH, y 2) reacción excesiva de intermediarios metabólicos para mantener homeostasis de NAD^+/NADH . La solución a este problema consiste en inventar una KARI que sea específica de NADH como su cofactor, de modo que ambas moléculas de NADH producidas en la glucólisis sean consumidas en la síntesis de isobutanol a partir de piruvato.

Enzimas de Cetol-ácido reductoisomerasa (KARI)

Acetohidroxiácido isomeroreductasa o cetol-ácido reductoisomerasa (KARI; EC 1.1.1.86) cataliza dos etapas en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada y es una enzima clave en su biosíntesis. KARI se encuentra en diversos organismos y las comparaciones de las secuencias de aminoácidos entre especies han revelado que existen 2 tipos de esta enzima: una forma corta (clase I) que se encuentra en los hongos y en la mayoría de las bacterias, y una forma larga (clase II) típica de las plantas.

Las KARI Clase I tienen típicamente entre 330-340 restos de aminoácidos. Las enzimas KARI de forma larga tienen alrededor de 490 restos de aminoácidos. Sin embargo, algunas bacterias tales como *Escherichia coli* poseen una forma larga, en donde la secuencia de aminoácidos difiere apreciablemente de la que se encuentra en las plantas. KARI está codificada por el gen *ilvC* y es una enzima esencial en el crecimiento de *E. coli* y otras bacterias en un medio mínimo. Típicamente KARI utiliza NADPH como cofactor y requiere un catión divalente tal como Mg^{++} para su

actividad. Además de utilizar acetolactato en la ruta valina, KARI también transforma acetohidroxibutanoato a dihidroximetilpentanoato en la ruta de producción de isoleucina.

Las KARI de Clase II consisten, generalmente en un dominio N-terminal del resto 225 y un dominio C-terminal de resto 287. El dominio N-terminal, que contiene el sitio de unión NADPH, tiene una estructura α/β y se asemeja a los dominios encontrados en otras oxidorreductasas dependientes de piridina nucleótidos. El dominio C-terminal consiste casi en su totalidad de α -hélices y es de una topología previamente desconocida.

La estructura cristalina de la enzima KARI de *E. Coli* a 2,6 Å de resolución ha sido resuelta (Tyagi, et al., Protein Science, 14, 3089-3100, 2005). Esta enzima consiste en dos dominios, uno con estructura mixta α/β que es similar a la encontrada en otras deshidrogenasas dependientes de piridina nucleótidos. El segundo dominio es principalmente α -helicoidal y muestra una fuerte evidencia de la duplicación interna. La comparación de los sitios activos de KARI de *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y espinaca mostraba que la mayoría de los restos en el sitio activo de la enzima ocupan posiciones conservadas. Mientras que la KARI de *E. Coli* se cristalizaba como un tetrámero, que es probablemente la unidad probable biológicamente activa, la KARI *P. aeruginosa* (Ahn, et al., J. Mol. Biol., 328, 505-515, 2003) formaba un dodecámero y la enzima de la espinaca formaba un dímero. Las KARI conocidas son enzimas lentas con un número de rotación informado (k_{cat}) de 2 s^{-1} (Aulabaugh et al.; Biochemistry, 29, 2824-2830, 1990) o $0,12\text{ s}^{-1}$ (Rane et al., Arch. Biochem. Biophys. 338, 83-89, 1997) para acetolactato. Los estudios han demostrado que el control genético de la biosíntesis de isoleucina-valina en *E. coli* es diferente de aquella en la *Ps. aeruginosa* (Marinus, et al., Genetics, 63, 547-56, 1969).

Identificación de sitios diana de aminoácidos para la conmutación del cofactor

Se informó que los átomos de oxígeno del fosfato p2' del NADPH forman enlaces de hidrógeno con cadenas laterales de Arg162, Ser165 y Ser167 de la KARI de la espinaca (Biou V. et al The EMBO Journal, 16: 3405-3415, 1997). Se realizaron múltiples alineamientos de secuencias, utilizando el vector NTI (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), con enzimas KARI de la espinaca, *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-KARI) y *Pseudomonas fluorescens* (PF5-KARI). Los sitios de unión de NADPH se muestran en la Figura 2a. Los aminoácidos arginina, treonina y serina parecen desempeñar funciones similares en la formación de enlaces de hidrógeno con los átomos de oxígeno de fosfato p2' de NADPH en las enzimas de la KARI. Los estudios de Ahn et al (J. Mol Biol, 328: 505-515, 2003) habían identificado tres sitios de unión de fosfato de NADPH (Arg47, Ser50 y Thr52) para *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-KARI) después de comparar su estructura con la de la KARI de la espinaca. Tomando como hipótesis que estos tres sitios de unión de fosfato de NADPH de las tres enzimas KARI utilizadas en la divulgación se conservaran, Arg47, Ser50 y Thr52 de PF5-KARI fueron direccionados como los sitios de unión fosfato para esta enzima. Esta hipótesis se confirmó, además, a través del modelado de homología.

También se realizó alineamiento múltiple de secuencias entre PF5-ilvC y varias otras enzimas KARI con especificidad de nucleótidos promiscua. Como se muestra en la Figura 2b, los aminoácidos de glicina (G50) y triptófano (W53), en otras enzimas KARI en la Figura 2b, siempre aparecen juntos como un par en las secuencias de aquellas enzimas. Se asumió, por lo tanto, que el resto voluminoso de triptófano 53 era importante en la determinación de la especificidad del nucleótido reduciendo el tamaño del bolsillo de unión de nucleótidos para favorecer al nucleótido más pequeño, NADH. La posición 53 de PF5-ilvC fue, por lo tanto, elegida como diana para la mutagénesis.

Varias genotecas de saturación del sitio se prepararon conteniendo genes que codifican enzimas KARI mediante los kits comercialmente disponibles para la generación de mutantes. Los clones de cada biblioteca fueron cribados en cuanto a la actividad KARI mejorada utilizando el ensayo de consumo de NADH descrito en el presente documento. El cribado dio como resultado la identificación de una serie de genes que tienen mutaciones que se pueden correlacionar con la actividad KARI. La ubicación de las mutaciones se identificaron utilizando la secuencia de aminoácidos de la proteína PF5 ilvC *Pseudomonas fluorescens* (ID de SEC N°: 17). Los mutantes que tienen actividad KARI mejorada eran las que tenían mutaciones en las siguientes posiciones: 47, 50, 52 y 53. Las mutaciones más específicamente deseables incluían las siguientes sustituciones:

a) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, F, G, I, L, N, P e Y;

b) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, M, N, V, W;

c) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N, S;

d) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, H, I, W;

En otra realización, la mutagénesis adicional, utilizando PCR propensa a error, realizada en los mutantes enumerados anteriormente identificó posiciones de mutación como: 156, 165, 61, 170, 115 y 24. Más específicamente los mutantes deseables con menor K_m para NADH contenía las siguientes sustituciones:

- e) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de V;
- f) el resto en la posición 165 tiene una sustitución de aminoácidos de M;
- g) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
- h) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de A;
- 5 i) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de F; y
- j) el resto en la posición 115 tiene una sustitución de aminoácidos de L.

En trabajos adicionales, se realizó el alineamiento múltiple de secuencias de PF5-ilvC *Pseudomonas fluorescens*, de ilvC1 y ilvC2 *Bacillus cereus* y de KARI de espinacas que permitió la identificación de las posiciones 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 156 y 170 para posterior mutagénesis. Más específicamente, se obtuvieron mutantes con mucha menor Km para NADH. Estas mutaciones también se basan en la enzima KARI de *Pseudomonas fluorescens*, (ID de SEC N°: 17) como una secuencia de referencia en la que la secuencia de referencia comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

- k) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de fenilalanina;
- l) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos de alanina;
- 15 m) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos de ácido aspártico;
- n) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos de alanina;
- o) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de fenilalanina;
- p) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de valina;
- q) el resto en la posición 33 tiene una sustitución de aminoácidos de leucina;
- 20 r) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos de tirosina;
- s) el resto en la posición 80 tiene una sustitución de aminoácidos de isoleucina;
- y
- t) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de la alanina.

La presente invención incluye un polipéptido mutante que tiene actividad KARI, teniendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC N°: 24, 25, 26, 27 y 28.

Una secuencia de consenso para el ilvC mutante era generada a partir del alineamiento múltiple de secuencias y se proporciona como ID de SEC N°: 29 que representa todas las mutaciones verificadas experimentalmente de la enzima KARI basadas en la secuencia de aminoácidos de la enzima KARI aislada de *Pseudomonas fluorescens*, (ID de SEC N°: 17)

Además la presente invención describe posiciones de mutación identificadas utilizando un perfil de Modelo Oculto de Markov (HMM) construido basado en secuencias de 25 enzimas KARI Clase I y Clase II funcionalmente verificadas. El perfil HMM identificó las posiciones de mutación 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156 y 170 (la numeración se basa en las secuencias de *Pseudomonas fluorescens* PF5 KARI). Por ello, el experto en la técnica comprenderá que las mutaciones en estas posiciones, así como las comentadas anteriormente que han sido verificadas experimentalmente darán lugar también a enzimas KARI que tienen la capacidad de unir NADH.

Cepas anfitrionas para ingeniería Kari

Dos cepas anfitrionas de *E. coli* TOP10, de Invitrogen y *E. coli* Bw25113 (Δ ilvC, un gen desactivado ilvC), se utilizaron para fabricar constructos que sobreexpresan la enzima KARI en esta divulgación. En la cepa Bw25113, todo el gen ilvC del cromosoma de *E. coli* fue reemplazado por una casete de Kanamicina utilizando la tecnología de recombinación de homología rojo Lambda descrita por Kirill et al., (Kirill A. Datsenko y Barry L. Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 97, 6640-6645, 2000).

Homología de modelado de PF5 KARI con sustratos ligados

La estructura de PF5-KARI con NADPH ligado, acetolactato e iones magnesio fue construida basada en la estructura cristalina de *P. aeruginosa* PAO1-KARI (PDB ID 1 NP3, Ahn H.J. et al, J. Mol. Biol., 328, 505-515, 2003), que tiene el 92% de homología de la secuencia aminoácidos con PF5 KARI. La estructura PAO1-KARI es un homododécámero y cada dodecámero consta de seis homodímeros con interfaz de dímero extensiva. El sitio activo de

KARI se encuentra en esta interfaz dímero. El conjunto biológico está formado por seis homo-dímeros situados en los bordes de un tetraedro dando como resultado un dodecámero muy simétrico de una simetría de 23 grupos puntuales. Por simplicidad, sólo la unidad dimérica (monómero A y monómero B) fue construida para el modelo de homología de PF5-KARI en este estudio debido a que el sitio activo es en la interfaz del homo-dímero.

- 5 El modelo de dímero PF5-KARI fue construido en base a las coordenadas del monómero A y del monómero B de PAO1-KARI y la secuencia de PF5-KARI utilizando un visualizador PDB DeepView/Swiss (Guex, N. y Peitsch, MC Electrophoresis 18: 2714-2723, 1997). Este modelo fue importado después para programar O (Jones, T.A. et al, Acta Crystallogr. A 47, 110-119, 1991) en un sistema Silicon Graphics para su posterior modificación.

- 10 La estructura de PAO1-KARI no tiene NADPH, sustrato o inhibidor o magnesio en el sitio activo. Por lo tanto, la estructura KARI de espinacas (PDB ID 1 yve, Biou V. et al., The EMBO Journal, 16: 3405-3415, 1997), que tiene iones magnesio, NADPH e inhibidor (N-hidroxi-N-isopropiloxamato) en el sitio de unión del acetolactato, se utilizó para modelar estas moléculas en el sitio activo. La KARI de plantas tiene homología de secuencia muy pequeña con PF5-KARI o con PAO1-KARI (identidad de aminoácidos < 20%), sin embargo, las estructuras en la región del sitio activo de estas dos enzimas KARI son muy similares. Para superponer el sitio activo de estas dos estructuras KARI, se utilizaron comandos LSQ_ext, LSQ_improve, LSQ_mol en el programa O para alinear el sitio activo de monómero A de la espinaca KARI con el monómero A del modelo PF5 KARI. Las coordenadas de NADPH, dos iones magnesio e inhibidor unido en el sitio activo de la espinaca KARI se extrajeron e incorporaron a la molécula A de PF5 KARI. Un conjunto de las coordenadas de estas moléculas se generaron para el monómero B de PF5 KARI aplicando el operador de transformación de monómero A a monómero B calculado por el programa.

- 20 Debido a que no hay NADPH en el sitio activo de la estructura cristalina PAO1 KARI, las estructuras de la región del bucle de unión de fosfato en el sitio de unión de NADPH (restos 44-45 en PAO1 KARI, 157-170 en Espinaca KARI) son muy diferentes entre los dos. Para modelar la forma ligada NADPH, el modelo del bucle de unión de fosfato PF5-KARI (44-55) fue sustituido por el de 1yve (157-170). Cualquier discrepancia de las cadenas laterales entre estas dos se transformó en las de la secuencia de PF5-KARI utilizando el comando mutate_replace en el programa O, y las conformaciones de las cadenas laterales sustituidas se ajustaron manualmente. El modelo completo PF5-KARI dimérico ligado a NADPH/Mg/inhibidor fue mediante una vuelta de minimización de energía utilizando el programa CNX (ACCELRYS San Diego CA, Burner, A.T. y Warren, G.L., Acta Crystallogr., D 54, 905-921, 1998) después de lo cual el inhibidor fue sustituido por el sustrato, acetolactato (AL), en el modelo. La conformación de AL se ajustó manualmente para favorecer la transferencia de hidruro de C4 de la nicotinamina de NADPH y el sustrato. No se realizó ninguna minimización de energía adicional en este modelo (Coordenadas del modelo creado para este estudio se adjuntan en un archivo de Word separado). Los restos en el bucle de unión a fosfato y sus interacciones con NADPH se ilustran en la Figura 3.

Aplicación de un perfil de Modelo Oculto de Markov para la identificación de posiciones de restos involucrados en la conmutación del cofactor en enzimas KARI

- 35 Los solicitantes han desarrollado un procedimiento para la identificación de enzimas KARI y las posiciones de los restos que están involucradas en la conmutación del cofactor NADPH por NADH. Para caracterizar estructuralmente las enzimas KARI, se preparó un perfil de Modelo Oculto de Markov (HMM) como se describe en el Ejemplo 5 utilizando secuencias de aminoácidos de las 25 proteínas KARI con función verificada experimentalmente como se indica en la Tabla 6. Estas KARI eran de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (ID de SEC N°: 17), *Sulfolobus solfataricus* P2 (ID de SEC N°: 13), *Pyrobaculum aerophilum* str. IM2 (ID de SEC N°: 14), *Natronomonas pharaonis* DSM 2160 (ID de SEC N°: 30), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (ID de SEC N°: 31), *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (ID de SEC N°: 32), *Phaeosporium molischianum* (ID de SEC N°: 33), *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (ID de SEC N°: 15), *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4 (ID de SEC N°: 34), *Alkalilimnicola ehrlichei* MLHE-1 (ID de SEC N°: 35), *Campylobacter lari* RM2100 (ID de SEC N°: 36), *Marinobacter aquaeolei* VT8 (ID de SEC N°: 37), *Psychrobacter arcticus* 273-4 (ID de SEC N°: 38), *Hahella chejuensis* KCTC 2396 (ID de SEC N°: 39), *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259 (ID de SEC N°: 40), *Azotobacter vinelandii* AvOP (ID de SEC N°: 41), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (ID de SEC N°: 42), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000 (ID de SEC N°: 43), *Pseudomonas putida* KT2440 (proteína con ID de SEC N°: 44), *Pseudomonas entomophila* L48 (ID de SEC N°: 45), *Pseudomonas mendocina* ymp (ID de SEC N°: 46), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ID de SEC N°: 16), *Bacillus cereus* ATCC 10987 (ID de SEC N°: 47), *Bacillus cereus* ATCC 10987 (ID de SEC N°: 48), y *Spinacia oleracea* (ID de SEC N°: 18).

- Además utilizando procedimientos descritos en esta solicitud, se pueden mencionar las secuencias de enzimas KARI Clase II tales como *E. coli* (ID de SEC N°: 63 - Número de Acceso al Banco de Genes P05793), *marine gamma Proteobacterium* HTCC2207 (ID de SEC N°: 64 - Número de Acceso al Banco de Genes ZP_01224863.1), *Desulfuromonas acetoxidans* (ID de SEC N°: 65 - Número de Acceso al Banco de Genes ZP_01313517.1) y *Pisum sativum* (pea) (ID de SEC N°: 66 - Número de Acceso al Banco de Genes 082043)

- Este perfil HMM de las KARI se puede utilizar para identificar cualquier proteína relacionada KARI. Se espera que cualquier proteína que coincida con el perfil HMM con un valor de $E < 10^{-3}$ utilizando programa de *hmmsearch* en el paquete HMMER se espera que sea una KARI funcional, que puede ser una KARI bien Clase I o bien Clase II. Las secuencias que coinciden con el perfil HMM dado en el presente documento se analizan entonces para la ubicación

de las 12 posiciones en *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 que conmutan el cofactor de NADPH por NADH. Los once nodos, tal como se define en la sección de construcción del perfil HMM, en el perfil HMM que representan las columnas del alineamiento que corresponden a las once posiciones de conmutación del co-factor en *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 KARI se identifican como nodo 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156 y 170. Las líneas correspondientes a estos nodos en el archivo del modelo son identificadas en la Tabla 9. Un experto en la técnica podrá identificar fácilmente estas 12 posiciones en la secuencia de aminoácidos de una proteína KARI a partir del alineamiento de la secuencia con el perfil HMM utilizando el programa de *hmmsearch* en el paquete *HMMER*.

Las enzimas KARI identificadas por este procedimiento, incluyen tanto las enzimas KARI de Clase I como de Clase II de fuentes naturales microbianas o de plantas. Cualquier KARI identificada por este procedimiento se puede utilizar para la expresión heteróloga en las células microbianas.

Por ejemplo, cada uno de los fragmentos de ácido nucleico que codifican KARI descrito en el presente documento pueden utilizarse para aislar genes que codifican proteínas homólogas. El aislamiento de genes homólogos utilizando protocolos dependientes de la secuencia es bien conocido en la técnica. Ejemplos de protocolos dependientes de la secuencia incluyen, pero no se limitan a: 1) procedimientos de hibridación de ácido nucleico; 2) procedimientos de amplificación de ADN y de ARN, como se ejemplifica mediante diversos usos de tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos [por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Mullis et al., patente de EE.UU. No. 4.683.202; reacción en cadena de la ligasa (LCR), Tabor, S. et al., Proc. Acad. Sci. EE.UU. 82: 1074 (1985); o amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), Walker, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89: 392 (1992)]; y 3) procedimientos de construcción de bibliotecas y detección por complementariedad.

Aunque la homología de secuencia entre las enzimas KARI de Clase I y Clase II es baja, la estructura tridimensional de ambas clases de enzimas, particularmente alrededor del sitio activo y de los dominios de unión a nucleótido está altamente conservada (Tygai, R., et al., Protein Science, 34: 399-408, 2001). Los restos de aminoácidos clave que conforman el bolsillo de unión al sustrato son altamente conservados entre estas dos clases incluso aunque no puedan alienarse bien en una simple comparación de secuencias. Puede concluirse, por lo tanto, que los restos que afectan a la especificidad del cofactor identificados en la KARI Clase I (p. ej., las posiciones 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, y 170 de PF5 KARI) pueden hacerse extensibles a las enzimas KARI Clase II.

Rutas biosintéticas del isobutanol

Los microorganismos que utilizan hidratos de carbono emplean la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la ruta de Entner y Doudoroff y el ciclo de las pentosas fosfato como las rutas metabólicas centrales, rutas metabólicas que proporcionan energía y precursores celulares para el crecimiento y el mantenimiento. Estas rutas tienen en común el intermedio gliceraldehído-3-fosfato y, en última instancia, se forma piruvato directamente o en combinación con la ruta de EMP. Posteriormente, piruvato se transforma en acetil-cofactor A (acetil-CoA) a través de una variedad de medios. Acetil-CoA sirve como un intermedio clave, por ejemplo, en la generación de ácidos grasos, aminoácidos y metabolitos secundarios. Las reacciones combinadas de transformación de azúcar en piruvato producen energía (p. ej., adenosina-5'-trifosfato, ATP) y equivalentes de reducción (por ejemplo, nicotinamida adenina dinucleótido reducida, NADH, y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida, NADPH). NADH y NADPH se deben reciclar a sus formas oxidadas (NAD^+ y NADP^+ , respectivamente). En presencia de aceptores de electrones inorgánicos (p. ej., O_2 , NO_3^- y SO_4^{2-}), los equivalentes de reducción se pueden usar para aumentar el conjunto de energía; como alternativa, se puede formar un subproducto de carbono reducido.

Hay cuatro rutas potenciales para la producción de isobutanol a partir de fuentes de hidratos de carbono con microorganismos recombinantes como se muestra en la Figura 1. Todas las rutas potenciales para la transformación de hidratos de carbono en isobutanol se han descrito en la solicitud de patente de EE.UU. de propiedad común nº 11/586315.

La ruta preferida para la transformación de piruvato a isobutanol consta de etapas enzimáticas "a", "b", "c", "d" y "e" (Figura 1) e incluye las siguientes transformaciones de sustrato a producto:

- de piruvato a acetolactato, catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa,
- de (S)-acetolactato a 2,3-dihidroxiisovalerato, catalizada, por ejemplo, por acetohidroxiácido isomeroreductasa,
- de 2,3-dihidroxiisovalerato a α -cetoisovalerato, catalizada, por ejemplo, por acetohidroxiácido deshidratasa,
- de α -cetoisovalerato a isobutiraldehído, catalizada, por ejemplo, mediante un cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, y
- isobutiraldehído a isobutanol, catalizada, por ejemplo, un alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada.

Esta ruta combina enzimas implicadas en rutas bien caracterizadas para biosíntesis de valina (piruvato a α -cetoisovalerato) y el catabolismo de valina (α -cetoisovalerato a isobutanol). Dado que muchas enzimas de biosíntesis de valina también catalizan reacciones análogas en la ruta de la biosíntesis de isoleucina, la especificidad del sustrato es una consideración importante en la selección de las fuentes de genes. Por esta razón, los genes

primarios de interés para la enzima acetolactato sintasa son los de *Bacillus* (alsS) y *Klebsiella* (budB). Estos acetolactato sintasas particulares son conocidas por participar en la fermentación butanodiol en estos organismos y muestran una mayor afinidad por piruvato en lugar de cetobutirato (Gollop y otros, J. Bacteriol 172, 3444-3449, 1990); y (Holtzclaw et al., J. Bacteriol. 121, 917-922, 1975). Las etapas de las rutas segunda y tercera son catalizadas por acetohidroxiácido reductoisomerasa y deshidratasa, respectivamente. Estas enzimas se han caracterizado a partir de una serie de fuentes, tales como por ejemplo, *E. coli* (Chunduru et al, Biochemistry 28, 486-493, 1989); y (Flint et al., J. Biol. Chem. 268, 14732-14742, 1993). Las dos etapas finales de la ruta preferida de isobutanol se sabe que ocurren en levadura, que puede utilizar valina como fuente de nitrógeno y, en el proceso, secretar isobutanol. El α -cetoisovalerato se puede transformar en isobutiraldehído mediante una serie de enzimas cetoácido descarboxilasa, tal como, por ejemplo, piruvato descarboxilasa. Para evitar la desviación de piruvato alejada de la producción de isobutanol, se desea una descarboxilasa con afinidad por piruvato disminuida. Hasta el momento, hay dos de tales enzimas conocidas en la técnica (Smit et al, Appl. Environ. Microbiol., 71, 303-311, 2005); y (de la Plaza et al., FEMS Microbiol. Lett., 238, 367-374, 2004). Ambas enzimas son de cepas de *Lactococcus lactis* y tienen una preferencia de 50-200 veces por cetoisovalerato en lugar de por piruvato. Por último, en la levadura se han identificado una serie de aldehído reductasas, muchas de ellas con especificidad de sustrato superpuesta. Las conocidas por preferir sustratos de cadena ramificada frente a acetaldehído incluyen, pero no se limitan a alcohol deshidrogenasa VI (ADH6) e Ypr1p (Larroy et al, Biochem J. 361, 163-172, 2002); y (Ford et al., Yeast 19, 1087-1096, 2002), ambos de los cuales utilizan NADPH como donante de electrones. Una reductasa dependiente de NADPH, YqhD, activa con sustratos de cadena ramificada también se ha identificado recientemente en *E. coli* (Sulzenbacher et al., J. Mol. Biol. 342, 489-502, 2004).

Dos de las otras rutas potenciales para la producción de isobutanol también contienen las tres etapas iniciales de "a", "b" y "c" (Figura 1). Una ruta consiste en etapas enzimáticas "a", "b", "c", "f", "g", "e" (Figura 1). La etapa "f" que contiene un "cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada", con un número EC 1.2.4.4. La etapa "g" que contiene un "aldehído deshidrogenasa acilante" con unos números EC 1.2.1.10 y 1.2.1.57, además de una etapa "e" que contiene el "alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada". La otra ruta potencial consiste en las etapas "a", "b", "c", "h", "i", "j", "e" (Figura 1). El término "transaminasa" (etapa "h") números EC 2.6.1.42 y 2.6.1.66. La etapa "h" consiste en bien una "valina deshidrogenasa" con números EC 1.4.1.8 y 1.4.1.9 o bien la etapa "i", una "valina descarboxilasa" con un número EC 4.1.1.14. Por último, la etapa "j" utilizará una "omega transaminasa" con un número EC 2.6.1.18 para generar isobutiraldehído que se reducirá por la etapa "e" para producir isobutanol. Todas las rutas potenciales para la transformación de piruvato en isobutanol se representan en la Figura 1.

Además, una serie de organismos se sabe que producen butirato y/o butanol a través de un intermedio de butiril-CoA (Dürre, et al, FEMS Microbiol Rev. 17, 251-262, 1995); y (Abbad-Andaloussi et al., Microbiology 142, 1149-1158, 1996). Por lo tanto la producción de isobutanol en estos organismos se llevará a cabo utilizando las etapas "k", "g" y "e" mostradas en la Figura 1. La etapa "k" utilizará un "mutasa isobutiril CoA" con un número EC 5.4.99.13. La siguiente etapa implicará utilizar el "aldehído deshidrogenasa acilante" con los números EC 1.2.1.10 y 1.2.1.57 para producir isobutiraldehído seguido por la etapa "e" enzimática para producir isobutanol. Todas estas rutas se describen completamente en la solicitud de patente de propiedad común CL3243.

Por ello, en la provisión de múltiples rutas recombinantes de piruvato a isobutanol, existe una serie de opciones para cumplir con las etapas de transformación individuales, y la persona experta en la técnica podrá utilizar las secuencias disponibles al público para construir las rutas relevantes.

Anfitriones Microbianos para Producción de Isobutanol

Los anfitriones microbianos para la producción de isobutanol se pueden seleccionar de bacterias, cianobacterias, hongos filamentosos y levaduras. El anfitrión microbiano utilizado para la producción de isobutanol debe ser tolerante a isobutanol manera que el rendimiento no esté limitado por la toxicidad del butanol. Los microbios que son metabólicamente activos a elevados niveles de titulación de isobutanol no son bien conocidos en la técnica. Aunque se han aislado mutantes tolerantes al butanol a partir de solventogénesis de *Clostridia*, poca información hay disponible sobre la tolerancia a butanol de otras cepas bacterianas potencialmente útiles. La mayoría de los estudios sobre la comparación de la tolerancia al alcohol en bacterias sugieren que butanol es más tóxico que etanol (de Cavalho, et al., Microsc. Res. Tech. 64, 215-222, 2004) y (Kabelitz, et al., FEMS Microbiol. Lett. 220, 223-227, 2003, Tomas, et al. J. Bacteriol. 186, 2006-2018, 2004) informan que el rendimiento de 1-butanol durante la fermentación en *Clostridium acetobutylicum* puede estar limitada por la toxicidad de 1-butanol. El efecto primario de 1-butanol en *Clostridium acetobutylicum* es la interrupción de las funciones de la membrana (Hermann et al., Appl. Environ. Microbiol., 50, 1238-1243, 1985).

Los anfitriones microbianos seleccionados para la producción de isobutanol deben ser tolerantes a isobutanol y deberían ser capaces de transformar los hidratos de carbono en isobutanol. Los criterios para la selección de anfitrionas microbianas adecuadas incluyen los siguientes: tolerancia intrínseca a isobutanol, alta tasa de utilización de la glucosa, disponibilidad de las herramientas genéticas para la manipulación de genes y capacidad para generar alteraciones cromosómicas estables.

Cepas anfitrionas adecuadas con tolerancia a isobutanol se pueden identificar mediante el cribado basado en la tolerancia intrínseca de la cepa. La tolerancia intrínseca de los microbios a isobutanol se puede medir determinando

la concentración de isobutanol que es responsable de la inhibición del 50% de la tasa de crecimiento (IC_{50}) cuando se cultiva en un medio mínimo. Los valores de IC_{50} se pueden determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los microbios de interés pueden ser cultivados en presencia de diversas cantidades de isobutanol y la tasa de crecimiento controlada midiendo la densidad óptica a 600 nanómetros. El tiempo de duplicación puede calcularse a partir de la parte logarítmica de la curva de crecimiento y utilizarse como una medida de la tasa de crecimiento. La concentración de isobutanol que produce una inhibición del 50% del crecimiento se puede determinar a partir de un gráfico de la inhibición porcentual del crecimiento frente a la concentración de isobutanol. Preferiblemente, la cepa anfitriona debe tener una IC_{50} para isobutanol de más de aproximadamente 0,5%.

La anfitriona microbiana en la producción de isobutanol también debería utilizar la glucosa a una tasa elevada. La mayoría de los microbios son capaces de utilizar hidratos de carbono. Sin embargo, ciertos microbios del ambiente no pueden utilizar los hidratos de carbono con alta eficiencia y, por lo tanto, no serían anfitriones adecuados.

La capacidad de modificar genéticamente la anfitriona es esencial para la producción de cualquier microorganismo recombinante. El modo de la tecnología de transferencia de genes puede ser por electroporación, conjugación, transducción o transformación natural. Se dispone de una amplia gama de plásmidos conjugados anfitriones y marcadores de resistencia a los medicamentos. Los vectores de clonación se adaptan a las organismos anfitriones basado en la naturaleza de los marcadores con resistencia a los antibióticos que pueden funcionar en ese anfitrión.

El anfitrión microbiano también tiene que ser manipulado con el fin de desactivar las rutas que compiten en el flujo de carbono eliminando varios genes. Esto requiere la disponibilidad tanto de transposones para desactivación directa como vectores de integración cromosómica. Además, la anfitriona de producción debe ser susceptible de mutagénesis química por lo que se puede obtener mutaciones que mejoren la tolerancia intrínseca de isobutanol.

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

Construcción de un anfitrión de producción

Organismos recombinantes que contienen los genes necesarios que codificarán la ruta enzimática para la transformación de un sustrato de carbono fermentable a isobutanol puede construirse utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. En la presente invención, los genes que codifican las enzimas de una de las rutas de biosíntesis de isobutanol de la invención, por ejemplo, acetolactato sintasa, acetohidroxiácido isomeroeductasa, acetohidroxiácido deshidratasa, α -cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, y alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada, se pueden aislar de varias fuentes, como se describió anteriormente.

Los procedimientos de obtención de los genes deseados a partir de un genoma bacteriano son frecuentes y bien conocidos en la técnica de la biología molecular. Por ejemplo, si se conoce la secuencia del gen, pueden crearse genotecas adecuadas por digestión con endonucleasas de restricción y se pueden cribar con sondas complementarias a la secuencia del gen deseado. Una vez que se aísla la secuencia, el ADN puede ser amplificado utilizando procedimientos estándares de amplificación dirigida al cebador tal como la reacción en cadena de la polimerasa (patente de EE.UU. n° 4.683.202) para obtener cantidades de ADN adecuado para la transformación utilizando vectores apropiados. Las herramientas para la optimización de codones para la expresión en un anfitrión heterólogo están fácilmente disponibles. Algunas herramientas para la optimización de codones están disponibles basadas en el contenido de GC del organismo anfitrión.

Una vez que se identifican los genes de la ruta relevante y se aíslan pueden ser transformados en adecuados anfitriones de expresión por medios bien conocidos en la técnica. Los vectores o casetes útiles para la transformación de una variedad de células anfitrionas son comunes y disponibles comercialmente de compañías tales como EPICENTRE® (Madison, WI), Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA), Stratagene (La Jolla, CA), y New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). Típicamente, el vector o casete contiene secuencias que dirigen la transcripción y traducción del gen relevante, un marcador seleccionable, y secuencias que permiten la replicación autónoma o la integración cromosómica. Los vectores adecuados comprenden una región 5' del gen que alberga controles de iniciación de la transcripción y una región 3' del fragmento de ADN que controla la terminación de la transcripción. Ambas regiones de control se pueden derivar de genes homólogos a la célula anfitriona transformada, aunque se debe entender que tales regiones de control también se pueden derivar de genes que no son nativos para la especie específica escogida como anfitriona de producción.

Regiones o promotores de control de la iniciación, que son útiles para dirigir la expresión de las regiones codificantes de la ruta relevante en la célula anfitriona deseada son numerosas y familiares para los expertos en la técnica. Prácticamente cualquier promotor capaz de conducir estos elementos genéticos es adecuado para la presente

invención incluyendo, pero sin limitarse a CYC1, HIS3, GAL1, GAL10, ADH1, PGK, PH05, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TPI (útiles para la expresión en *Saccharomyces*); AOX1 (útil para la expresión en *Pichia*); y lac, ara, tet, trp, IP_L, IP_R, T7, tac y trc (útiles para la expresión en *Escherichia coli*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas*), así como los promotores amy, abr y npr, y diversos promotores de fagos útiles para la expresión en *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Paenibacillus macerans*.

Regiones de control de terminación también se pueden derivar de diversos genes nativos para los anfitriones preferidos. Opcionalmente, un sitio de terminación puede ser innecesario, sin embargo, es más preferido si está incluido.

Ciertos vectores son capaces de replicarse en una amplia gama de bacterias anfitrionas y se pueden transferir por conjugación. Están disponibles la secuencia completa y anotada de pRK404 y las de tres vectores relacionados, pRK437, pRK442 y pRK442(H). Estos derivados han demostrado ser valiosas herramientas para la manipulación genética en bacterias Gram-negativas (Scott et al., Plasmid 50, 74-79, 2003). Varios derivados del plásmido de la amplia gama de anfitriones Inc P4 plasmid RSF1010 también están disponibles con promotores que pueden funcionar en una gama de bacterias Gram-negativas. Los plásmidos pAYC36 y pAYC37 tienen promotores activos junto con sitios de clonación múltiple para permitir la expresión de genes heterólogos en bacterias Gram-negativas.

También están ampliamente disponibles herramientas para la sustitución cromosómica de los genes. Por ejemplo, una variante termosensible del replicón pWV101 de una amplia gama de anfitrionas se ha modificado para construir un plásmido pVE6002 que se puede utilizar para efectuar la sustitución de genes en una gama de bacterias Gram-positivas (Maguin et al., J. Bacteriol. 174, 5633-5638, 1992). Además, se dispone de transposomas in vitro para crear mutaciones aleatorias en una variedad de genomas de fuentes comerciales tales como EPICENTRE®.

La expresión de una ruta de biosíntesis de isobutanol en varios anfitrionas microbianas preferidas se describe con más detalle a continuación.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en *E. coli*

Los vectores o casetes útiles para la transformación de *E. coli* son comunes y disponibles comercialmente de las empresas enumeradas anteriormente. Por ejemplo, los genes de una ruta biosintética de isobutanol se pueden aislar de diversas fuentes, clonado en un vector pUC19 modificado y transformado en *E. coli* NM522.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en *Rhodococcus erythropolis*

Una serie de vectores lanzadera *E. coli*-*Rhodococcus* están disponibles para la expresión en *R. erythropolis*, que incluyen, pero no se limitan a pRhBR17 y pDA71 (Kostichka et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 62, 61-68, 2003). Además, una serie de promotores están disponibles para la expresión génica heteróloga en *R. erythropolis* (Nakashima et al., Appl. Environ. Microbiol. 70, 5557-5568, 2004 y Tao et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 68, 346-354, 2005). La disrupción de genes diana de los genes cromosómicos en *R. erythropolis* puede ser creada utilizando el procedimiento descrito por Tao et al., supra, y Brans et al. (Appl. Environ. Microbiol. 66, 2029-2036, 2000).

Los genes heterólogos requeridos para la producción de isobutanol, como se describió anteriormente, pueden ser clonado inicialmente en pDA71 o pRhBR71 y transformados en *E. coli*. Los vectores pueden después ser transformados en *R. erythropolis* mediante electroporación, como se describe por Kostichka et al., supra. Los recombinantes pueden cultivarse en un medio sintético que contiene glucosa y la producción de isobutanol se puede seguir utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en *B. subtilis*

Los procedimientos para la expresión génica y la creación de mutaciones en *B. subtilis* son también bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los genes de una ruta biosintética de isobutanol se pueden aislar de diversas fuentes, clonados en un vector pUC19 modificado y transformados en *Bacillus subtilis* BE1010. Además, los cinco genes de una ruta biosintética de isobutanol se pueden dividir en dos operones para la expresión. Los tres genes de la ruta (bubB, ilvD y kivD) pueden integrarse en el cromosoma de *Bacillus subtilis* BE1010 (Payne, et al., J. Bacteriol. 173, 2278-2282, 1991). Los dos genes restantes (ilvC y bdhB) pueden clonarse en un vector de expresión y transformarse en la cepa de *Bacillus* que lleva los genes de isobutanol integrados.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en *B. licheniformis*

La mayoría de los plásmidos y vectores lanzadera que se replican en *B. subtilis* pueden utilizarse para transformar *B. licheniformis* por cualquier transformación o electroporación de protoplastos. Los genes requeridos para la producción de isobutanol se pueden clonar en plásmidos pBE20 o derivados de pBE60 (Nagarajan et al., Gene 114, 121-126, 1992). Los procedimientos para transformar *B. licheniformis* son conocidos en la técnica (Fleming et al. Appl. Environ. Microbiol., 61, 3775-3780, 1995). Los plásmidos construidos para expresión en *B. subtilis* pueden ser transformados en *B. licheniformis* para producir una anfitriona microbiana recombinante que produce isobutanol.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en *Paenibacillus macerans*

Los plásmidos pueden construirse como se describió anteriormente para expresión en *B. subtilis* y se utilizaron para transformar *Paenibacillus macerans* por transformación de protoplastos para producir una anfitriona microbiana recombinante que produce isobutanol.

Expresión de la ruta biosintética de isobutanol en *Alcaligenes (Ralstonia) eutrophus*

- 5 Los procedimientos para la expresión génica y la creación de mutaciones en *Alcaligenes eutrophus* son conocidos en la técnica (Taghavi et al., Appl. Environ. Microbiol., 60, 3585-3591, 1994). Los genes para una ruta biosintética de isobutanol se pueden clonar en cualquiera de los vectores de amplia gama de anfitriones descritos anteriormente, y electroporados para generar recombinantes que producen isobutanol. La ruta de poli(hidroxibutirato) en *Alcaligenes* se ha descrito en detalle, una variedad de técnicas genéticas para modificar el genoma de *Alcaligenes eutrophus* es conocido, y esas herramientas se pueden aplicar para la ingeniería de una ruta biosintética de isobutanol.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en *Pseudomonas putida*

- 15 Los procedimientos para la expresión génica en *Pseudomonas putida* son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ben-Bassat et al., patente de EE.UU. No. 6.586.229, que se incorpora en el presente documento como referencia). Los genes de la ruta del butanol se pueden insertar en pPCU18 y este ADN ligado se puede someter a electroporación en células electrocompetentes *Pseudomonas putida* DOT-T1 C5aAR1 para generar recombinantes que producen isobutanol.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en *Saccharomyces cerevisiae*

- 20 Los procedimientos para la expresión génica en *Saccharomyces cerevisiae* son conocidos en la técnica (p. ej., Methods in Enzymology, volumen 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular and cell Biology, Part A, 2004, Christine Guthrie y Gerald R. Fink, eds., Elsevier Académico Press, San Diego, CA). La expresión de genes en la levadura requiere típicamente un promotor, seguido por el gen de interés, y un terminador de la transcripción. Se puede utilizar una serie de promotores de levadura en la construcción de casetes de expresión para los genes que codifican una ruta biosintética de isobutanol, que incluyen, pero no se limita a promotores constitutivos FBA, GPD, ADH1 y GPM, y los promotores inducibles GAL1, GAL10, CUP1. Terminadores de la transcripción adecuados incluyen, pero no se limitan a FBAT, GPDt, GPMT, ERG10t, GAL1t, CYC1 y ADH1. Por ejemplo, promotores adecuados, terminadores de la transcripción, y los genes de una ruta biosintética de isobutanol se pueden clonar en vectores lanzadera de *E. coli*-levadura.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol de *Lactobacillus plantarum*

- 30 El género *Lactobacillus* pertenece a la familia Lactobacillales y muchos plásmidos y vectores utilizados en la transformación de *Bacillus subtilis* y *Streptococcus* pueden ser usados para *Lactobacillus*. Ejemplos no limitantes de vectores adecuados incluyen pAM β 1 y sus derivados (Renault et al, Gene 183, 175-182, 1996); y (O'Sullivan et al, Gene 137, 227-231, 1993.); pMBB1 y pHW800, un derivado de pMBB1 (Wyckoff et al, Appl Environ Microbiol 62, 1481-1486, 1996); pMG1, un plásmido conjugativo (Tanimoto et al, J. Bacteriol 184, 5800-5804, 2002); pNZ9520 (Kleerebezem et al, Appl Environ Microbiol 63, 4581-4584, 1997); pAM401 (Fujimoto et al, Appl Environ Microbiol 67, 1262-1267, 2001); y pAT392 (Arthur et al., Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1899-1903, 1994). Varios plásmidos de *Lactobacillus plantarum* también han sido informados (van Kranenburg R, et al. Appl. Environ. Microbiol. 71, 1223-1230, 2005).

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en varias especies de *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. faecalis*)

- 40 El género *Enterococcus* pertenece a la familia Lactobacillales y muchos plásmidos y vectores utilizados en la transformación de las especies Lactobacilli, Bacilli y Streptococci pueden ser utilizados para la especie *Enterococcus*. Los ejemplos no limitantes de vectores adecuados incluyen pAM β 1 y sus derivados (Renault et al., Gene 183, 175-182, 1996.); y (O'Sullivan et al, Gene 137, 227-231, 1993); pMBB1 y pHW800, un derivado de pMBB1 (Wyckoff et al Appl Environ Microbiol 62, 1481-1486, 1996); pMG1, un plásmido conjugativo (Tanimoto et al, J. Bacteriol 184, 5800-5804, 2002.); pNZ9520 (Kleerebezem et al., Appl Environ Microbiol 63, 4581-4584, 1997); pAM401 (Fujimoto et al, Appl Environ Microbiol 67, 1262-1267, 2001); y pAT392 (Arthur et al., Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1899-1903, 1994). También pueden utilizarse los vectores de expresión para *E. faecalis* que utilizan el gen *nisA* de *Lactococcus* (Eichenbaum et al., Appl. Environ. Microbiol., 64, 2763-2769, 1998). Además, pueden utilizarse vectores para la sustitución de genes en el cromosoma *E. faecium* (Nallaapareddy et al., Appl. Environ. Microbiol., 72, 334-345, 2006).

Medios de Fermentación

- 55 Los medios de fermentación en la presente invención deben contener sustratos de carbono adecuados. Los sustratos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a monosacáridos tales como glucosa y fructosa, oligosacáridos tales como lactosa o sacarosa, polisacáridos tales como almidón o celulosa o mezclas de los mismos y mezclas no purificadas a partir de materias primas renovables tales como permeato de suero de queso, licor de maíz fermentado, melazas de remolacha azucarera y malta de cebada. Además, el sustrato de carbono puede ser

también sustratos tal como dióxido de carbono, o metanol para el que se ha demostrado la transformación metabólica en intermediarios bioquímicos claves. Además de sustratos de carbono uno y dos los organismos metilotróficos son también conocidos por utilizar una serie de otros compuestos que contienen carbono tales como metilamina, glucosamina y una variedad de aminoácidos para actividad metabólica. Por ejemplo, se conoce la levadura metilotrófica por utilizar el carbono de la metilamina para formar trehalosa o glicerol (Bellion et al., *Microb. Growth C1 Compd.*, [Int. Symp.], 7^o (1993), 415-432. (eds): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: Intercept, Andover, Reino Unido). Del mismo modo, diversas especies de *Candida* metabolizarán la alanina o el ácido oleico (Sulter et al., *Arch. Microbiol.*, 153, 485-489, 1990). Por lo tanto, se contempla que la fuente de carbono utilizada en la presente invención puede abarcar una amplia variedad de sustratos que contienen carbono y solamente estará limitado por la elección del organismo.

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

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

Condiciones de cultivo

Normalmente las células se cultivan a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25°C a 40°C, en un medio apropiado. Medios de crecimiento adecuados en la presente invención son medios comunes preparados comercialmente, tales como el caldo de cultivo Luria Bertani (LB), Sabouraud Dextrosa (SD) o el caldo de cultivo Yeast medium (YM). Otros medios de cultivo definidos o sintéticos también pueden utilizarse y el medio apropiado para el cultivo del microorganismo particular será conocido por el experto en la técnica de la microbiología o de la ciencia de la fermentación. El uso de agentes conocidos para modular la represión del catabolito directa o indirectamente, p. ej., adenosin-2',3'-monofosfato cíclica (cAMP), también se pueden incorporar en el medio de fermentación.

Los intervalos de pH adecuados para la fermentación están entre pH 5,0 y pH 9,0, donde se prefiere pH 6,0 a pH 8,0 para el estado inicial.

Las fermentaciones se pueden realizar en condiciones aerobias o anaerobias, donde se prefieren las condiciones anaerobias o microaerobias.

Fermentaciones industriales por lote y en continuo

El presente proceso emplea un procedimiento de fermentación por lotes. Una fermentación por lotes clásica es un sistema cerrado donde la composición del medio se fija al comienzo de la fermentación y no está sujeta a alteraciones artificiales durante la fermentación. Por ello, al comienzo de la fermentación el medio se inocula con el organismo u organismos deseados, y se permite que la fermentación tenga lugar sin añadir nada al sistema. Típicamente, sin embargo, una fermentación "por lotes" es por lotes con respecto a la adición de fuente de carbono y a menudo se hacen intentos de controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. En los sistemas por lotes las composiciones de metabolito y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en que se detiene la fermentación. Dentro de los cultivos por lotes, las células se moderan a través de una fase de latencia estática hasta una fase log de gran desarrollo y finalmente a una fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento disminuye o se detiene. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria finalmente morirán. Las células en la fase log son responsables en general de la mayor parte de la producción del producto final o del intermedio.

Una variación en el sistema por lotes estándar es el sistema de lote alimentado. Los procesos de fermentación de lote alimentado son también adecuados en la presente invención y comprenden un típico sistema por lotes con la excepción de que el sustrato se añade en incrementos a medida que progresa la fermentación. Los sistemas de lote alimentado son útiles cuando la represión de catabolito es apta para inhibir el metabolismo de las células y donde es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en los medios. La medición de la concentración de sustrato real en los sistemas de lote alimentado por lotes es difícil y por lo tanto se estima sobre la base de los cambios de factores medibles tales como el pH, el oxígeno disuelto y la presión parcial de gases residuales tales como CO₂. Las fermentaciones por lotes y por lote alimentado son comunes y bien conocidas en la técnica y los ejemplos se pueden encontrar en Thomas D. Brock en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Segunda Edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, o Deshpande, Mukund (*Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36, 227, 1992).

Aunque la presente invención se realiza en modo por lotes se contempla que el procedimiento sería adaptable a procedimientos de fermentación continua. La fermentación continua es un sistema abierto donde se añade un medio de fermentación definido continuamente a un biorreactor y una cantidad igual de medio acondicionado se elimina simultáneamente durante el procesamiento. La fermentación continua mantiene generalmente los cultivos a una alta densidad constante donde las células están principalmente en crecimiento en fase log.

La fermentación continua permite la modulación de un factor o de cualquier número de factores que afectan el

crecimiento celular o la concentración de producto final. Por ejemplo, un procedimiento mantendrá un nutriente limitante tal como la fuente de carbono o el nivel de nitrógeno a una tasa fija y permite que los otros parámetros se moderen. En otros sistemas, una serie de factores que afectan al crecimiento puede ser continuamente alterado mientras la concentración celular, medida por la turbidez media, se mantiene constante. Los sistemas continuos se esfuerzan por mantener condiciones de crecimiento en estado estacionario y así la pérdida celular debida al medio que es retirado debe equilibrarse frente al crecimiento celular en la fermentación. Los procedimientos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para los procesos de fermentación continua así como las técnicas para maximizar la tasa de formación de producto son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial y una variedad de procedimientos son detallados por Brock, supra.

- 10 Se contempla que la presente invención puede ponerse en práctica utilizando procesos bien por lotes, por lotes alimentados o en continuo, y que cualquier modo conocido de fermentación sería adecuado. Adicionalmente, se contempla que las células pueden inmovilizarse en un sustrato como catalizadores de células enteras y someterse a condiciones de fermentación para la producción de isobutanol.

Procedimientos para el aislamiento del isobutanol del medio de fermentación

- 15 El isobutanol producido biológicamente puede ser aislado del medio de fermentación utilizando procedimientos conocidos en la técnica para fermentaciones acetona-butanol-etanol (ABE) (véase, por ejemplo, Durre, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, 639-648, 1998), y (Groot et al., Proceso. Biochem. 27, 61-75, 1992 y referencias en el mismo). Por ejemplo, los sólidos pueden ser eliminados del medio de fermentación por centrifugación, filtración, decantación y el isobutanol puede ser aislado del medio de fermentación utilizando procedimientos tales como
20 destilación, destilación azeotrópica, extracción líquido-líquido, adsorción, extracción de gas, evaporación por membrana o pervaporación.

Ejemplos

La presente invención se define adicionalmente en los siguientes Ejemplos. Debe entenderse que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan solo a modo de ilustración.

- 25 Procedimientos generales:

Las técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular estándares utilizadas en los Ejemplos son bien conocidas en la técnica y se describen por Sambrook, J., Fritsch, EF y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, por T.J. Silhavy, M.L. Bannan y L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1984, y por Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience, NY, 1987. Materiales y procedimientos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de cultivos bacterianos son bien conocidos en la técnica. Las técnicas adecuadas para utilizar en los siguientes ejemplos se pueden encontrar en el Manual of Methods for General Bacteriology, Philipp Gerhardt, RGE Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Phillips, eds., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1994, o por Thomas D. Brock en Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Segunda Edición, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 1989. Todos los reactivos, las enzimas de restricción y los materiales utilizados para el crecimiento y mantenimiento de las células bacterianas se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), BD Diagnostic Systems (Sparks, MD.), Life Technologies (Rockville, MD.), o Sigma Chemical Company (San Luis, MO), a menos que se especifique lo contrario.

- 40 El significado de las abreviaturas utilizadas es el siguiente: "Å" significa Angstrom, "min" significa minuto (o minutos), "h" significa hora (u horas), "µl" significa microlitro (o microlitros), "ng/µl" significa nanogramos por microlitro, "pmol/µl" significa picomol por microlitro, "ml" significa mililitro (o mililitros), "l" significa litro (o litros), "g/l" significa gramo por litro, "ng" significa nanogramo, "s" significa segundo (o segundos), "ml/min" significa mililitro por minuto (o por minutos), "w/v" significa peso por volumen, "v/v" significa volumen por volumen, "nm" significa nanometro (o nanómetros), "mm" significa milímetro (o milímetros), "cm" significa centímetro (o centímetros) "mM" se refiere a milimolar, "M" significa molar, "mmol" se refiere a milimol (o milimoles), "µmol" significa micromol (o micromoles), "g" significa gramo (o gramos), "µg" se refiere a microgramo (o microgramos), "mg" significa miligramo (o miligramos), "g" se refiere a la constante de la gravitación, "rpm" significa revoluciones por minuto, "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento "MS" se refiere a espectrometría de masas, "HPLC/MS" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas, "AEDT" significa ácido etilendiaminotetraacético,
50 "dNTP" significa desoxinucleótido trifosfato.

Los cebadores de oligonucleótidos utilizados en los siguientes Ejemplos se han descrito en el presente documento (véase la Tabla 1)

Ensayo de cribado de alto rendimiento de genotecas

- 55 El cribado de alto rendimiento de las genotecas de enzimas KARI mutantes se realizó como se describe en el presente documento: 10 × medio de congelación que contiene 554,4 g/l de glicerol, (NH₄)₂SO₄ 68 mM, MgSO₄ 4 mM, citrato de sodio 17 mM, KH₂PO₄ 132 mM, K₂HPO₄ 36 mM se preparó con agua pura molecular y esterilizada

por filtración. Se preparó medio de congelación diluyendo el medio de congelación 10 veces con el medio LB. Una alícuota (200 μ l) del medio de congelación se utilizó para cada pocillo de las placas de archivo de 96 pocillos (n° de Catálogo 3370, Corning Inc. Corning, NY).

Se seleccionaron clones de las placas de agar LB y se inocularon en las placas de archivo de 96 pocillos que contenían el medio de congelación y se cultivaron durante la noche a 37°C sin agitación. Las placas de archivo a continuación, se almacenaron a -80°C. La cepa E coli Bw25113 transformada con pBAD-HisB (Invitrogen) se utilizó siempre como control negativo. Para las bibliotecas C, E, F y G, se utilizó T52D mutante de (PF5-ilvC) como control positivo. El T52D mutante era un mutante de PF5-ilvC en el que la treonina en la posición 52 se cambió por ácido aspártico. Para biblioteca H, C3B11 mutante (R47F/S50A/T52D/v53W de PF5-ilvC) se utilizó como control positivo.

Los clones de placas de archivos se inocularon en los pocillos de 96 de profundidad. Cada pocillo contenía 3.0 μ l de células a partir de placas de archivos descongeladas, 300 μ l de medio LB que contenía 100 mg/ml de ampicilina y 0,02% (peso/vol.) de arabinosa como inductor. Las células se cultivaron durante la noche a 37°C con 80% de humedad con agitación (900 rpm), se recogieron por centrifugación (4.000 rpm, 5 min a 25°C). (centrífuga Eppendorf, Brinkmann Instruments, Inc. Westbury, NY) y el sedimento celular se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

El sustrato de ensayo, (R,S)-acetolactato, se sintetizó como se describió por Aulabaugh y Schloss (Aulabaugh y Schloss, Biochemistry, 29, 2824-2830, 1990): 1,0 g de éster etílico del ácido 2-acetoxi-2-metil-3-oxobutírico (Aldrich, Milwaukee, WI) se mezcló con 10 ml de NaOH (1,0 M) y se agitó a temperatura ambiente. Cuando el pH de la solución se hizo neutro, NaOH adicional se añadió lentamente hasta que se mantuvo pH~8,0. Todos los otros productos químicos utilizados en el ensayo fueron adquiridos de Sigma.

La transformación enzimática de acetolactato a α,β -dihidroxi-isovalerato por KARI fue seguido por la medición de la desaparición del cofactor, NADPH o NADH, a partir de la reacción a 340 nm utilizando un lector de placas (Molecular Device, Sunnyvale, CA). La actividad se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de 6220 M⁻¹cm⁻¹, ya sea para NADPH o NADH. Las soluciones madre utilizadas fueron: K₂HPO₄ (0,2 M); KH₂PO₄ (0,2 M); AEDT (0,5 M); MgCl₂ (1,0 M); NADPH (2,0 mM); NADH (2,0 mM) y acetolactato (45 mM). Se prepararon 100 ml de la mezcla madre del tampón de reacción que contenía: 4,8 ml K₂HPO₄, KH₂PO₄ 0,2 ml, 4,0 ml de MgCl₂, 0,1 ml de AEDT y 90,9 ml de agua.

El sedimento celular congelado en placas de pocillos hondos y BugBuster se calentaron a temperatura ambiente durante 30 min, al mismo tiempo. Cada pocillo de las placas de ensayo de 96 pocillos se llenó con 120 μ l de tampón de reacción y 20 μ l de NADH (2,0 mM), se añadieron 150 μ l de BugBuster a cada pocillo después de 30 min de calentamiento y las células se suspendieron utilizando Genmate (Tecan Systems Inc. de San José, CA.) pipeteando la suspensión de células arriba y abajo ($\times$ 5). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min y después se calentaron a 60°C durante 10 min. Los restos celulares y los precipitados de proteínas se separaron por centrifugación a 4.000 rpm durante 5 min a 25°C. Una alícuota (50 μ l) del sobrenadante se transfirió a cada pocillo de placas de ensayo de 96 pocillos, la solución se mezcló y las burbujas se separaron por centrifugación a 4.000 rpm a 25°C durante 1 min. La absorbancia a 340 nm se registró como fondo, a cada pocillo se añadieron 20 μ l de acetolactato (4,5 mM, diluido con tampón de reacción) y se mezclaron con agitación por el lector de placas. La absorbancia a 340 nm fue recodificado a 0, y 60 minutos después de la adición del sustrato. Se utilizó la diferencia en la absorbancia (antes y después de la adición del sustrato) para determinar la actividad de los mutantes. Los mutantes con mayor actividad KARI en comparación con el tipo silvestre fueron seleccionados para recibidos.

Aproximadamente 5.000 clones fueron cribados para la biblioteca C y 360 de mejor desempeño fueron seleccionados para volver a cribar. Aproximadamente 92 clones fueron cribados para la biblioteca E y 16 de mejor desempeño fueron seleccionados para volver a cribar. Aproximadamente 92 clones fueron cribados para la biblioteca F y 8 de mejor desempeño fueron seleccionados para volver a cribar. Aproximadamente 92 clones fueron cribados para la biblioteca G y 20 de mejor desempeño fueron seleccionados para volver a cribar. Aproximadamente 8.000 clones fueron cribados para la biblioteca H y 62 de mejor desempeño fueron seleccionados para volver a cribar.

Para la biblioteca C, aproximadamente 360 de mejor desempeño se volvieron a cribar utilizando el mismo procedimiento que para el cribado general. Entre ellos, se seleccionaron más de 45 de mejor desempeño para volver a cribar como se describe a continuación.

Ensayo secundario de mutantes activos

Las células que contienen pBAD-ilvC y sus mutantes identificados por cribado de alto rendimiento se cultivaron durante la noche, a 37°C, en 3,0 ml del medio LB que contiene 100 μ g/ml de ampicilina y 0,02% (peso/vol.) de arabinosa como el inductor mientras se agita a 250 rpm. Después, las células se recogieron por centrifugación a 18.000 g durante 1 min a temperatura ambiente (micro-centrífuga modelo 1-15 de Sigma, Laurel, MD.). Los sedimentos celulares se resuspendieron en 300 μ l de BugBuster Master Mix (EMD Chemicals). La mezcla de reacción se incubó primero a temperatura ambiente durante 20 min y después se calentó a 60°C durante 10 min. Los restos celulares y el precipitado de proteínas se eliminaron por centrifugación a 18.000 g durante 5 min a

temperatura ambiente.

El tampón de reacción (120 μ l), preparado como se ha descrito anteriormente se mezcló con patrón bien de NADH o bien de NADPH (20 μ l) y el extracto de células (20 μ l) en cada pocillo de una placa de ensayo 96 pocillos. La absorbancia a 340 nm a 25°C se registró como absorbancia de fondo. A continuación, 20 μ l de acetolactato (4,5 mM, se diluyeron con tampón de reacción) se añadió a cada pocillo y se mezclaron con agitación por el lector de placas. Se registró la absorbancia a 340 nm a 0 min, 2 min y 5 min después de la adición de acetolactato. Se utilizó la diferencia de absorbancia antes y después de añadir el sustrato para determinar la actividad de los mutantes. Los mutantes con alta actividad se seleccionaron para la secuenciación.

Se identificaron y secuenciaron (Fig. 4) cinco de mejor desempeño de la "Biblioteca C". El de mejor desempeño era el mutante R47F/S50A/T52D/V53W, que invirtió por completo la especificidad de los nucleótidos. Los de mejor desempeño de las "Bibliotecas E, F y G" eran R47P, S50D y T52D respectivamente (Fig. 5). Para la "Biblioteca H", se identificaron y secuenciaron 5 de los de mejor desempeño (Fig. 6) y el de mejor desempeño era R47P/S50G/T52D, que también invirtió por completo la especificidad de los nucleótidos. Las enzimas que contienen actividades superiores que el fondo se consideraron positivas.

Ensayo de la enzima KARI

La actividad de la enzima KARI se puede medir de forma rutinaria por oxidación de NADH o de NADPH como se ha descrito anteriormente, sin embargo para medir la formación del producto 2,3-dihidroxi-isovalerato directamente, el análisis de la reacción se realizaba mediante LC/MS.

La concentración de proteínas del extracto celular crudo de células lisadas Bugbuster (como se describió anteriormente) se midió utilizando el reactivo de ensayo de proteínas BioRad (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547). Se añadió un total de 0,5 microgramos de proteínas del extracto crudo a un tampón de reacción que consiste en HEPES-KOH 100 mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 10 mM, glucosa-6-fosfato 1 mM (Sigma-Aldrich), 0,2 unidades de glucosa Leuconostoc mesenteroides 6-fosfato deshidrogenasa (Sigma-Aldrich), y diversas concentraciones de NADH o NADPH, hasta un volumen de 96 μ l. La reacción se inició mediante la adición de 4 μ l de acetolactato hasta una concentración final 4 mM y un volumen final de 100 μ l. Después del cronometrado de incubaciones a 30°C, típicamente entre 2 y 15 min, la reacción se enfrió rápidamente mediante la adición de 10 μ l de AEDT 0,5 M, pH 8,0 (Life Technologies, Grand Island, NY 14072). Para medir la K_M de NADH, las concentraciones utilizadas fueron 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, y 10 mM.

Para analizar 2,3-dihidroxi-isovalerato, la muestra se diluyó 10 veces con agua, y se inyectaron 8,0 μ l en un HPLC Waters Acquity equipado con espectrómetro de masas Waters SQD (Waters Corporation, Milford, MA). Las condiciones cromatográficas fueron: caudal (0,5 ml/min), en una columna HSS T3 de Waters Acquity (2,1 mm de diámetro, 100 mm de longitud). El tampón A consistía en 0,1% (v/v) en agua, el tampón B era ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. La muestra se analizó utilizando 1% de tampón B (en tampón A) durante 1 min, seguido por un gradiente lineal de 1% de tampón B en 1 min hasta 75% de tampón B en 1,5 min. El producto de reacción, 2,3-dihidroxi-isovalerato, fue detectado por ionización a m/z = 133, utilizando el dispositivo de ionización electrospray de -30 V de voltaje de cono. La cantidad de producto 2,3-dihidroxiisovalerato se calculó por comparación con un molde auténtico.

Para calcular la K_M para NADH, los datos de velocidad para la formación de DVIH eran representados gráficamente en el Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA.) y se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menton de un solo sustrato, suponiendo que se satura la concentración de acetolactato.

Ejemplo 1

Construcción de Genotecas de Saturación del Sitio

Se construyeron siete genotecas (Tabla 2) utilizando dos etapas: 1) síntesis de MegaCebadores utilizando oligonucleótidos sintetizados comercialmente descritos en la Tabla 1; y 2) construcción de genes mutados utilizando los MegaCebadores obtenidos en la etapa 1. Estos cebadores se prepararon utilizando polimerasa Pfu-Ultra de alta fidelidad (Stratagene, La Jolla, CA) para un par de cebadores que contienen un cebador directo y uno inverso. Los moldes de las bibliotecas C, E, F, G y H fueron el tipo silvestre de PF5_{ilvc}. Los moldes de ADN para la biblioteca N fueron los mutantes que tienen actividad NADH detectable desde la biblioteca C, mientras que los de la biblioteca O eran aquellos mutantes que tienen actividad NADH detectable desde la biblioteca H. Una mezcla de reacción de 50 μ l contenía: 5,0 μ l de 10 veces tampón de reacción suministrado con la Pfu-Ultra polimerasa (Stratagene), 1,0 μ l de 50 ng/l de molde, 1,0 μ l cada uno de 10 μ mol/ μ l de cebadores directo e inverso, 1,0 μ l de 40 mM de mezcla dNTP (Promega, Madison, WI), 1,0 μ l de Pfu-Ultra ADN polimerasa (Stratagene) y 39 μ l de agua. La mezcla se colocó en un tubo de 200 μ l de pared delgada para la reacción de PCR en un equipo de gradiente Mastercycler (Brinkmann Instruments, Inc. Westbury, NY). Las siguientes condiciones se usaron para la reacción PCR: La temperatura de partida fue de 95°C durante 30 s seguido por 30 ciclos de calentamiento/enfriamiento. Cada ciclo consistía en 95°C durante 30 segundos, 54°C durante 1 min y 70°C durante 2 min. A la finalización del ciclo de temperatura, las muestras se mantuvieron a 70°C durante 4 minutos más, y después se mantuvieron a la espera de la recuperación de la muestra a 4°C. El producto de PCR fue limpiado utilizando un kit de limpieza de ADN (nº de Catálogo D4003,

Zymo Research, Orange, CA) según lo recomendado por el fabricante.

Tabla 2 - Genotecas

Nombre de la biblioteca	Patrones	Posición o posiciones de direccionamiento de Pf5_ilvC	Cebadores usados
C	PF5_ilvc	47, 50, 52 y 53	ID de SEC N°:
E	PF5_ilvc	47	ID de SEC N°:
F	PF5_ilvc	50	ID de SEC N°:
G	PF5_ilvc	52	ID de SEC N°:
H	PF5_ilvc	47, 50 y 52	ID de SEC N°:
N	Buenos mutantes de la biblioteca C	53	ID de SEC N°:
O	Buenos mutantes de la biblioteca H	53	ID de SEC N°:

Los MegaCebadores se utilizaron después para generar genotecas utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II XL (n° de Catálogo 200524, Stratagene, La Jolla CA). Una mezcla de reacción de 50 µl contenía: 5,0 µl de 10 veces tampón de reacción, 1,0 µl de 50 ng/µl de molde, 42 µl de MegaCebador, 1,0 µl de mezcla dNTP 40 mM, 1,0 µl de Pfu-Ultra ADN polimerasa. Excepto por el MegaCebador y los moldes, todos los reactivos utilizados en el presente documento fueron suministrados con el kit indicado anteriormente. Esta mezcla de reacción se colocó en un tubo de PCR de capacidad 200 µl de pared delgada y se utilizaron las siguientes reacciones para la PCR: La temperatura de partida era de 95°C durante 30 s seguido por 25 ciclos de calentamiento/enfriamiento. Cada ciclo consistía en 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 min y 68°C durante 6 min. A la finalización de los ciclos de temperatura, las muestras se mantuvieron a 68°C durante 8 min más, y después se mantuvieron a 4°C para el procesamiento posterior. Enzima de restricción Dpn I (1,0 µl) (suministrada con el kit anterior) se añadía directamente a la mezcla de reacción terminada, la digestión enzimática se realizó a 37°C durante 1 hora y el producto de PCR se limpió utilizando un kit de limpieza de ADN (Zymo Research). El producto de PCR limpiado (10 µl) contenía genes mutados para una genoteca.

El producto de PCR limpiado fue transformado en una cepa electro-competente de *E. coli* Bw25113 (ΔilvC) utilizando un BioRad Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Los clones transformados fueron rayados sobre placas con agar que contenían el medio Luria Broth y 100 µg/ml de ampicilina (n° de Catálogo L1004, Teknova Inc. Hollister, CA) y se incubaron a 37°C durante la noche. Decenas de clones fueron escogidos al azar para la secuenciación de ADN para confirmar la calidad de la biblioteca.

Tabla 3

Lista de algunos mutantes que tienen actividades NADH identificadas desde las bibliotecas de saturación				
Mutante	Posición 47	Posición 50	Posición 52	Posición 53
SD2	R47Y	S50A	T52H	V53W
SB1	R47Y	S50A	T52G	V53W
SE1	R47A	S50W	T52G	V53W
SH2	R47N	S50W	T52N	V53W
SB2	R47I		T52G	V53W
SG1	R47Y		T52G	V53W
SB3	R47G	S50W	T52G	V53W
SE2	R47P	S50E	T52A	V53W
SD3	R47L	S50W	T52G	V53W
C2A6	R47I	S50G	T52D	V53W
C3E11	R47A	S50M	T52D	V53W
C3A7	R47Y	S50A	T52D	V53W

Lista de algunos mutantes que tienen actividades NADH identificadas desde las bibliotecas de saturación				
Mutante	Posición 47	Posición 50	Posición 52	Posición 53
C3B11	R47F	S50A	T52D	V53W
C4A5	R47Y	S50A	T52S	V53W
C3B12	R47I		T52D	V53W
C4H7	R47I		T52S	V53W
C1D3	R47G	S50M	T52D	V53W
C4D12	R47C	S50W	T52G	V53W
C1G7	R47P	S50G	T52D	V53W
C2F6	R47P	S50V	T52D	V53W
C1C4	R47P	S50E	T52S	V53W
6924F9	R47P	S50G	T52D	
6881E11	R47P	S50N	T52C	
6868F10	R47P		T52S	
6883G10	R47P	S50D	T52S	
6939G4	R47P	S50C	T52D	
11463D8	R47P	S50F	T52D	
9667A11	R47N	S50N	T52D	V53A
9675C8	R47Y	S50A	T52D	V53A
9650E5	R47N	S50W	T52G	V53H
9875B9	R47N	S50N	T52D	V53W
9862B9	R47D	S50W	T52G	V53W
9728G11	R47N	S50W	T52G	V53W
11461D8	R47F	S50A	T52D	V53A
11461A2	R47P	S50F	T52D	V53I

Ejemplo 2

Construcción de bibliotecas de PCR propensas a error

Varias series de bibliotecas de PCR propensas a error (epPCR) se crearon utilizando el kit GeneMorph II (Stratagene) según lo recomendado por el fabricante. Todas las bibliotecas epPCR se dirigen al N-terminal de PF5_KARI. El cebador directo (ID de SEC N°: 20) y el cebador inverso (ID de SEC N°: 22) se utilizaron para todas las bibliotecas ePCR.

Los moldes de ADN para cada biblioteca epPCR eran mutantes con relativamente buenas actividades NADH a partir de la biblioteca anterior. Por ejemplo: los moldes de ADN para la n-ésima biblioteca epPCR eran mutantes con buenas actividades de NADH a partir de la (n-1)-ésima biblioteca epPCR. Los moldes de la primera biblioteca epPCR eran mutantes con relativamente buenas actividades de NADH a partir de bibliotecas de N y O. La tasa de mutaciones de la biblioteca obtenida con este kit fue controlada mediante la cantidad de molde añadido en la mezcla de reacción y el número de ciclos de amplificación. Típicamente, se utilizó 1,0 ng de cada molde de ADN en 100 µl de mezcla de reacción. El número de ciclos de amplificación era de 70. Las condiciones siguientes se utilizaron para la reacción de PCR: La temperatura de partida era de 95°C durante 30 s seguido por 70 ciclos de calentamiento/enfriamiento. Cada ciclo consistía en 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 min, y 70°C durante 2 min. Después de que los primeros 35 ciclos de calentamiento/enfriamiento terminaron, se añadieron más dNTP y ADN polimerasa Mutazyme II. El producto de PCR se limpió utilizando un kit de limpieza de ADN (n° de Catálogo D4003, Zymo Research, Orange, CA) según lo recomendado por el fabricante. El producto de PCR limpiado se trató como megacebador y se introdujo en el vector utilizando el kit Quickchange como se describe en el Ejemplo 1. La Tabla 4 siguiente enumera los mutantes KARI obtenidos y la mejora significativa observada en sus uniones NADH. La K_m se redujo desde 1.100 µM para el C3B11 mutante hasta 50 µM para 12957G9 mutante.

Tabla 4

Lista de algunos mutantes con sus valores de K_m medidos		
Mutante	Posiciones de Mutación	NADH K_m (μ M)
C3B11	R47F/S50A/T52D/V53W	1100
SB3	R47G/S50W/T52G/V53W	500
11518B4	R47N/S50N/T52D/V53A/A156V	141
11281G2	R47N/S50N/T52D/V53A/A156V/L165M	130
12985F6	R47Y/S50A/T52D/V53A/L61 F/A156V	100
13002D8	R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/A156V/G170A	68
12957G9	Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/G170A	50
12978D9	R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/Q115L/A156V	114

Ejemplo 3

Termoestabilidad de PF5-ilvC y sus mutantes

5 Las células que contienen pBAD-ilvC mutados se cultivaron durante la noche a 37°C en 25 ml de medio LB que contenía 100 μ g/ml de ampicilina y 0,02% (peso/vol.) de inductor de arabinosa con agitación a 250 rpm. Las células se recogieron después por centrifugación a 18.000·g durante 1 min a temperatura ambiente y los sedimentos celulares se resuspendieron en 300 μ l de BugBuster Master Mix (EMD Chemicals). La mezcla de reacción se incubó primero a temperatura ambiente durante 20 min y las alícuotas de esta mezcla de células (por ejemplo, 50 μ l) se incubaron a diferentes temperaturas (desde la temperatura ambiente hasta 75°C) durante 10 min. El precipitado se separó por centrifugación a 18.000·g durante 5 min a temperatura ambiente. La actividad remanente del sobrenadante se analizó como se describió anteriormente. Como se muestra en la Figura 7, pBAD-ilvC era muy estable con T_{50} igual a 68°C. (T_{50} es la temperatura a la cual el 50% de la proteína pierde su actividad después de 10 min de incubación).

15 La termoestabilidad de PF5-ilvC permitió la destrucción de la mayoría de la otra actividad de oxidación NADH no KARI dentro de estas células, reduciendo el consumo de fondo de NADH y facilitando de este modo los ensayos de actividad KARI. Este protocolo de tratamiento térmico se utilizó en todos los ensayos de cribado y re-cribado. Los mutantes obtenidos de este modo eran todos termoestables que permitían una más fácil selección de los mutantes deseables.

Ejemplo 4

20 Producción estequiométrica de 2,3-dihidroxi-isovalerato por KARI durante el consumo de cofactores NADH o NADPH

Ensayos de cribado y de rutina de la actividad KARI se basan en la disminución de la absorción de 340 nm asociada con la oxidación de NADPH o NADH de nucleótidos piridina. Para asegurar que esta métrica se acoplaba a la formación del otro producto de reacción, la oxidación del nucleótido de piridina y la formación de 2,3-dihidroxi-isovalerato se midieron en las mismas muestras.

25 La oxidación de NADH o NADPH se midió a 340 nm en una cubeta de 1 cm longitud del trayecto en un espectrofotómetro modelo 8453 de Agilent (Agilent Technologies, Wilmington DE.). El extracto celular crudo (0,1 ml) preparado como se describió anteriormente, conteniendo bien PF5 KARI tipo silvestre o bien C3B11 mutante, se añadió a 0,9 ml de tampón de K-fosfato (10 mM, pH 7,6), que contenía $MgCl_2$ 10 mM, y 0,2 mM de cualquiera NADPH o NADH. La reacción se inició mediante la adición de acetolactato a una concentración final de 0,4 mM. Después de una disminución de 10-20% en la absorción (aproximadamente 5 min), 50 μ l de la mezcla de reacción se retiraron rápidamente y se añaden a un tubo Eppendorf de 1,5 ml conteniendo 10 μ l de AEDT 0,5 mM para detener la reacción y la disminución de absorción real para cada muestra se registro con precisión. La producción de 2,3-dihidroxi-isovalerato se midió y se cuantificó mediante LC/MS como se describió anteriormente.

35 La relación de acoplamiento se define por la relación entre la cantidad de 2,3-dihidroxiisovalerato (DHIV) producido y la cantidad de NADH o NADPH consumida durante el experimento. La relación de acoplamiento para la enzima de tipo silvestre (PF5-ilvC), utilizando NADPH, era de 0,98 DHIV/NADPH, mientras que para el mutante (C3B11), utilizando NADH, era, en promedio, de alrededor de 1,10 DHIV/NADPH.

Ejemplo 5

Identificación de los aminoácidos implicados en la unión del cofactor en KARI para conmutar la especificidad del cofactor utilizando herramientas bioinformáticas

5 Para descubrir si las secuencias KARI existentes en la naturaleza podrían proporcionar pistas para las posiciones de aminoácidos que deberían ser objeto de mutagénesis, se realizó el alineamiento múltiple de secuencias (MSA) utilizando PF5-KARI, su cercano homólogo PA01_KARI y tres secuencias KARI con actividad NADH medible, es decir, B. Cereus ilvC1 e ilvC2 y espinaca KARI (Fig. 8). Sobre la base del alineamiento múltiple de secuencias, las posiciones 33, 43, 59, 61, 71, 80, 101, y 119 fueron seleccionados para la mutagénesis de saturación. Mutagénesis de saturación en todas estas posiciones se realizó simultáneamente utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II XL (nº de Catálogo 200524, Stratagene, La Jolla CA) con el protocolo sugerido por el fabricante. El material de partida para esta mutagénesis era un molde mixto consistente en mutantes ya identificados en la Tabla 4 y en el Ejemplo 2. Los cebadores utilizados se enumeran en la Tabla 5. La biblioteca de mutantes obtenidos de este modo fueron nombrados biblioteca Z". Los mutantes con buena actividad NADH de esta biblioteca se identificaron utilizando cribado de alto rendimiento y su actividad KARI y la K_m para NADH se midieron como se describió anteriormente. Estos mutantes (enumerados en la Tabla 6) poseen K_m mucho menores para NADH en comparación con los moldes de los padres (Tabla 4). Se creó un megacebador utilizando cebadores (ID de SEC Nº. 20 y 58) y mutaciones en las posiciones 156 y 170 fueron eliminadas. El cribado posterior de este conjunto de mutantes identificó el mutante 3361 G8 (ID de SEC Nº: 67) (Tabla 7). Los aciertos de la biblioteca Z fueron sometidos además a mutagénesis de saturación en la posición 53 utilizando cebadores (ID de SEC Nº 20 y 21), y el cribado posterior identificó los mutantes restantes en la Tabla 7. Como se muestra en la Tabla 7, los nuevos mutantes poseían mucha menor K_m para NADH (p. ej., 4,0 a 5,5 μ M) en comparación con los mutantes enumerados en la Tabla 6 (p. ej., 14-40 μ M).

Tabla 5

Cebadores para el Ejemplo 5	
Posición o Posiciones dirigidas de Pf5_ilvC	Cebadores
33	pBAD-405-C33_090808f: GCTCAAGCANNKAACCTGAAGG (ID de SEC Nº: 49) pBAD-427-C33_090808r: CCTTCAGGTTKNNTGCTTGAGC (ID de SEC Nº: 50)
43	pBAD-435-T43_090808f:GTAGACGTGNNKGGTGGCCTG (ID de SEC Nº: 51) pBAD-456-T43_090808r:CAGGCCAACKNNACGTCTAC (ID de SEC Nº: 52)
59 y 61	pBAD-484-H59L61_090808f:CTGAAGCCNNKGCCNNKAAAGTGAC (ID de SEC Nº: 53) pBAD-509-H59L61_090808r:GTCACCTTKNNGCCNNGGCTTCAG (ID de SEC Nº: 54)
71	pBAD-519-A71_090808f: GCAGCCGTTNNKGGTGCCGACT (ID de SEC Nº: 55) pBAD-541-A71_090808r: AGTCGGCACCKNNAACGGCTGC (ID de SEC Nº: 56)
80	pBAD-545-T80_090808f: CATGATCCTGNNKCCGGACGAG (ID de SEC Nº: 57) pBAD-567-T80_090808r: CTCGTCCGGKNNCAGGATCATG (ID de SEC Nº: 58)
101	pBAD-608-A101_090808f: CAAGAAGGGCNNKACTCTGGCCT (ID de SEC Nº: 59) pBAD-631-A101_090808r: AGGCCAGAGTKNNGCCCTTCTTG (ID de SEC Nº: 60)
119	pBAD-663-R119_090808f: GTTGTGCCTNNKGCCGACCTCG (ID de SEC Nº: 61) pBAD-685-R119_090808r: CGAGGTCGGCKNNAGGCACAAC (ID de SEC Nº: 62)

Tabla 6

Lista de algunos mutantes con sus valores de K_m medidos (las posiciones mutadas en esos mutantes se identificaron mediante herramientas bioinformáticas)		
Mutante	Posiciones de la Mutación	NADH K_m (μ M)
ZB1	Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/A156V (ID de SEC Nº: 24)	40
ZF3	Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F (ID de SEC Nº: 25)	21
ZF2	Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/A156V (ID de SEC Nº: 26)	17

Lista de algunos mutantes con sus valores de K_m medidos (las posiciones mutadas en esos mutantes se identificaron mediante herramientas bioinformáticas)		
Mutante	Posiciones de la Mutación	NADH K_m (μ M)
ZB3	Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/G170A (ID de SEC N°: 27)	17
Z4B8	C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T80I/A156V (ID de SEC N°: 28)	14

Tabla 7

Los mutantes optimizados adicionalmente para mejorar la K_m (para NADH)		
Mutante	Posiciones de la Mutación	NADH K_m (μ M)
3361 G8	C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T80I (SEQ ID NO: 67)	5.5
2H10	Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53I/L61F/T80I/A156V (SEQ ID NO : 68)	5.3
1D2	Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T80I/A156V (SEQ ID NO: 69)	4.1
3F12	Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61 F/T80I/A156V (SEQ ID NO: 70)	4.0

Análisis adicionales utilizando herramientas bioinformáticas se realizaron, por tanto, para expandir los sitios mutacionales a otras secuencias KARI como se describe a continuación.

Análisis de secuencias

- 5 Los miembros de la familia de proteínas de cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) fueron identificados a través de búsquedas BlastP de bases de datos disponibles al público utilizando la secuencia de aminoácidos de *Pseudomonas fluorescens* PF5 KARI (ID de SEC N°: 17) con los siguientes parámetros de búsqueda: valor de E = 10, tamaño de la palabra = 3, Matriz = Blosum62, y apertura del Hueco = 11 y por extensión de hueco = 1, valor E de corte de 10^{-3} . Se eliminaron las secuencias idénticas y las secuencias que eran más cortas que 260 aminoácidos.
- 10 Además, también se eliminaron las secuencias que carecían del típico motivo GxGXX(G/A) involucrado en la unión de NAD(P)H en el dominio N-terminal. Estos análisis dieron como resultado un conjunto de 692 secuencias de KARI.

- 15 Un perfil de HMM se generó a partir del conjunto de las enzimas KARI Clase I y Clase II verificadas experimentalmente a partir de diversas fuentes, como se describe en la Tabla 8. A continuación se proporcionan los detalles de construcción, calibración, y búsqueda con este perfil de HMM. Cualquier secuencia que pueda ser recuperada por la búsqueda de HMM utilizando el perfil de HMM para KARI a un valor E por encima de $1E^{-3}$ se considera un miembro de la familia KARI. Las posiciones en una secuencia KARI alineada con los siguientes en los nodos del perfil de HMM (definidas a continuación en la sección de construcción del perfil de HMM) se reivindica de que son responsables de la utilización de NADH: 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, y 170 (la numeración se basa en las secuencias de *Pseudomonas fluorescens* PF5 KARI).

20 Preparación del Perfil de HMM

- 25 Un grupo de secuencias KARI se expresaron en *E. coli* y se ha verificado que tienen actividad KARI. Estas KARI se enumeran en la Tabla 6. Las secuencias de aminoácidos de estas KARI funcionales verificadas experimentalmente fueron analizadas utilizando el paquete de software HMMER (la teoría tras los perfiles HMM se describe en R. Durbin, S. Eddy, A. Krogh y G. Mitchison, *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*, Cambridge University Press, 1998; Krogh et al, 1994; J. Mol Biol. 235: 1501-1531), siguiendo la guía del usuario que está disponible de HMMER (Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA). La salida del programa de software HMMER es un perfil de Modelo Oculto de Markov (perfil HMM) que caracteriza las secuencias de entrada. Como se indica en la guía del usuario, los perfiles HMM son descripciones estadísticas del consenso de un alineamiento múltiple de secuencias. Utilizan las puntuaciones específicas de la posición de los aminoácidos (o nucleótidos) y las puntuaciones de la posición específica para la apertura y extensión de una inserción o eliminación.
- 30 En comparación con otros procedimientos basados en el perfil, los HMM tienen una base probabilística formal. Los perfiles HMM para un gran número de familias de proteínas están disponibles al público en la base de datos PFAM (Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA.).

El perfil HMM se construyó de la forma siguiente:

35 Etapa1. Construir un alineamiento de secuencia

Las 25 secuencias para las KARI funcionalmente verificada enumeradas anteriormente se alinearon utilizando Clustal W (Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson T.J. (1994) *Nuc Acid Res.* 22: . 4673-4680) con los parámetros por defecto. El alineamiento se muestra en la Figura 9.

Tabla 8

25 enzimas KARI verificadas experimentalmente

Número GI	Acceso	ID de SEC Nº:	Organismo
70732562	YP_262325.1	17	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5
15897495	NP_342100.1	13	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2
18313972	NP_560639.1	14	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> str. IM2
76801743	YP_326751.1	30	<i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160
16079881	NP_390707.1	31	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168
19552493	NP_600495.1	32	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032
6225553	032414	33	<i>Phaeosporillum molischianum</i>
17546794	NP_520196.1	15	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000
56552037	YP_162876.1	34	<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> ZM4
114319705	YP_741388.1	35	<i>Alkalilimnicola ehrlichei</i> MLHE-1
57240359	ZP_00368308.1	36	<i>Campylobacter lari</i> RM2100
120553816	YP_958167.1	37	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8
71065099	YP_263826.1	38	<i>Psychrobacter arcticus</i> 273-4
83648555	YP_436990.1	39	<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396
74318007	YP_315747.1	40	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259
67159493	ZP_00420011.1	41	<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP
66044103	YP_233944.1	42	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a
28868203	NP_790822.1	43	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000
26991362	NP_746787.1	44	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
104783656	YP_610154.1	45	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48
146306044	YP_001186509.1	46	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp
15599888	NP_253382.1	16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
42780593	NP_977840.1	47	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987
42781005	NP_978252.1	48	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987
266346	Q01292	18	<i>Spinacia oleracea</i>

Etapa 2. Crear un perfil HMM

5 El programa hmmbuild se ha ejecutado en el conjunto de secuencias alineadas utilizando parámetros por defecto. El hmmbuild lee el archivo del alineamiento múltiple de secuencias, construye un nuevo perfil HMM, y guarda el perfil HMM para archivar. Utilizando este programa se generaba un perfil no calibrado a partir del alineamiento múltiple de secuencias para veinticuatro KARI verificadas experimentalmente como se describió anteriormente.

10 La siguiente información basada en la guía de usuario del software HMMER da alguna descripción de la forma en que el programa hmmbuild prepara un perfil HMM. Un perfil HMM es una máquina de estado lineal que consiste en una serie de nodos, cada uno de los cuales corresponde aproximadamente a una posición (columna) en el alineamiento múltiple de secuencias a partir del cual se construye. Si se ignoran los huecos, la correspondencia es exacta, es decir, el perfil HMM tiene un nodo para cada columna en el alineamiento, y cada nodo puede existir en un estado, un estado coincidente. La palabra "coincidente" en el presente documento implica que hay una posición en el modelo para cada posición en la secuencia para ser alineada con el modelo. Los huecos se modelan mediante estados de inserción (I) y de eliminación (D) estados. Todas las columnas que contienen más de una cierta fracción

15 x de caracteres huecos serán asignadas como una columna de inserción. Por defecto, x se establece en 0,5. Cada estado coincidente tiene un estado I y uno D asociados con él. HMMER llama a un grupo de tres estados (M/D/I) en la misma posición de consenso en el alineamiento de un "nodo".

Un perfil HMM tiene varios tipos de probabilidades asociadas con él. Un tipo es la probabilidad de transición -- la probabilidad de transición de un estado a otro. También hay probabilidades de emisiones asociadas con cada

estado coincidente, basada en la probabilidad de que un determinado resto exista en esa posición en el alineamiento. Por ejemplo, para una columna bastante bien conservada en un alineamiento, la probabilidad de emisiones para el aminoácido más común puede ser 0,81, mientras que para cada uno de los otros 19 aminoácidos puede ser 0,01.

- 5 Un perfil HMM está completamente descrito en un archivo guardado con perfil HMMER2, que contiene todas las probabilidades que se utilizan para parametrizar el HMM. Las probabilidades de emisión de un estado coincidente o un estado de inserción se almacenan como relaciones log-momios relativas a un modelo Null: $\log_2(p_x/(\text{null}_x))$. Donde p_x es la probabilidad de un resto de aminoácido, en una posición particular en el alineamiento, de acuerdo con el perfil HMM y null_x es la probabilidad de acuerdo con el modelo Null. El modelo Null es un simple modelo probabilístico de un estado con un conjunto precalculado de probabilidades de emisión para cada uno de los 20 aminoácidos derivados de la distribución de los aminoácidos en el SWISSPROT release 24. Las puntuaciones de la transición de estado también se almacenan como parámetros log momios y son proporcionales a $\log_2(t_x)$. Donde t_x es la probabilidad de transición de transitar de un estado a otro estado.

Eta 3. Calibrar el perfil HMM

- 15 El perfil HMM se leyó utilizando `hmmcalibrate` que anota un gran número de secuencias aleatorias sintetizadas con el perfil (el número por defecto de secuencias sintéticas utilizada es 5.000), se ajusta a una distribución de valor extremo (EVD) para el histograma de esas puntuaciones, y vuelve a guardar el archivo HMM incluyendo ahora los parámetros de EVD. Estos parámetros de EVD (μ y λ) se utilizan para calcular los valores de E de las puntuaciones de bits cuando el perfil se busca contra una base de datos de secuencias de proteínas. El `hmmcalibrate` escribe dos parámetros en el archivo HMM en una línea etiquetada "EVD": estos parámetros son los parámetros μ (localización) y λ (escala) de una distribución de valor extremo (EVD) que mejor se adapte a un histograma de las puntuaciones calculadas sobre secuencias generadas al azar de aproximadamente la misma longitud y composición del resto como SWISS-PROT. Esta calibración se hizo una vez para el perfil HMM.

- 25 El perfil HMM calibrado para el conjunto de secuencias KARI se proporciona adjunto a ello como un gráfico Excel del perfil HMM (Tabla 9). En la sección principal del modelo empezando desde la línea de marca del HMM, el modelo tiene tres líneas por cada nodo, para los nodos M (donde M es el número de estados coincidentes, como se determina mediante la línea LENG). La primera línea informa de las puntuaciones log-momios de emisión coincidente: la relación log-momios de emisión de cada aminoácido desde ese estado y desde el modelo Null. El primer número es el número de nodo (1..M). Los K siguientes numeran las puntuaciones de emisión coincidente, una por cada aminoácido. El aminoácido con mayor puntuación se indica entre paréntesis después del número de nodo. Estas puntuaciones log-momios se pueden transformar de nuevo en probabilidades HMM utilizando el la probabilidad del modelo Null. El último número de la línea representa el índice de la columna de alineamiento para este estado coincidente. La segunda línea informa de las puntuaciones de emisión del inserto, y la tercera línea informa de las puntuaciones de transición de estado: $M \rightarrow M$, $M \rightarrow I$, $M \rightarrow D$; $I \rightarrow H$, $I \rightarrow I$; $D \rightarrow M$, $D \rightarrow D$; $B \rightarrow M$; $M \rightarrow E$.

- 35 Etapa 4. Ensayar la especificidad y sensibilidad de los HMM del perfil construido

- El perfil HMM se evaluó utilizando `hmmsearch`, que lee un perfil HMM a partir de `hmmfile` y busca un archivo de secuencia para coincidencias de secuencias significativamente similares. El archivo de secuencia buscado contenía 692 secuencias (véase en lo que antecede). Durante la búsqueda, el tamaño de la base de datos (parámetro Z) se fijó en mil millones. Este ajuste del tamaño asegura que valores E significativos frente a la base de datos actual seguirán siendo significativos en un futuro previsible. El punto de corte del valor E se fijó en 10.

- Una búsqueda `hmmer`, utilizando `hmmsearch`, con el HMM perfil generado a partir del alineamiento de los veinticinco KARI con la función verificada experimentalmente, hizo coincidentes las 692 secuencias con un valor de $E < 10^{-3}$. Este resultado indica que los miembros de la familia KARI comparten una significativa similitud de secuencia. Se utilizó una búsqueda `hmmer` con un corte de valor de E de 10^{-3} para separar las KARI de otras proteínas.

- 45 Etapa 5. Identificar posiciones que son relevantes para la utilización de NAD(P)H.

- Once posiciones se han identificado en KARI de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 que conmuta el cofactor NADPH por NADH. Dado que las secuencias KARI comparten significativa similitud de secuencias (como se describió anteriormente), se puede razonar que las posiciones homólogas en la alineamiento de secuencias KARI deben contribuir a la misma especificidad funcional. El HMM perfil para enzimas KARI se ha generado a partir del alineamiento múltiple de secuencias que contiene la secuencia de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 KARI. Las once posiciones en el perfil HMM que representan las columnas del alineamiento que corresponden a las once posiciones de conmutación del cofactor en *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 KARI se identifican como las posiciones 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156 y 170. Las líneas correspondientes a estas posiciones en el archivo del modelo se resaltan en amarillo en la tabla 9.

- 55 Para cualquier secuencia de consulta, `hmmsearch` se utiliza para buscar el perfil HMM para KARI frente a la secuencia de consulta y el alineamiento de la consulta con el HMM se registra en el archivo de salida. En la sección de alineamiento de la salida, la línea superior es el consenso HMM. El aminoácido mostrado para el consenso es el aminoácido de mayor probabilidad en esa posición de acuerdo con el HMM (no necesariamente el aminoácido de

- 5 puntuación más alta). La línea central muestra letras de coincidencia "exacta" con el resto de mayor probabilidad en el HMM, o un "+" cuando la coincidencia tiene una puntuación positiva. La tercera línea muestra la propia secuencia. Las posiciones en la secuencia de consulta que se consideran como relevantes para la conmutación del cofactor se identifican como aquellas que están alineadas con estos once nodos en el perfil HMM como se describió anteriormente. Un ejemplo del alineamiento de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 KARI con el perfil HMM de KARI se muestra en la Figura 10 y las once posiciones que son responsables de la conmutación del cofactor están sombreadas en gris.

Tabla 9

HMMER2.0 [2.2 g]

NOMBRE de las KARI verificadas funcionalmente

LENG 354

ALPH Amino

MAPA "yes"

COM hmmbuild-n KARI verificadas funcionalmente exp-KARI.hmm exp-KARI_mod.aln

COM hmmscalibrate exp-KARI.hmm

NSEQ 25

FECHA Lun Dic 8 17: 34: 51

2008

XT -8455 -1000 -1000 -8455 4 --8455 -4 -4

NULT -4 -8455

NULE 595 -1558 85 338-294 453-1158

197 249 902-1085-142-21-313 45 531

201 384-1 998-644

EVD -333.712708 0.110102

Versión del formato de archivo: un identificador único para este formato de archivo de guardar.

Nombre del perfil HMM

Longitud del modelo: el número de estados coincidentes en el modelo.

Alfabeto de símbolos: Esto determina el alfabeto de símbolos y el tamaño de las distribuciones de probabilidad de emisión de símbolos. IAAmino, el tamaño del alfabeto se establece en 20 y el alfabeto de símbolos a "ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY" (orden alfabético).

Marca de anotación del mapa: Si se establece en "yes", cada línea de datos para el estado coincidente/columna de consenso en la sección principal del archivo es seguido de un número extra. Este número da el índice de la columna del alineamiento de la que se producía el estado coincidente. Esta información proporciona un "mapa" de los estados coincidentes (1..M) sobre las columnas del alineamiento (1..alen). Se utiliza para alinear rápidamente el modelo de vuelta al alineamiento original, p. ej., cuando se utiliza hmmsalign-mapali.

Línea de comandos para cada comando HMMER que modifica el archivo de guardar: Esto significa que hmmbuild (parámetros por defecto) se aplicaba para generar el archivo de guardar.

Línea de comandos para cada comando HMMER que modifica el archivo de guardar: Esto significa que hmmscalibrate (parámetros por defecto) se aplicaba al archivo de guardar.

Número de secuencia: el número de secuencias en las que era entrenado el HMM

Fecha de creación: Cuando fue generado el archivo de guardar.

Ocho transiciones "especiales" para el control de partes de partes específicas del algoritmo del modelo Plan7. La probabilidad Null utilizada para transformarlos de vuelta a las probabilidades del modelo es 1,0. El orden de los ocho campos es N→B, N→N, E→C, E→J, C→T, C→C, J→B, J→J.

La distribución de probabilidad de transición para el modelo Null (estado G único).

Los parámetros de distribución de valor extremo μ y λ , respectivamente; ambos valores puntuales flotantes. Estos valores se establecen cuando se calibra el modelo con hmmscalibrate. Se utilizan para determinar valores E de las puntuaciones de bits.

HMM	A	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posición en alineamiento
	A→A	A→C	A→D	A→E	A→F	A→G	A→H	A→I	A→J	A→K												
	-650			-1463																		
1(Q)	-618	-1355	-136	-44	-1453	-1166	-219	-1455	321	-1417	-911	-227	-1498	3253	127	-643	-684	-1239	-1542	-1030	2100%	
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
	-38	-6840	-6882	-684	-1115	-701	-1378	-696														
2(M)	-423	-3929	-6216	-5402	-3438	-4370	-4528	-3232	-5113	-2513	6320	-5052	-4790	-4917	-4823	-4632	-4459	-3628	-4103	-4017	7200%	
	-147	-504	232	42	-382	397	104	-625	209	-467	-722	276	395	44	96	351	121	-363	-295	-251		
	-3303	-3316	-325	-3473	-138	-701	-1378															
3(F)	-1308	-1104	-2227	-2120	3616	-2093	-244	-196	-1897	84	84	-1828	-2278	-1509	-1758	-1617	-1350	-388	306	1338	-8000%	
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
	-38	-6840	-6882	-684	-1115	-701	-1378	-696														
4(A)	1616	-1744	1125	33	-2015	-1540	-262	-1568	937	-1765	-911	-252	-1656	154	-383	-489	640	-3	-2038	-1421	8700%	
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
	-901	-7402	-1125	-694	-1115	-2352	-314															
5(C)	-346	2578	1084	-712	2092	-1540	-384	-167	-624	-432	125	-731	-1705	-451	-980	-631	-339	-50	-774	-133	8800%	
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-721	275	394	45	96	359	118	-369	-295	-249		
	-1009	-1009	-7567	-131	-3527	-1916	-444															
6(S)	800	-581	-1937	-1415	-821	-7740	-954	1279	-1204	-684	19	-1258	-1364	-4319	-1358	1715	-478	1117	-1320	-938	9000%	
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
	-17	-6953	-7995	-694	-1115	-146	-3378															
7(K)	-958	-2411	-883	501	-2143	-1919	-568	-2483	2435	-2420	-1502	57	-2010	1146	458	819	224	-2040	-2577	-1313	9100%	
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
	-3	-6139	-9181	-694	-1115	-701	-1378															
8(V)	-2472	-2010	-5039	-4702	-2634	-4789	-4391	2241	-4574	-161	-1318	-4442	-4600	-4417	-4528	-4080	-62	3823	-3952	-3510	9200%	
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
	-3	-6139	-9181	-694	-1115	-701	-1378															

ES 2 575 413 T3

9(Y)	-4573	-3683	-5210	-5503	2423	-5089	-1332	-3424	-5093	-392	-2368	-3726	-4920	-3635	-4458	-4313	-4533	-3643	-581	4349	9300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-8	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
10(Y)	-2173	-2628	-2489	-2097	-1555	-2986	-1481	-2628	906	-2674	-2088	-2051	-3206	-1513	-1078	-2268	1039	-2435	-2009	4185	9400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-8	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
11(D)	-2493	-4412	3590	1042	-4581	-2437	-1761	-4500	733	-4351	-3682	516	-2961	-1429	-2799	-2168	-2668	-3874	-4650	-3541	9500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-8	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
12(K)	11	-2371	348	819	-2692	-535	-521	-2443	2294	-2387	-1451	593	-1960	-68	904	-67	-837	-1993	-2554	-1871	9600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-8	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
13(D)	-2683	-4633	3700	560	-4789	-2487	-1872	-4788	731	-4578	-3963	-1073	-3046	-1551	-2987	-2282	-2742	-4201	-4759	-3709	9700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-8	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
14(C)	2503	3193	-4298	-9818	-2010	-3276	-2894	762	-3517	-1437	-1051	-3233	-3503	-3212	-3411	-2499	-1792	1507	-2395	-2431	9800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-8	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
15(D)	-1363	-2805	2749	542	-3202	-2072	-920	-2977	290	-2812	-2023	1270	-2294	-489	-1188	53	1116	-2618	-3086	-2349	9900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-8	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
16(L)	-1288	-1113	-3338	-541	-1057	-2827	-1719	599	-2469	2293	-236	-2381	-2862	-2089	-2316	-232	-1213	1306	-1645	-1504	10000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-8	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
17(S)	-1360	-2977	888	1045	-3189	-496	-920	-2963	-628	-2901	-2011	1863	-2739	-439	-1184	7139	190	-2503	-3077	-2343	10100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-2338	-8135	-325	-894	-1115	-701	-1378														
18(G)	-454	-332	-958	-1110	-2112	3143	-1211	-2091	-1317	-2264	-1651	-978	-1439	-1202	-1421	-645	-774	-1653	-1916	-1919	10200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-5882	-894	-1115	-3098	-179														
19(F)	-898	-1341	-646	-482	-320	-1336	4297	-1552	-180	-1493	-1035	-579	-1675	-363	-322	-934	-951	-1354	-725	107	10300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-5882	-894	-1115	-3098	-179														
20(D)	-872	-1812	3234	432	2215	-967	-433	-2172	-559	-2263	-1704	99	-1453	-164	-1141	-728	-973	-1814	-2126	-1645	10400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-5882	-894	-1115	-3098	-179														
21(E)	-766	-1699	821	2831	2050	-1029	-293	-1804	-118	-1919	-1331	89	-1441	-4	-927	-853	-914	-1512	-1968	-1603	10500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-5882	-894	-1115	-3098	-179														
22(Y)	-1337	-1223	-1681	-1566	1268	-1957	121	-516	-1294	-769	-585	-1229	-2163	-1111	-1301	-1443	-1359	-932	582	3832	10600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-5882	-894	-1115	-109	-3775														
23(I)	-2294	-1931	-4749	-4277	-1724	-4277	-3320	2309	-3952	1990	-634	-3878	94	-3538	-3912	-3411	-2247	1576	-2991	-2629	10700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	

[illegible]

38(G)	677	-2128	-3339	-4171	-4647	-3536	-3815	-4508	-4320	-4749	-3857	-3009	-3149	-3871	-4137	-1784	-2005	-3297	-4723	-4735	13700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
39(H)	-1657	-3375	-2897	-2114	-3744	-3201	-4738	-3782	-445	-3553	-2886	-2112	858	-1265	1505	-2514	-2557	-3469	-3282	-2908	13800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
40(I)	3631	-2768	-4492	-4815	-4888	-2892	-4271	-4781	-4818	-5028	-4365	-3727	-3728	-4477	-4545	-2567	-2762	-3952	-4724	-4942	13900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
41(J)	-3103	-3464	-2950	-2573	-783	-3679	4549	-3487	-1372	-3071	-2715	-2454	-3764	2546	-1428	-2390	-2976	-3308	2262	-235	14000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
42(K)	3357	-1795	-4134	-4277	-4057	-2118	-3548	-3549	-4035	-4824	-3192	-2817	-2900	-3508	-3823	217	-1650	-276	-435	-4211	14100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
43(L)	-306	-1940	-2044	-1473	-1208	-2572	-4154	-719	-1218	-1059	-1120	343	-2449	-289	-1441	-1382	-1005	-633	-1878	-1278	14200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
44(M)	-4008	-4117	-3389	-3749	-5073	-3911	-4123	-6012	-4503	-5797	-5419	4397	-4479	-4255	-4692	-4115	-4312	-5371	-4350	-4731	14300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
45(N)	-4414	-3800	-5638	-5628	-2290	-4980	-4628	-1885	-5423	3318	-1236	-5514	-4997	-4753	-5002	-5379	-4399	-2629	-3665	-3690	14400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
46(O)	-1731	-3015	275	-931	-3487	-2518	-973	-3116	2321	-2955	-2123	224	-2693	258	2808	-1596	-1613	-2730	-2995	-2515	14500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
47(P)	-2895	-4843	3555	944	-5037	-2600	-2082	-5082	-2528	-4903	-4373	-1205	-3195	-1765	-3535	-2501	-3007	-4517	-5004	-3956	14600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
48(Q)	-1538	-2212	-2363	-2679	-4293	-2279	-3082	-4365	-3331	-4524	-3676	288	-3026	-2957	-3497	3508	-1962	-3259	-4477	-4068	14700%
-	-149	-500	233	44	-381	399	105	-626	211	-466	-721	275	394	45	95	360	118	-370	-295	-250	
-	-155	-3319	-9181	-2405	-302	-701	-1378														
49(R)	-2521	-3969	1232	-911	-4849	3373	-2125	-4854	-2535	-4762	-4136	-63	-3115	-1836	-3448	-2284	-2716	-4157	-4880	-3914	14800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
50(S)	-2767	-2324	-5232	-4770	396	-4827	-3784	-39	-4516	848	-611	-4472	-4518	-3990	-4367	-4081	-2716	3323	-3837	-2660	14900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	211	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-148	-3381	-9181	-203	-2928	-701	-1378														
51(T)	-1684	-3265	2736	2014	-3554	-2196	-1177	-3350	92	-3279	-2427	692	-2503	-770	-1565	-1483	-1666	332	-3450	-2678	15000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
52(U)	-3122	-2868	-5097	-5160	-3522	-4180	-4897	-905	-6060	-2626	-2570	-4652	-4579	-4840	-4923	-4013	-3297	3756	-4414	-4190	15800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

ES 2 575 413 T3

[illegible]

67(D)	-1086	-2441	-869	1767	-2780	-1956	-585	-2510	1702	-2449	-1534	-600	-2052	1923	873	-886	238	-630	-2596	-1949	17300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
68(A)	1489	-2393	167	1234	-2711	-1873	-547	-2462	895	-2408	-1486	1161	-1977	-50	-648	666	141	-2014	-2577	-1892	17400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
69(D)	2134	-2698	2124	985	-3163	-2086	1397	-2934	-693	-2897	-2025	-723	-2325	-643	-1260	-1245	-1368	-2601	-1087	-530	17500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
70(G)	-2294	-2699	-2521	-2885	-4852	3541	-3456	-5042	-3799	-5094	-4366	365	-3545	-3376	-4005	-2451	-2700	-3936	-4706	-4575	17600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
71(C)	-2699	-2266	-4006	-1188	2199	-4136	1018	-603	-3812	-1955	-405	-3665	-346	-3167	-2624	-3277	-2609	-1837	-1521	-840	17700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
72(K)	47	-2348	339	950	-2668	-1654	-512	-507	1721	-2394	-1438	-490	-1947	672	436	806	687	-1970	-2533	-1851	17800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-166	-3318	-9181	-2153	-356	-701	-1378														
73(V)	-1810	-1639	-4149	-3688	-1869	-3417	-2622	28	-3369	320	-897	-3230	112	-3099	-3291	-2619	-767	3269	-2708	-2354	18400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
74(K)	847	-1033	-2131	-1554	304	127	-1127	-637	1445	645	1168	-1534	-2401	-1174	-1547	-764	-172	-526	-1613	1413	18500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
75(T)	-1284	-2794	1526	1290	-3095	-2841	1289	-2863	-548	-2806	-1914	-658	-2242	-427	-1095	1451	1827	-2411	-2986	-2254	18600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
75(V)	-1089	-957	-3143	-2539	-943	-2518	-1496	1052	-2198	-792	1859	-146	666	-1684	-2111	-1695	945	2346	-1458	-1105	18700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
77(W)	1606	-2321	-752	612	-2628	-323	-527	-2366	1480	-2331	-1416	-510	-789	-73	421	23	-829	-1936	2212	-1843	18800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
78(E)	-1509	-3540	1372	3127	-3861	-120	-1391	-3693	-1319	-3605	-2787	-500	-2659	-1005	-1976	-400	-655	-3194	-3790	-2557	18900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
79(A)	3390	-1868	-4092	-4341	-4332	-2153	-3690	-3942	-4157	-4333	-3471	-2869	-2948	-3730	-3919	-1525	931	-2894	-4580	-4463	19000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
80(V)	2003	-1721	-4449	-3955	-2160	-3763	-3240	1342	-3745	-1435	-1124	-3561	-3555	-3494	-3700	-2979	-50	2574	-3061	-2898	19100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
81(K)	1714	-2501	-959	446	-2858	-2043	-554	-2574	1964	-2506	-1609	-669	-2135	-203	1088	426	-1032	-2148	-2552	-2027	19200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

[illegible]

96(A)	1991	-2315	-809	-268	-2645	-531	-579	-2374	232	-2350	-1445	-557	1217	711	445	447	-874	-1951	-2540	-1683	20700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
97(D)	491	-2351	1334	1381	-2671	-1854	1062	-3421	1010	-2367	-1440	-488	-1947	1017	362	-760	250	-623	-2535	-1652	28800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
98(V)	-2039	-1706	-4456	-3933	-1846	-3939	-3043	1986	-3558	1480	-826	804	-3870	-3351	-3555	-3105	-2000	2330	-2795	-2442	20900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
99(Y)	-4840	-3766	-5230	-5581	1898	-6109	-1300	-3727	-5136	-3041	-3132	-3723	-4964	-3961	-4801	-4357	-4690	-3893	3325	4377	21800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
100(E)	-163	-2353	-734	1581	-2674	-1859	880	-2422	1659	-792	-1443	777	-1952	890	280	-765	238	-1975	-2535	-1056	21100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-257	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
101(E)	1017	-2763	652	2042	-3060	-1913	-775	-2636	-485	-2773	-1886	1955	-2143	-135	-1055	258	-1165	-2371	-2348	-2207	21200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
102(E)	-94	-2422	653	2138	-2740	-435	-567	-2493	894	-2437	-1515	-518	-1994	1767	-673	139	-855	-1023	-2585	-1917	21300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
103(I)	-2650	-2156	-5316	-4955	-2520	-5119	-4900	3165	-4894	297	-1251	-1775	-4828	-1705	-4975	-4470	-2642	2340	-4202	-3614	21400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
104(E)	1058	-2241	-760	2003	628	-1687	875	-2383	1240	-2347	-1436	-523	-1993	881	-618	-604	-855	-1954	-2530	-1652	21500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
105(P)	-343	-3144	1551	442	-3538	-489	-1215	-3329	-1038	-3274	-2420	-848	2974	-812	-1635	465	-1644	-2849	-3452	-2693	21600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
106(N)	-1173	-2375	-814	827	-2375	-2071	1767	-2273	-479	-2336	-1603	3151	-2218	-415	-957	-1093	-1120	-198	-2488	647	21700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
107(M)	-3415	-2650	-5826	-5252	-1352	-5488	-4282	1351	-5022	2621	2728	-5181	-4773	-4005	-4613	-4776	-3292	89	-3071	-3194	21800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
108(K)	-1941	-3099	-1997	-1232	-3650	-2740	-1025	-3210	3059	-3010	-2308	499	-2768	1457	1251	-1917	-90	-2858	-3902	-2622	21900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
109(P)	1123	-2426	-740	954	-2747	-1313	-689	-2491	1139	-2440	-1525	-552	1941	1446	-655	-480	-813	-2050	-2510	-1935	22000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
110(G)	-2276	-2987	-2347	-2709	-4832	3554	-3349	-5085	-3678	-5053	-4315	1193	-3587	-3243	-3997	-2418	-2674	-3974	-4703	-4521	22100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

ES 2 575 413 T3

[illegible]

125(O)	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	23900%
126(I)	-2254	-1916	-4813	-4433	-2456	-4221	-3937	3248	-4246	-1616	-1324	-1044	-4259	-4963	-4255	230	-2280	2003	-3673	-3237	23900%
127(Q)	886	-2234	334	1172	-2504	-1881	-646	-93	1370	-300	-1337	466	-1974	656	-646	-794	-827	1266	-2449	-1798	23900%
128(P)	716	-1926	-3816	-3997	-4464	653	-3594	-4274	-4053	-4520	-3586	-2770	3775	-3693	-3911	-1550	-1770	-3057	-4647	-4548	23900%
129(P)	479	-2398	-1173	-637	-2916	-2106	-818	-2610	-289	-2688	-1713	-894	2238	1247	2196	61	-1147	-2184	-2757	-2174	24000%
130(A)	1787	-2563	1377	529	-2976	-1992	-762	-2736	1786	-2660	-1776	-623	-216	-319	-836	297	-1120	-2286	-2953	-2146	24100%
131(F)	-1308	-1104	-2227	-2120	3616	-2093	-24	-196	-1831	64	66	-1626	-2276	-1503	-1793	-1617	-1360	-369	306	1336	24200%
132(P)	-603	-937	-997	-1068	-1632	-1041	-1092	-1737	-1074	-1874	-1416	-992	3539	-1066	-1192	-786	-866	-1363	-1766	-1661	24300%
133(Q)	-804	-1463	-664	-230	-1920	-1335	-101	-1603	2819	-1630	-1021	-346	-1669	232	639	-786	-766	-1358	-1637	-1317	24400%
134(D)	-2406	-4169	3346	-651	-4260	-261	-1744	-4307	-1947	-4207	-3514	2151	-2936	-1416	-2754	-2102	-2471	-3802	-4324	637	24500%
135(O)	-2047	-1713	-4504	-3983	-1821	-3943	-3061	2461	-3697	1691	-797	-3653	-3873	-3371	-3587	-342	-2003	1904	-1704	-2441	24600%
136(D)	-2024	-3444	3496	-680	-3858	-2331	-1565	-44	-1612	-3673	-2915	686	-2762	-1248	-2306	476	-2088	-3196	-3911	-3098	24700%
137(V)	-3122	-2898	-5852	-5160	-3522	-4190	-4687	-906	-4060	-2626	-2670	-4662	-4573	-4340	-4923	-4013	-3297	3796	-4414	-4190	24800%
138(O)	-53	-876	-3230	-2609	1867	-393	-1422	2613	-2236	-723	-81	-2157	-2609	-1895	-2066	-1633	276	-271	-1323	844	24900%
139(M)	316	-2346	-4754	-4279	-1396	-4001	-3301	-697	-3877	816	4676	-3879	-3994	-3361	-3676	-3242	-2531	-1114	-2746	-2629	25000%

ES 2 575 413 T3

[illegible]

154(V)	129	-1901	-989	821	-2050	-1959	-654	-1704	498	-52	-1037	-703	-2057	695	-756	443	-344	1671	-2192	-1626	26500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
155(O)	575	-2353	344	1153	-2675	-1856	-515	-508	1502	-2370	-1444	571	-1949	1876	419	-764	-622	-1976	-2538	-1856	26500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
156(G)	-3239	-3883	516	-2151	-6365	3646	-3337	-5629	-3818	-9498	-4951	-2619	-3965	-3187	-4377	-3211	-3632	-4837	-4893	-4826	28700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
157(G)	753	-2618	-789	488	-2848	2300	-672	-2582	558	-2525	-1627	481	-2112	-224	471	-862	-1024	-2149	-2694	-2033	27300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
158(G)	-52	-2212	-3792	-4133	-4698	3627	-3943	-4590	-4356	-4812	-3937	-3058	-3216	-3901	-4170	-1874	-2095	-3394	-4734	-4766	27400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
159(V)	-2485	-2830	-5123	-4763	-2667	-4797	-4593	2349	-4661	-1543	-1424	-4502	-4648	-4554	-4752	-4115	825	2986	-4163	-3678	27500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
160(F)	-2541	-3139	-2413	-2153	-4726	-2991	-3342	-5055	-3527	-5058	-4353	1199	4031	-3244	-3757	-2685	-2911	-4148	-4583	-4352	27600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
161(C)	1577	3078	1357	-856	-2694	-219	881	-2359	-617	-2434	-1576	-891	-2199	-545	-1093	872	-1043	-1945	-2701	-2102	27700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
162(L)	-2140	-2404	-3995	-3997	-2053	-3121	-3283	-1687	-3583	3041	-1200	-3360	-3525	-3433	-3567	480	-2414	-1973	-3145	-2756	27800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
163(I)	-2527	-2032	-6072	-4613	2047	-4674	-3911	2568	-4413	117	-341	-4323	-4439	-4023	-4320	-3916	-2488	2176	-3347	-3040	27900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
164(A)	3631	-2768	-4492	-4818	-4888	-2992	-4271	-4781	-4918	-5026	-4365	-3727	-3728	-4477	-4545	-2567	-2762	-3852	-4724	-4942	28000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
165(V)	-2623	2122	-5301	-4390	-2770	-5102	-5132	2426	-4946	-1532	-1474	-4791	-4869	-4991	-5102	-4483	-2619	3200	-4509	-3991	28100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
166(H)	-495	-2631	903	-2051	722	-3242	3761	-2396	-2056	-2342	-1863	-2047	-3330	-1815	-2362	-2316	-2233	-2272	-981	3318	28200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
167(Q)	-4589	-4392	-3927	-4146	-5899	-4221	-4099	-5973	-3840	-5564	-5304	-4230	-4693	4575	-3826	-4764	-4772	-5612	-4577	-4751	28300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
168(D)	-2873	-4505	3943	-902	-4949	-2633	-2157	-5087	-2604	-4922	-4387	428	-3235	-1872	-3675	-2522	-3009	-4491	-4932	-3946	28400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

ES 2 575 413 T3

[illegible]

182(G)	2572	-2028	-393	-434	-457	-2752	-378	-4408	-4319	-461	-3751	-2958	-4070	-3837	-4092	-1679	-1898	-3191	-4701	-4588	30000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
184(G)	-2178	-1808	-4630	-4153	-2094	-4190	-3417	3121	-3309	311	-1023	698	-4089	-3658	-3664	-3368	-2148	1742	-3147	-2751	30000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
186(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5993	3804	-5028	-6627	-5789	-6297	-5970	-5141	-4804	-5543	-5305	-4727	-4819	-5862	-4924	-6849	30100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
188(G)	1392	2751	-4353	-4538	-4308	2884	-3681	-4084	-4233	-4334	-3426	-2859	-2890	-3744	-3957	712	-1658	-2914	-4563	-4470	30200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
189(G)	895	-1822	-3738	-3769	-4188	2507	-3358	-3950	-3667	-4198	-3283	-2687	986	-3302	-3621	-1441	2334	-2867	-4408	-4238	30300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
188(R)	-3706	-3892	-4490	-3848	1391	-4057	-2273	-3795	-1908	-3356	-3481	-3458	-4253	-2676	3948	-3768	-3871	-3813	-2250	-1328	30400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
189(A)	2844	-1670	-3844	-3873	-4048	-1958	-3318	-3787	-3688	-4081	-3456	-2698	-2734	-3307	-3572	1088	1907	-2713	-4286	-4136	30500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
190(G)	-4178	-3995	-4856	-5222	-5688	3828	-4823	-5388	-5533	-6087	-5741	-4995	-4606	-6342	-5178	-4451	-4560	-5613	-4754	-5636	30600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
191(V)	-2496	-2038	-5439	-4788	-2888	-4825	-4637	2522	-4688	-2549	-1431	-4527	-4858	-4534	-4783	-4148	629	2919	-4191	-3706	30700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
192(I)	-2760	-2307	-5270	-4788	1173	-4384	-3932	3346	-4678	662	-572	-4539	-4535	-4088	-4400	-4134	-2703	757	-3223	-3841	30800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
193(E)	454	-3086	-881	3279	4129	-2346	-1888	-3919	-1888	-3932	-3156	-1291	1208	-533	-2460	-1842	-2097	-3308	-4121	-3395	30900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
194(T)	-2738	-3109	-4509	-4810	-4918	-3305	-4346	-4858	-4769	-5072	-4551	-3587	-3998	-4580	-4543	-2999	4033	-4113	-4684	-4915	31000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
195(I)	-1322	-1979	-2786	-2978	-4207	2152	-3105	-4004	-3295	-4229	-3354	134	-2301	-2988	-3387	-113	3742	-2969	-4406	-4119	31100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
196(F)	-4110	-3437	-5436	-5431	4218	-5143	-2169	-1742	-5074	563	-1124	-4290	-4871	-3987	-4561	-4547	-4016	-2374	-1386	-292	31200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
197(K)	-111	-2844	-1470	1220	-3294	-2415	-860	-2939	2448	-2798	-1945	-1058	-2475	767	2054	-1421	-1432	-2644	-2668	-2356	31300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														

[illegible]

212(C)	-223	5044	-4840	-4445	-1998	-3905	-3598	-31	-4138	445	-930	-3902	-4040	-3778	-4010	-3184	-2305	1347	-3209	-2983	32800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
213(G)	-435	-4203	-5097	-5452	-5993	3834	-5028	-6627	-4765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5545	-5365	-4727	-4819	-5662	-4924	-5343	32900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
214(G)	677	-2128	-3838	-4171	-4647	3536	-3816	-4608	-4340	-4749	-3857	-3003	-3143	-3871	-4137	-1784	-2005	-3297	-4725	-4735	31000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
215(V)	378	724	-3707	-3104	-1180	-2966	-1919	1210	-2734	1302	-359	-2627	-3014	-2382	-2565	-2085	1123	1949	-1773	-1423	33100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
216(M)	-948	-1407	-1516	155	-1452	-2164	1677	-1030	-821	-1302	1976	-1113	-2245	-718	-1173	773	1715	1332	-1794	-1343	33200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
217(E)	1397	-2528	-724	2188	-2332	240	-787	-2681	328	-2648	-4744	-471	-2162	-351	-939	545	-1095	-2227	-2828	-2143	33300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
218(L)	-3705	-3122	-8060	-5527	-1359	-5814	-4563	1065	-5282	3089	-146	-5504	-4953	-4163	-4828	-5215	-3671	-1275	-3159	-3198	33400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
219(V)	-2600	-2108	-5251	-4894	-2668	-5025	-4763	2473	-4810	-1354	1359	-4683	-4772	-4654	-4895	-4362	-2594	3016	-4181	-3758	33500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
220(K)	-1633	-2905	-1573	708	-3175	-2487	-900	-3003	2925	-2843	-2008	-1128	-2541	1714	784	-1509	-165	-2671	-2894	-2418	33600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
221(A)	2352	2056	-2590	-2000	-947	-2434	-1271	-485	-32	-832	714	-1817	-2499	-1493	-1752	-1483	274	453	-1419	501	33700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
222(G)	224	-1905	-3562	-3698	-3684	3361	-3297	-3220	-3625	81	-2886	-2733	-2977	-3328	-3545	-1608	-1763	-2574	-4068	-3810	33800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
223(F)	-4781	-3756	-5207	-5542	4341	-5070	-1342	-3653	-5111	-2971	-3065	-3743	-4949	-3874	-4495	-4351	-4650	-3829	-591	1725	33900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
224(E)	-2413	-4114	221	3489	-4382	-2485	-1689	-4248	-1608	-4112	-3386	-1694	-2951	-1338	871	-2119	-2441	-3753	-4239	-3395	34000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
225(T)	-1461	-1864	-3139	-2645	-2653	-2483	-2135	-1734	-1646	-2355	-1761	-2298	-2936	-1995	820	-1748	3354	957	-2989	-2654	34100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
226(L)	-3831	-3266	-5314	-5145	-573	-5058	-2475	-1443	-4705	3853	-789	-4359	-4756	-3854	-4314	-4462	-3729	-2115	-1672	1738	34200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-365	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														

[illegible]

241(L)	-3370	-2847	-5795	-5233	-1388	-5455	-4298	708	-5010	2859	1349	-5155	-4777	-4026	-4522	-4755	-3254	814	-3103	-3213	35700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
242(H)	-2515	-4224	-445	945	-4207	-2505	4583	-4377	-1734	-4237	-3571	2607	-3008	-1439	-2361	-2205	-2569	-3893	-4267	-3353	31800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
243(E)	-3177	2671	-2701	3711	-4954	-3438	-3479	-4755	-3558	-4932	-4406	-3081	-4038	-3370	-3902	-3269	-3451	-4260	-4554	-4534	34900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
244(L)	-85	-1333	-3893	-3280	-1114	-3185	-2083	7065	-2910	2310	1961	-2623	-3170	-2501	-2721	-2289	-113	436	-1859	-1538	36100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
245(K)	-2513	-3173	-2941	-2370	-4402	-3094	-1824	-3895	3558	-3734	-3068	-2271	-3377	-1447	-616	-2637	751	-3485	-3628	-3471	36100%
-	-149	-500	233	43	-381	400	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-155	-3318	-9181	-195	-2974	-701	-1378	*													
246(L)	-3671	-3823	-5854	-5378	-1321	-5546	-4380	-632	-5138	2862	1671	-5358	-4832	-4041	-4689	-4953	-3435	742	-3082	-3238	36300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
247(I)	-2980	-2484	-5473	-5109	-1958	-5196	-4587	3728	-4915	267	-781	-4933	-4833	-4427	-4799	-4598	-2349	-54	-3627	-3397	36400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
248(V)	-1685	-1689	-4093	-3732	-2081	-3082	-2693	-227	-3402	-1488	1383	-3123	-3419	-3145	-3320	367	-1807	3332	-2874	-2534	36500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
249(D)	-2563	-4589	3064	-1039	-4953	-2751	-2187	-4998	767	-4822	-4260	-1424	-3314	-1891	-3072	-2624	-3060	-4467	-4770	-3982	36600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
250(L)	-2768	-2715	-4842	-4633	-1675	-3998	-3790	-1033	-4207	3066	-562	-4150	-4173	-3740	-3985	-3399	699	-1545	-3154	-3057	36700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
251(M)	-2822	-2358	-5342	-4351	-1769	-4985	-4151	2587	-4663	173	4005	-4649	-4501	-4076	-1487	-4251	-2764	765	-3321	-3210	36800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
252(Y)	-4562	-3633	-5142	-5401	1516	-4982	-1303	-3544	-4968	-2863	-2886	-3671	-4868	-3785	-4393	381	-4432	-3652	2413	4379	36900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
253(E)	-1959	-3457	-558	3135	-3641	-3347	-1410	-3622	-1165	-3647	-2751	-1000	-2718	1879	-1665	-1757	692	-3152	-3709	-2360	37000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
254(G)	-347	-2818	-1218	207	3253	2635	-921	-2927	1474	-2822	-1972	-1002	-2458	-488	859	-1397	-1435	-2521	-2923	-2378	37100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
255(G)	-4433	-4283	-5092	-5482	-5893	3834	-5008	-8827	-5785	-5257	-5970	-5141	-4804	-5545	-5385	-4727	-4813	-5862	-4924	-5849	37200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

[illegible]

270(G)	-4176	-3995	-4835	-5222	-5686	3826	-4823	-6366	-5533	-6087	-5741	-4696	-4608	-6312	-5178	-4461	-4560	-5613	-4754	-5635	38700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-7992	-9054	-894	-1115	-422	-1378														
271(D)	-2710	-4705	3025	1828	-4880	1758	-1932	-4853	-2320	-4703	-4115	-1084	-3073	-1621	-3297	-2330	-2809	-4301	-4994	-3793	38700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
272(V)	-2497	-2175	-4651	-4137	2447	-4046	-2215	255	-3768	892	1559	-3537	-3886	-3109	-3468	-3181	-2410	-1282	-1615	3508	38900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
273(V)	-1425	-1250	-3490	-2894	-1283	-3035	-1955	691	-2570	-1	-429	-2565	-3050	942	-2614	-2129	1701	2578	-1907	-1653	39000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
274(T)	516	-1643	-1918	-1401	-2170	-2112	-1307	-1769	-1234	-2016	-1265	-1442	-2421	-1149	887	1341	2345	823	-2454	-2006	39100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
275(G)	677	-2128	-3838	-4171	-4647	3536	-3815	-4506	-4340	-4749	-3657	-3009	-3149	-3871	-4137	-1784	-2009	-3297	-4725	-4735	38200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
276(P)	-892	-2210	343	-359	-2447	-1950	-675	-2143	633	-2204	-1351	-551	2313	-260	-802	465	-939	-973	-2467	1093	39300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
277(R)	-1214	-2548	-1097	1072	175	-2145	-716	-2567	848	-2528	-1653	-795	-2228	-273	2682	417	-1133	-2191	-2671	-2034	39400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
278(V)	289	-2035	-5133	-4789	-2692	-4777	-4639	2142	-4689	-1551	-1443	-4511	-4649	-4585	-4784	-4102	-2487	3126	-4202	-3717	38800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
279(I)	-2265	-1919	-4828	-4452	-2473	-4254	-3954	3155	-4265	-1616	-1326	-4056	-4279	-4082	-4274	225	-2288	2182	-3688	-3250	39600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
280(D)	-1731	-3162	2329	-550	-3318	-2239	-1273	-3221	-1149	-3214	-2403	2295	-2573	-899	-1742	-1561	1851	-2804	-3365	1327	39700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
281(E)	1097	-2699	1227	2358	-2994	-2011	-795	-2753	381	-2704	-1808	-540	-2190	-358	-992	-1055	-1162	-2310	-2885	1152	39800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
282(C)	-156	-2372	854	1835	-2592	-1851	1192	-2444	493	-2388	-1462	590	478	1356	-520	116	-937	-1994	-2555	-1871	39900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
283(T)	228	-1688	-3658	-3444	-3179	-2145	-2891	-2611	-3215	-3078	-2328	-2557	-2821	-2916	-3214	2251	2366	1397	-3543	-3270	40000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
284(K)	-2591	-3623	-3848	-2331	-4472	-3512	-1365	-3753	2942	-3413	1850	-2188	-3430	-937	2705	-2874	-2650	-3556	-3267	-3189	40100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

[illegible]

299(F)	-434	-357	-461	543	385	-482	-132	-343	-469	-290	-289	-353	-475	-362	-429	-407	-427	-364	-60	291	41800%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
300(A)	2827	-1603	-4058	-3628	-2047	-1165	-2823	-1208	-3349	-1486	-1089	-3103	-3432	-3073	-3298	-2367	197	1100	-2812	-2447	41700%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
301(G)	-2354	-3353	-2464	163	-4038	-3041	-1183	-3601	2928	-3234	-2487	-1693	-3047	-756	2488	-458	-2152	-3194	-3159	-2895	41800%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
302(M)	-893	-2387	740	1780	-2680	-537	-624	-2429	930	-2376	1896	-489	-1958	-66	722	775	-833	-1982	-2545	-1864	41900%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
303(W)	-2965	-2853	-4796	-4462	3045	-4315	-1773	-1425	-4093	92	-897	-3564	-4179	-3330	-3743	-3475	-2878	664	4754	-94	42000%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
304(I)	-2621	-2135	-5246	-4859	-2364	-1987	-4577	3052	-4747	-250	1043	-4641	-4713	-4468	-4768	-4301	-2597	2384	-3834	-3598	42100%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
305(L)	684	-1319	-1741	761	-1375	-2223	-1037	-927	-1042	1693	-533	-1287	-2326	-915	-1349	767	-162	94	-1756	-1328	42200%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
306(E)	364	-4155	621	3314	-4393	-2398	-1686	-4282	-1836	-4169	-3446	728	-2893	-1339	-2626	-2045	-2402	-3767	-4362	-3401	42300%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
307(M)	-938	979	-1235	-881	-1738	1352	985	-1357	-549	-1572	-816	2188	-2155	-482	165	-1022	-880	30	-1990	1445	42400%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
308(O)	667	-2933	-773	511	-2721	-316	-544	-2455	1211	-2485	-1481	684	-1969	2135	1528	-912	-868	-2019	-2568	-1895	42500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
309(A)	2050	-1857	-1091	-525	-2013	-2012	188	-1645	-385	-1213	-1011	485	-2103	-346	1657	-963	306	-251	-2163	-1524	42600%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
310(G)	-1816	-2169	-2089	-2292	1262	2944	-2358	-3657	-2904	-3628	-1077	2347	-3167	-2550	-3183	-1986	-2162	-3008	-2614	-1874	42700%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
311(Y)	475	1019	-1806	-1042	225	-2192	-935	-945	-891	-1228	1222	357	-2267	1062	1571	-1172	-868	-800	-1730	2445	42800%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
312(P)	-87	-2372	-1362	755	-3738	-2209	-2007	-3445	-1924	-3676	-2761	-1555	3698	-1697	-2362	-1555	286	-2903	-3832	-3277	42900%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-2336	-8139	-325	-894	-1115	-701	-1378														
313(K)	-804	-1483	-554	-234	-1920	-1335	-101	-1605	2889	-1630	-1021	-349	-1569	232	698	-788	-769	-1358	-1637	-1317	43000%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

ES 2 575 413 T3

[illegible]

328(J)	-1632	-1661	-2846	-66	-1628	-2983	-1663	3240	-1327	-191	-722	-2160	-3016	-1619	822	-2097	-1556	-660	-2157	-1935	44500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
329(E)	-2734	-3685	-1382	3553	-5624	-2986	-2317	-3317	-2173	-3167	1983	-1896	-3140	-2054	-2566	-2649	-2820	-3234	-3920	-3370	44600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-2336	-6139	-325	-894	-1115	-701	-1378														
330(W)	-1550	-1285	-2088	-1954	479	-1870	-483	-1181	-1479	-968	-802	-1648	-2104	-1454	-1405	-1757	-1683	-1218	5462	836	44700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
331(K)	8	-2067	-905	437	2278	-1941	-611	-307	2031	-2031	-1189	-536	-2000	1426	-709	-864	-353	1337	-2323	-1722	44800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
332(A)	-2449	-2012	-5067	-4708	-2628	-4682	-4459	1888	-4580	-1533	-1402	-4414	-4675	-4456	-4663	-3980	1117	3227	-1065	-3597	44900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
333(G)	-4135	-4203	-5092	-5462	-5893	3334	-5028	-6627	-5165	-6297	-5590	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5649	45000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
334(E)	1477	-2744	-762	2110	-3114	-2113	-864	-2850	-445	-2792	-1912	619	-2297	-451	1346	-1191	-1288	-2412	-2962	-2286	45100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
335(K)	-1294	-2843	366	1309	-2898	-2085	-724	-2722	2626	-2637	-1741	-719	-2200	1190	862	-1073	-1333	-2297	-2770	-2133	45200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
336(L)	-3471	-3023	-5954	-5375	-1321	-5646	-4380	-632	-5138	2962	1571	-5358	-4862	-4044	-4659	-4963	-3436	742	-3082	-3239	45300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
337(R)	-4843	-4446	-5107	-4383	-5597	-4412	-3791	-5946	-2789	-5602	-5919	-4521	-4754	-3672	4218	-4385	-4832	-5644	-4533	-4933	45400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
338(E)	943	-2422	1002	1200	-2744	377	-572	-2463	982	-2439	-1617	-522	-1998	-117	-661	1129	-634	-2044	-2609	-1521	45500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
339(W)	-3394	-2886	-5774	-5282	-1338	-5407	-4210	-576	-4943	1721	4369	-5109	-4742	-3963	-4548	-4689	-3273	771	-3009	-3137	45600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
340(M)	-1812	-1601	-3897	-3373	698	-3401	-2222	-516	-2963	441	4360	-2991	-3934	-2559	641	-2503	-1740	104	-1534	-1661	45700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
341(F)	102	-1789	-1729	-1313	428	-2112	-1410	-2021	-1236	-2239	-1470	-1394	3205	695	-1607	703	-1207	-1700	-2313	-2121	45800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-289	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
342(W)	-3486	-3022	-4312	-4121	189	-4228	-1173	-2749	310	-2689	-2250	-3147	-4208	-2977	-3003	-3484	-3396	-2818	5544	611	45900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

[illegible]

También se describe en el presente documento el objeto de las reivindicaciones de la solicitud internacional tal como fue presentada:

- 5 1. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante que comprende la secuencia de aminoácido como se expone en la ID de SEC N°: 29.
2. Una molécula de ácido nucleico que codifica la enzima cetil-ácido reductoisomerasa mutante de la reivindicación 1.
3. Una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante que tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en la ID de SEC N°: 23.
- 10 4. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante codificada por la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3.
5. Una célula recombinante que comprende la enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante de la reivindicación 1.
6. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante como se expone en la ID de SEC N°: 17 que comprende al menos una mutación en un resto seleccionado del grupo consistente en 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170.
- 15 7. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante de acuerdo con la reivindicación 6, en la que:

- a) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, F, G, I, L, N, P e Y;
- b) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, M, N, V y W;
- 5 c) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N, y S;
- d) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, H, I, W;
- e) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de V;
- 10 f) el resto en la posición 165 tiene una sustitución de aminoácidos de M;
- g) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
- h) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de A;
- i) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
- j) el resto en la posición 33 tiene una sustitución de aminoácidos de L;
- 15 k) el resto en la posición 80 tiene una sustitución de aminoácidos de I; y
- l) el resto en la posición 115 tiene una sustitución de aminoácidos de L.
8. Una molécula de ácido nucleico que codifica la enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante de la reivindicación 6.
9. Un procedimiento para la evolución para la evolución de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:
- 20 a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADPH que tiene una secuencia de aminoácidos nativa específica;
- b) identificar los restos de conmutación del cofactor en la enzima de a) basado en la secuencia de aminoácidos de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa *Pseudomonas fluorescens* como se expone en la ID de SEC N°: 17 en la que los restos de conmutación del cofactor están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170;
- 25 c) crear mutaciones en al menos uno de los restos de conmutación del cofactor de b) para crear una enzima mutante en la que dicha enzima mutante ligue NADH.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que:
- 30 a) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, F, G, I, L, N, P e Y;
- b) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, M, N, V y W;
- c) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N, y S;
- 35 d) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, H, I, W;
- e) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de V;
- f) el resto en la posición 165 tiene una sustitución de aminoácidos de M;
- 40 g) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
- h) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de A;
- i) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
- j) el resto en la posición 33 tiene una sustitución de aminoácidos de L;

- k) el resto en la posición 80 tiene una sustitución de aminoácidos de I; y
- l) el resto en la posición 115 tiene una sustitución de aminoácidos de L.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la enzima cetol-ácido reductoisomerasa tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC N°: 29.
- 5 12. Un procedimiento para la producción de isobutanol, que comprende:
- a) proporcionar una célula anfitriona microbiana recombinante que comprende las siguientes constructos genéticos:
- i) al menos un constructo genético que codifica una enzima acetolactato sintasa para la transformación de piruvato en acetolactato;
- 10 ii) al menos un constructo genético que codifica una enzima cetol-ácido reductoisomerasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- iii) al menos un constructo genético que codifica una acetohidroxiácido deshidratasa para la transformación de 2,3-dihidroxi-isovalerato en α -ceto-isovalerato (ruta de la etapa c);
- iv) al menos un constructo genético que codifica una cetoácido descarboxilasa de de cadena ramificada, para la transformación de α -cetoisovalerato en isobutiraldehído (ruta de la etapa d);
- 15 v) al menos un constructo genético que codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada para la transformación de isobutiraldehído a isobutanol (ruta de la etapa e); y
- b) cultivar la célula anfitriona de a) en condiciones donde se produce iso-butanol.
13. Un procedimiento para la evolución e identificación de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:
- 20 a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADPH que tiene una secuencia de aminoácidos nativa específica;
- b) identificar los restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos nativa cuyas cadenas laterales están en cercana proximidad a la adenosil 2'-fosfato de NADPH como objetivos de mutagénesis;
- 25 c) crear una biblioteca de enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes a partir de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa de clase I de la etapa a), que tienen al menos una mutación en al menos uno de los sitios objetivos de mutagénesis de la etapa (b); y
- d) cribar la biblioteca de enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes de la etapa c) para identificar enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes que unen NADH.
- 30 14. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC N°: 19, 24, 25, 26, 27, 28, 67, 68, 69, and 70.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> E. I. du Pont de Nemours and Company
- <120> Cetol-ácido reductoisomerasa que une NADH
- <130> CL4165
- 35 <140> CL4165
- <141> 13-12-2007
- <160> 70
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 40 <211> 30
- <212> ADN
- <213> Cebador inverso para el vector *pBAD*
- <400> 1

tgatgaacat cttcgctgat tcgccgtcct

30

	<210> 2		
	<211> 68		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador directo de biblioteca G		
	<220>		
	<221> característica_nueva		
	<222> (24)..(25)		
10	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> característica_nueva		
	<222> (33)..(34)		
	<223> n es a, c, g, o t		
15	<220>		
	<221> característica_nueva		
	<222> (39)..(40)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<400> 2		
	gcgtagacgt gactgttggc ctgnntaaag gcnnggctnn ctgggccaag gctgaagccc	60	
20	acggcttg	68	
	<210> 3		
	<211> 68		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador directo de biblioteca E		
	<220>		
	<221> característica_nueva		
	<222> (24)..(25)		
30	<223> n es a, c, g, o t		
	<400> 3		
	gcgtagacgt gactgttggc ctgnntaaag gctcggctac cgttgccaag gctgaagccc	60	
	acggcttg	68	
	<210> 4		
	<211> 68		
35	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo de biblioteca F		
	<220>		
40	<221> característica_nueva		
	<222> (33)..(34)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<400> 4		
	gcgtagacgt gactgttggc ctgcgtaaag gcnntgctac cgttgccaag gctgaagccc	60	
	acggcttg	68	
45	<210> 5		
	<211> 68		

<212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de biblioteca G

 5 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (39)..(40)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 5

 gcgtagacgt gactgttggc ctgcgtaaag gctcggctnn tgttgccaag gctgaagccc 60

 10 acggcttg 68

 <210> 6
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador directo de biblioteca H

 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (24)..(25)
 20 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (33)..(34)
 <223> n es a, c, g, o t

 25 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (39)..(40)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 6

 gcgtagacgt gactgttggc ctgnntaaag gcnntgctnn tgttgccaag gctgaagccc 60

 30 acggcttg 68

 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Cebador de secuenciación (directo)

 <400> 7

 aagattagcg gatcctacct 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de secuenciación (inverso)

 45 <400> 8

 aacagccaag ctttagttc 20

ES 2 575 413 T3

<210> 9
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Methanococcus maripaludis

5 <400> 9

Met Lys Val Phe Tyr Asp Ser Asp Phe Lys Leu Asp Ala Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Lys Thr Ile Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly Arg Ala Gln Ser
 20 25 30

Leu Asn Met Lys Asp Ser Gly Leu Asn Val Val Val Gly Leu Arg Lys
 35 40 45

Asn Gly Ala Ser Trp Glu Asn Ala Lys Ala Asp Gly His Asn Val Met

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

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

Arg Lys Met Cys Gly Leu Glu Lys Glu Glu
325 330

<210> 10

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Methanococcus maripaludis

<400> 10

Met Lys Val Phe Tyr Asp Ser Asp Phe Lys Leu Asp Ala Leu Lys Glu
1 5 10 15

Lys Thr Ile Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly Arg Ala Gln Ser
20 25 30

Leu Asn Met Lys Asp Ser Gly Leu Asn Val Val Val Gly Leu Arg Lys
35 40 45

Asn Gly Ala Ser Trp Asn Asn Ala Lys Ala Asp Gly His Asn Val Met
50 55 60

Thr Ile Glu Glu Ala Ala Glu Lys Ala Asp Ile Ile His Ile Leu Ile
65 70 75 80

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

Leu Lys Glu Gly Lys Thr Leu Ser Phe Ser His Gly Phe Asn Ile His
100 105 110

Tyr Gly Phe Ile Val Pro Pro Lys Gly Val Asn Val Val Leu Val Ala
115 120 125

Pro Lys Ser Pro Gly Lys Met Val Arg Arg Thr Tyr Glu Glu Gly Phe
130 135 140

Gly Val Pro Gly Leu Ile Cys Ile Glu Ile Asp Ala Thr Asn Asn Ala
145 150 155 160

Phe Asp Ile Val Ser Ala Met Ala Lys Gly Ile Gly Leu Ser Arg Ala
165 170 175

Gly Val Ile Gln Thr Thr Phe Lys Glu Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe
180 185 190

ES 2 575 413 T3

Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Val Thr Glu Leu Ile Lys Ala
195 200 205

Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr
210 215 220

Phe Glu Thr Cys His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Ile Tyr Gln
225 230 235 240

Lys Gly Phe Lys Asn Met Trp Asn Asp Val Ser Asn Thr Ala Glu Tyr
245 250 255

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

Ala Met Lys Glu Ile Leu Arg Glu Ile Gln Asp Gly Arg Phe Thr Lys
275 280 285

Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gln Val Ser Tyr Ala His Leu Lys Ser Met
290 295 300

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

Arg Lys Met Cys Gly Leu Glu Lys Glu Glu
325 330

<210> 11

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Methanococcus vannielii

<400> 11

Met Lys Val Phe Tyr Asp Ala Asp Ile Lys Leu Asp Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

Lys Thr Ile Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly Arg Ala Gln Ser
20 25 30

Leu Asn Met Lys Asp Ser Gly Leu Asn Val Val Val Gly Leu Arg Lys
35 40 45

Asn Gly Ala Ser Trp Glu Asn Ala Lys Asn Asp Gly His Glu Val Leu
50 55 60

Thr Ile Glu Glu Ala Ser Lys Lys Ala Asp Ile Ile His Ile Leu Ile
65 70 75 80

ES 2 575 413 T3

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

<210> 12
 <211> 349

ES 2 575 413 T3

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 12

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

ES 2 575 413 T3

Phe Leu Ala Gln Tyr Asp Val Leu Arg Glu Asn Gly His Ser Pro Ser
225 230 235 240

Glu Ala Phe Asn Glu Thr Val Glu Glu Ala Thr Gln Ser Leu Tyr Pro
245 250 255

Leu Ile Gly Lys Tyr Gly Met Asp Tyr Met Tyr Asp Ala Cys Ser Thr
260 265 270

Thr Ala Arg Arg Gly Ala Leu Asp Trp Tyr Pro Ile Phe Lys Asn Ala
275 280 285

Leu Lys Pro Val Phe Gln Asp Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asn Gly Thr
290 295 300

Glu Thr Lys Arg Ser Leu Glu Phe Asn Ser Gln Pro Asp Tyr Arg Glu
305 310 315 320

Lys Leu Glu Lys Glu Leu Asp Thr Ile Arg Asn Met Glu Ile Trp Lys
325 330 335

Val Gly Lys Glu Val Arg Lys Leu Arg Pro Glu Asn Gln
340 345

<210> 13

<211> 335

<212> PRT

5 <213> Sulfolobus solfataricus

<400> 13

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

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

Arg Ala Trp Ala Gln Asn Leu Arg Asp Ser Gly Leu Asn Val Val Val
35 40 45

Gly Leu Glu Arg Glu Gly Lys Ser Trp Glu Leu Ala Lys Ser Asp Gly
50 55 60

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

Ile Phe Leu Val Pro Asp Met Val Gln Arg Thr Leu Trp Leu Glu Ser
85 90 95

ES 2 575 413 T3

Val Gln Pro Tyr Met Lys Lys Gly Ala Asp Leu Val Phe Ala His Gly
100 105 110

Phe Asn Ile His Tyr Lys Leu Ile Asp Pro Pro Lys Asp Ser Asp Val
115 120 125

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

Lys Ala Gly Gly Gly Val Pro Ala Leu Val Ala Val His Gln Asp Val
145 150 155 160

Ser Gly Thr Ala Leu His Lys Ala Leu Ala Ile Ala Lys Gly Ile Gly
165 170 175

Ala Thr Arg Ala Gly Val Ile Pro Thr Thr Phe Lys Glu Glu Thr Glu
180 185 190

Thr Asp Leu Phe Gly Glu Gln Val Ile Leu Val Gly Gly Ile Met Glu
195 200 205

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

Glu Val Ala Tyr Phe Glu Thr Ile Asn Glu Leu Lys Met Leu Val Asp
225 230 235 240

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

Thr Ala Lys Tyr Gly Gly Met Thr Val Gly Lys Phe Val Ile Asp Glu
260 265 270

Ser Val Arg Lys Arg Met Lys Glu Ala Leu Gln Arg Ile Lys Ser Gly
275 280 285

Lys Phe Ala Glu Glu Trp Val Glu Glu Tyr Gly Arg Gly Met Pro Thr
290 295 300

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

Gly Asn Gln Leu Arg Asp Leu Val Gln Lys Gly Lys Pro Lys Ser
325 330 335

<210> 14

<211> 328

<212> PRT

5 <213> Pyrobaculum aerophilum

<400> 14

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Gln Arg Gly Ile Tyr Gly Met Leu Asn Gly Val Ser Asp Thr Ala Lys
245 250 255

Tyr Gly Gly Leu Thr Val Gly Pro Arg Val Ile Asp Glu Asn Val Lys
260 265 270

Arg Lys Met Lys Glu Ala Ala Met Arg Val Lys Ser Gly Glu Phe Ala
275 280 285

Lys Glu Trp Val Glu Glu Tyr Asn Arg Gly Ala Pro Thr Leu Arg Lys
290 295 300

Leu Met Glu Glu Ala Arg Thr His Pro Ile Glu Lys Val Gly Glu Glu
305 310 315 320

Met Arg Lys Leu Leu Phe Gly Pro
325

<210> 15

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Ralstonia solanacearum

<400> 15

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Ala Asp Leu Ser Leu Ile Lys Gly
1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Ala
20 25 30

Leu Asn Leu Asn Asp Ser Gly Val Lys Val Thr Val Gly Leu Arg Lys
35 40 45

Asn Gly Ala Ser Trp Asn Lys Ala Val Asn Ala Gly Leu Gln Val Lys
50 55 60

Glu Val Ala Glu Ala Val Lys Asp Ala Asp Val Val Met Ile Leu Leu
65 70 75 80

Pro Asp Glu Gln Ile Ala Asp Val Tyr Lys Asn Glu Val His Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Gln Gly Ala Ala Leu Ala Phe Ala His Gly Phe Asn Val His
100 105 110

Tyr Gly Ala Val Ile Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Val Ala
115 120 125

ES 2 575 413 T3

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Gly Thr Tyr Ala Gln Gly Gly
130 135 140

Gly Val Pro His Leu Ile Ala Val His Gln Asp Lys Ser Gly Ser Ala
145 150 155 160

Arg Asp Ile Ala Leu Ser Tyr Ala Thr Ala Asn Gly Gly Gly Arg Ala
165 170 175

Gly Ile Ile Glu Thr Asn Phe Arg Glu Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe
180 185 190

Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Val Glu Leu Ile Lys Ala
195 200 205

Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr
210 215 220

Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Ile Tyr Glu
225 230 235 240

Gly Gly Ile Gly Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr
245 250 255

Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Arg Val Val Thr Ala Glu Thr Lys Gln
260 265 270

Ala Met Lys Gln Cys Leu His Asp Ile Gln Thr Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Ser Phe Leu Leu Glu Asn Lys Ala Gly Ala Pro Thr Leu Ile Ser Arg
290 295 300

Arg Arg Leu Thr Ala Asp His Gln Ile Glu Gln Val Gly Ala Lys Leu
305 310 315 320

Arg Ala Met Met Pro Trp Ile Ala Lys Asn Lys Leu Val Asp Gln Ser
325 330 335

Lys Asn

<210> 16

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 16

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

	245		250		255
Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Ala Glu Ser Arg Ala	260	265	270		
Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys	275	280	285		
Met Phe Ile Thr Glu Gly Ala Ala Asn Tyr Pro Ser Met Thr Ala Tyr	290	295	300		
Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Pro Ile Glu Gln Ile Gly Glu Lys Leu	305	310	315	320	
Arg Ala Met Met Pro Trp Ile Ala Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ser	325	330	335		
Lys Asn					
<210>	17				
<211>	338				
<212>	PRT				
5 <213>	Pseudomonas fluorescens				
<400>	17				
Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly	1	5	10	15	
Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala	20	25	30		
Cys Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Thr Val Gly Leu Arg Lys	35	40	45		
Gly Ser Ala Thr Val Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Leu Lys Val Thr	50	55	60		
Asp Val Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Thr	65	70	75	80	
Pro Asp Glu Phe Gln Ser Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn	85	90	95		
Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His	100	105	110		
Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala					

ES 2 575 413 T3

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

Lys Asn

<210> 18

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Spinacia oleracea

<400> 18

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Gly Gly Ile Ala Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr
245 250 255

Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Ala Glu Ser Arg Ala
260 265 270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Thr Glu Gly Ala Ala Asn Tyr Pro Ser Met Thr Ala Tyr
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Pro Ile Glu Gln Ile Gly Glu Lys Leu
305 310 315 320

Arg Ala Met Met Pro Trp Ile Ala Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ser
325 330 335

Lys Asn

<210> 19

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas fluorescens

<400> 19

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Phe Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
20 25 30

Cys Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Thr Val Gly Leu Tyr Lys
35 40 45

Gly Ala Ala Asp Ala Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Phe Lys Val Thr
50 55 60

Asp Val Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Thr
65 70 75 80

Pro Asp Glu Phe Gln Ser Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn
85 90 95

Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His
100 105 110

ES 2 575 413 T3

Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala
115 120 125

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly
130 135 140

Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Ala Ser Gly Asn Ala
145 150 155 160

Lys Asn Val Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Val Gly Gly Gly Arg Thr
165 170 175

Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe
180 185 190

Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Val Glu Leu Val Lys Ala
195 200 205

Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr
210 215 220

Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu
225 230 235 240

Gly Gly Ile Ala Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr
245 250 255

Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Ala Glu Ser Arg Gln
260 265 270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala
325 330 335

Lys Asn

<210> 20

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas fluorescens

<400> 20

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Gly Gly Ile Ala Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr
245 250 255

Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Ala Glu Ser Arg Gln
260 265 270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala
325 330 335

Lys Asn

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador pBAD 266

<400> 21

ctctctactg ttctccata cccg 24

10 <210> 22

<211> 27

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador PF5- 53Mt

<220>

<221> característica_nueva

<222> (26)..(27)

<223> n es a, c, g, o t

20 <400> 22

caagccgtgg gcttcagcct tggcknn 27

<210> 23

<211> 23

<212> ADN

25 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador pBAD 866

<400> 23

cggtttcagt ctgccttg aag 23

30 <210> 24

<211> 338
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>

5 <223> constructo sintético del mutante de ilcV

<400> 24

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
 1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Phe Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
 20 25 30

Cys Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Thr Val Gly Leu Tyr Lys
 35 40 45

Gly Ala Ala Asp Ala Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Phe Lys Val Thr
 50 55 60

Asp Val Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Thr
 65 70 75 80

Pro Asp Glu Phe Gln Ser Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn
 85 90 95

Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His
 100 105 110

Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala
 115 120 125

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly
 130 135 140

Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Val Ser Gly Asn Ala
 145 150 155 160

Lys Asn Val Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Gly Val Gly Gly Gly Arg Thr
 165 170 175

Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe

ES 2 575 413 T3

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

Lys Asn

<210> 25

<211> 338

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético del mutante de ilcV

<400> 25

Met	Lys	Val	Phe	Tyr	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln	Gly
1				5					10					15	

Lys	Lys	Val	Ala	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly	Ser	Gln	Gly	His	Ala	Gln	Ala
			20					25					30		

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

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

290

295

300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala
325 330 335

Lys Asn

<210> 26

<211> 338

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<400> 26

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Phe Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
20 25 30

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

Gly Ala Ala Asp Ala Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Phe Lys Val Thr
50 55 60

Asp Val Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Thr
65 70 75 80

Pro Asp Glu Phe Gln Ser Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn
85 90 95

Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His
100 105 110

Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala
115 120 125

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly
130 135 140

Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Val Ser Gly Asn Ala
145 150 155 160

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

ES 2 575 413 T3

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

Lys Asn

<210> 27

<211> 338

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético del mutante de ilcV

<400> 27

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly	1	5	10	15
---	---	---	----	----

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Phe Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala	20	25	30
---	----	----	----

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

275

280

285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala
325 330 335

Lys Asn

<210> 28

<211> 338

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético del mutante de ilcV

<400> 28

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
20 25 30

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

Gly Ala Ala Asp Ala Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Phe Lys Val Thr
50 55 60

Asp Val Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Ile
65 70 75 80

Pro Asp Glu Phe Gln Ser Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn
85 90 95

Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His
100 105 110

Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala
115 120 125

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly
130 135 140

ES 2 575 413 T3

Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Val Ser Gly Asn Ala
145 150 155 160

Lys Asn Val Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Val Gly Gly Gly Arg Thr
165 170 175

Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe
180 185 190

Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Val Glu Leu Val Lys Ala
195 200 205

Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr
210 215 220

Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu
225 230 235 240

Gly Gly Ile Ala Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr
245 250 255

Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Ala Glu Ser Arg Gln
260 265 270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala
325 330 335

Lys Asn

<210> 29

<211> 338

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<220>

<221> característica_nueva

10 <222> (24) .. (24)

<223> Xaa = Tyr o Phe

<220>

<221> característica_nueva

<222> (33)..(33)

<223> Xaa = Cys o Leu
 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (47)..(47)
 5 <223> Xaa = Arg o Tyr
 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa = Ser o Ala
 10 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa = Thr o Asp
 15 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (53)..(53)
 <223> Xaa = Val o Ala
 20 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (61)..(61)
 <223> Xaa = Leu o Phe
 25 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (80)..(80)
 <223> Xaa = Thr o Iso
 30 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (156)..(156)
 <223> Xaa = Ala o Val
 35 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (170)..(170)
 <223> Xaa = Gly o Ala
 <400> 29
 Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
 1 5 10 15
 Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Xaa Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
 20 25 30
 Xaa Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Thr Val Gly Leu Xaa Lys
 35 40 45

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala
325 330 335

Lys Asn

<210> 30

<211> 331

<212> PRT

5 <213> Natronomonas pharaanis

<400> 30

Met Thr Asp Ala Thr Ile Tyr Tyr Asp Asp Asp Ala Glu Ser Thr Val
1 5 10 15

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

Ala His Ala Gln Asn Leu Asp Asp Ser Gly Val Asp Val Val Val Gly
35 40 45

Leu Arg Glu Asp Ser Ser Ser Arg Ser Ala Ala Glu Ala Asp Gly Leu
50 55 60

Asp Val Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Glu Gln Ala Asp Leu Val Ser
65 70 75 80

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

Asp Val Leu Gln Pro Gly Asp Thr Leu Gln Phe Ala His Gly Phe Asn
100 105 110

Ile His Tyr Gly Gln Ile Glu Pro Ser Glu Asp Val Asn Val Thr Met
115 120 125

Val Ala Pro Lys Ser Pro Gly His Leu Val Arg Arg Asn Tyr Glu Asn
130 135 140

Asp Glu Gly Thr Pro Gly Leu Leu Ala Val Tyr Gln Asp Pro Ser Gly
145 150 155 160

Glu Ala His Asp Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Lys Ala Ile Gly Cys Thr
165 170 175

ES 2 575 413 T3

Arg Ala Gly Val Val Glu Thr Thr Phe Arg Glu Glu Thr Glu Thr Asp
180 185 190

Leu Phe Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Val Thr Ser Leu Val
195 200 205

Lys Thr Gly Tyr Glu Thr Leu Val Asp Ala Gly Tyr Ser Pro Glu Met
210 215 220

Ala Tyr Phe Glu Cys Leu Asn Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met
225 230 235 240

Tyr Glu Gly Gly Asn Ser Glu Met Trp Asp Ser Val Ser Asp Thr Ala
245 250 255

Glu Tyr Gly Gly Leu Thr Arg Gly Asp Arg Ile Val Asp Asp His Ala
260 265 270

Arg Glu Lys Met Glu Glu Val Leu Glu Glu Val Gln Asn Gly Thr Phe
275 280 285

Ala Arg Glu Trp Ile Ser Glu Asn Gln Ala Gly Arg Pro Ser Tyr Lys
290 295 300

Gln Leu Arg Ala Ala Glu Lys Asn His Asp Ile Glu Ala Val Gly Glu
305 310 315 320

Asp Leu Arg Ala Leu Phe Ala Trp Gly Asp Asp
325 330

<210> 31

<211> 342

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis subsp. subtilis

<400> 31

Met Val Lys Val Tyr Tyr Asn Gly Asp Ile Lys Glu Asn Val Leu Ala
1 5 10 15

Gly Lys Thr Val Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His
20 25 30

Ala Leu Asn Leu Lys Glu Ser Gly Val Asp Val Ile Val Gly Val Arg
35 40 45

Gln Gly Lys Ser Phe Thr Gln Ala Gln Glu Asp Gly His Lys Val Phe
50 55 60

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

305 310 315 320

Arg Glu Met Met Pro Phe Val Lys Gln Gly Lys Lys Lys Glu Ala Val
325 330 335

Val Ser Val Ala Gln Asn
340

<210> 32

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 32

Met Ala Ile Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Asp Ala Asp Leu Ser Leu Ile
1 5 10 15

Gln Gly Arg Lys Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala
20 25 30

His Ser Gln Asn Leu Arg Asp Ser Gly Val Glu Val Val Ile Gly Leu
35 40 45

Arg Glu Gly Ser Lys Ser Ala Glu Lys Ala Lys Glu Ala Gly Phe Glu
50 55 60

Val Lys Thr Thr Ala Glu Ala Ala Ala Trp Ala Asp Val Ile Met Leu
65 70 75 80

Leu Ala Pro Asp Thr Ser Gln Ala Glu Ile Phe Thr Asn Asp Ile Glu
85 90 95

Pro Asn Leu Asn Ala Gly Asp Ala Leu Leu Phe Gly His Gly Leu Asn
100 105 110

Ile His Phe Asp Leu Ile Lys Pro Ala Asp Asp Ile Ile Val Gly Met
115 120 125

Val Ala Pro Lys Gly Pro Gly His Leu Val Arg Arg Gln Phe Val Asp
130 135 140

Gly Lys Gly Val Pro Cys Leu Ile Ala Val Asp Gln Asp Pro Thr Gly
145 150 155 160

Thr Ala Gln Ala Leu Thr Leu Ser Tyr Ala Ala Ala Ile Gly Gly Ala
165 170 175

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

ES 2 575 413 T3

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

Thr Ala

<210> 33

<211> 339

<212> PRT

5 <213> Phaeosprillum molischianum

<220>

<221> característica_nueva

<222> (310)..(310)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10 <400> 33

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

Lys Lys Val Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Val
20 25 30

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Arg Asp Trp Met Leu Glu Cys Lys Ala Gly Gln Pro Ser Phe Lys Ala
290 295 300

Thr Arg Arg Ile Gln Xaa Glu His Val Ile Glu Val Val Gly Glu Lys
305 310 315 320

Leu Arg Gly Met Met Pro Trp Ile Ser Lys Asn Lys Leu Val Asp Lys
325 330 335

Ala Arg Asn

<210> 34

<211> 339

<212> PRT

5 <213> Zymomonas mobilis

<400> 34

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

Lys Lys Ile Ala Ile Leu Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Ala
20 25 30

Gln Asn Leu Arg Asp Ser Gly Val Ala Glu Val Ala Ile Ala Leu Arg
35 40 45

Pro Asp Ser Ala Ser Val Lys Lys Ala Gln Asp Ala Gly Phe Lys Val
50 55 60

Leu Thr Asn Ala Glu Ala Ala Lys Trp Ala Asp Ile Leu Met Ile Leu
65 70 75 80

Ala Pro Asp Glu His Gln Ala Ala Ile Tyr Ala Glu Asp Leu Lys Asp
85 90 95

Asn Leu Arg Pro Gly Ser Ala Ile Ala Phe Ala His Gly Leu Asn Ile
100 105 110

His Phe Gly Leu Ile Glu Pro Arg Lys Asp Ile Asp Val Phe Met Ile
115 120 125

Ala Pro Lys Gly Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Tyr Val Arg Gly
130 135 140

Gly Gly Val Pro Cys Leu Val Ala Val Asp Gln Asp Ala Ser Gly Asn
145 150 155 160

ES 2 575 413 T3

Ala His Asp Ile Ala Leu Ala Tyr Ala Ser Gly Ile Gly Gly Gly Arg
165 170 175

Ser Gly Val Ile Glu Thr Thr Phe Arg Glu Glu Val Glu Thr Asp Leu
180 185 190

Phe Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Leu Thr Ala Leu Ile Thr
195 200 205

Ala Gly Phe Glu Thr Leu Thr Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala
210 215 220

Phe Phe Glu Cys Met His Glu Met Lys Leu Ile Val Asp Leu Ile Tyr
225 230 235 240

Glu Ala Gly Ile Ala Asn Met Arg Tyr Ser Ile Ser Asn Thr Ala Glu
245 250 255

Tyr Gly Asp Ile Val Ser Gly Pro Arg Val Ile Asn Glu Glu Ser Lys
260 265 270

Lys Ala Met Lys Ala Ile Leu Asp Asp Ile Gln Ser Gly Arg Phe Val
275 280 285

Ser Lys Phe Val Leu Asp Asn Arg Ala Gly Gln Pro Glu Leu Lys Ala
290 295 300

Ala Arg Lys Arg Met Ala Ala His Pro Ile Glu Gln Val Gly Ala Arg
305 310 315 320

Leu Arg Lys Met Met Pro Trp Ile Ala Ser Asn Lys Leu Val Asp Lys
325 330 335

Ala Arg Asn

<210> 35

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Alkalilimnicola ehrlichei

<400> 35

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

Lys Lys Val Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Ala
20 25 30

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

275

280

285

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

Arg Arg Leu Ala Ala Glu His Glu Ile Glu Val Val Gly Glu Arg Leu
305 310 315 320

Arg Gly Met Met Pro Trp Ile Asn Ala Asn Lys Leu Val Asp Lys Asp
325 330 335

Lys Asn

<210> 36

<211> 340

<212> PRT

5 <213> Campylobacter lari

<400> 36

Met Ala Val Ser Ile Tyr Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Ile Asn Leu Ile
1 5 10 15

Lys Ser Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Phe Gly Ser Gln Gly His Ala
20 25 30

His Ala Met Asn Leu Arg Asp Ser Gly Val Glu Val Ile Ile Gly Leu
35 40 45

Lys Glu Gly Gly Gln Ser Trp Ala Lys Ala Gln Lys Ala Asn Phe Ile
50 55 60

Val Lys Ser Val Lys Glu Ala Thr Lys Glu Ala Asp Leu Ile Met Ile
65 70 75 80

Leu Ala Pro Asp Glu Ile Gln Ser Glu Ile Phe Asn Glu Glu Ile Lys
85 90 95

Pro Glu Leu Lys Ala Gly Lys Thr Leu Ala Phe Ala His Gly Phe Asn
100 105 110

Ile His Tyr Gly Gln Ile Val Ala Pro Lys Gly Ile Asp Val Ile Met
115 120 125

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

Gly Gly Gly Thr Pro Cys Leu Ile Ala Ile His Gln Asp Glu Ser Lys

ES 2 575 413 T3

145 150 155 160

Asn Ala Lys Asn Leu Ala Leu Ser Tyr Ala Ser Ala Ile Gly Gly Gly
165 170 175

Arg Thr Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Ala Glu Thr Glu Thr Asp
180 185 190

Leu Phe Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Leu Ser Ala Leu Ile
195 200 205

Gln Ala Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Glu Pro Glu Met
210 215 220

Ala Tyr Phe Glu Cys Leu His Glu Met Lys Leu Ile Val Asp Leu Ile
225 230 235 240

Tyr Gln Gly Gly Ile Ala Asp Met Arg Tyr Ser Val Ser Asn Thr Ala
245 250 255

Glu Tyr Gly Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Lys Ile Ile Thr Lys Glu Thr
260 265 270

Lys Glu Ala Met Lys Gly Val Leu Lys Asp Ile Gln Asn Gly Ser Phe
275 280 285

Ala Lys Asp Phe Ile Leu Glu Arg Arg Ala Asn Phe Ala Arg Met His
290 295 300

Ala Glu Arg Lys Leu Met Asn Asp Ser Leu Ile Glu Lys Thr Gly Arg
305 310 315 320

Glu Leu Arg Ala Met Met Pro Trp Ile Ser Ala Lys Lys Leu Val Asp
325 330 335

Lys Asp Lys Asn
340

<210> 37
<211> 338
<212> PRT
5 <213> Marinobacter aquaeolei

<400> 37

Met Gln Val Tyr Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Leu Gly Phe Gly Ser Gln Gly His Ala His Ala

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Ser Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Leu Asn Tyr Pro Ser Met Thr Ala Arg
290 295 300

Arg Arg Gln Asn Ala Ala His Glu Ile Glu Thr Val Gly Glu Lys Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Ser Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Asp
325 330 335

Lys Asn

<210> 38

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Psychrobacter arcticus

<400> 38

Met Asn Val Tyr Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Val Gln Gly
1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Ala
20 25 30

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

Asp Ser Gly Ser Trp Lys Lys Ala Glu Asn Ala Gly Leu Lys Val Ala
50 55 60

Glu Val Glu Glu Ala Val Lys Ala Ala Asp Ile Ile Met Ile Leu Thr
65 70 75 80

Pro Asp Glu Phe Gln Lys Glu Leu Tyr Asn Asp Val Ile Glu Pro Asn
85 90 95

Ile Lys Gln Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ala His Gly Phe Ala Ile His
100 105 110

Tyr Asn Gln Val Ile Pro Arg Ser Asp Leu Asp Val Ile Met Val Ala
115 120 125

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Ala Lys Gly Gly
130 135 140

ES 2 575 413 T3

Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Ala Ser Gly Gln Ala
145 150 155 160

Lys Gln Leu Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Gly Val Gly Gly Gly Arg Ser
165 170 175

Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe
180 185 190

Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Ala Val Glu Leu Val Lys Met
195 200 205

Gly Phe Glu Thr Leu Thr Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr
210 215 220

Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu
225 230 235 240

Gly Gly Ile Ala Asp Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr
245 250 255

Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Glu Gln Ser Arg Glu
260 265 270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Ser Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Asn Tyr Pro Ser Met Thr Ala Arg
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Glu His Gln Ile Glu Ile Thr Gly Ala Lys Leu
305 310 315 320

Arg Gly Met Met Pro Trp Ile Gly Gly Asn Lys Ile Ile Asp Lys Asp
325 330 335

Lys Asn

<210> 39

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Hahella chejuensis

<400> 39

Met Gln Val Tyr Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Ala Glu Gly Ala His Asn Tyr Pro Ser Met Thr Ala Tyr
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Pro Ile Glu Gln Val Gly Glu Lys Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Ala Ser Asn Lys Ile Val Asp Lys Ser
325 330 335

Lys Asn

<210> 40

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Thiobacillus denitrificans

<400> 40

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

Arg Lys Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Ala
20 25 30

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

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

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

Pro Asp Glu Phe Gln Ser Arg Leu Tyr Arg Asp Glu Ile Glu Pro Asn
85 90 95

Ile Lys Gln Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ala His Gly Phe Ser Ile His
100 105 110

Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala
115 120 125

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly
130 135 140

ES 2 575 413 T3

Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Ala Ser Gly Lys Ala
145 150 155 160

Lys Glu Thr Ala Leu Ser Tyr Ala Ser Ala Ile Gly Gly Gly Arg Thr
165 170 175

Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe
180 185 190

Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Ala Val Glu Leu Val Lys Ala
195 200 205

Gly Phe Asp Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr
210 215 220

Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu
225 230 235 240

Gly Gly Ile Ala Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr
245 250 255

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

Ala Met Lys Glu Cys Leu Ala Asn Ile Gln Asn Gly Ala Tyr Ala Lys
275 280 285

Arg Phe Ile Leu Glu Gly Gln Ala Asn Tyr Pro Glu Met Thr Ala Trp
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gln Ile Glu Val Val Gly Ala Lys Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Ala Ala Asn Lys Leu Val Asp His Ser
325 330 335

Lys Asn

<210> 41

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Azotobacter vinelandii

<400> 41

Met Lys Val Tyr Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Ser
1 5 10 15

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Thr Glu Gly Ala Ala Asn Tyr Pro Ser Met Thr Ala Tyr
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gln Ile Glu Val Val Gly Glu Lys Leu
305 310 315 320

Arg Thr Met Met Pro Trp Ile Ala Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Thr
325 330 335

Lys Asn

<210> 42

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas syringae

<400> 42

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
20 25 30

Cys Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Thr Val Gly Leu Arg Lys
35 40 45

Gly Ser Ala Thr Val Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Leu Lys Val Thr
50 55 60

Asp Val Ala Ser Ala Val Ala Ala Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Thr
65 70 75 80

Pro Asp Glu Phe Gln Ser Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Val Glu Pro Asn
85 90 95

Leu Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His
100 105 110

Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala
115 120 125

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Thr Glu Phe Val Lys Gly Gly
130 135 140

ES 2 575 413 T3

Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Val Tyr Gln Asp Ala Ser Gly Asn Ala
145 150 155 160

Lys Asn Val Ala Leu Ser Tyr Ala Ser Gly Val Gly Gly Gly Arg Thr
165 170 175

Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe
180 185 190

Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Val Glu Leu Val Lys Ala
195 200 205

Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr
210 215 220

Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu
225 230 235 240

Gly Gly Ile Ala Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr
245 250 255

Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Ala Glu Ser Arg Gln
260 265 270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Lys Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Ala Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Asp
325 330 335

Lys Asn

<210> 43

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas syringae

<400> 43

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

260

265

270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Thr Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Glu His Gly Ile Glu Val Ile Gly Glu Lys Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Ala Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Asp
325 330 335

Lys Asn

<210> 44

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas putida

<400> 44

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
20 25 30

Cys Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Thr Val Gly Leu Arg Lys
35 40 45

Gly Ser Ala Thr Val Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Leu Lys Val Ala
50 55 60

Asp Val Ala Thr Ala Val Ala Ala Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Thr
65 70 75 80

Pro Asp Glu Phe Gln Gly Ala Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn
85 90 95

Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ser Ile His
100 105 110

Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala
115 120 125

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly

ES 2 575 413 T3

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

Lys Asn

<210> 45

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas entomophila

<400> 45

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Glu Glu Ser Arg Lys
260 265 270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Asn Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Ser Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Thr
325 330 335

Lys Asn

<210> 46

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas mendocina

<400> 46

Met Lys Val Tyr Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
20 25 30

Cys Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Thr Ile Gly Leu Arg Lys
35 40 45

Gly Ser Ala Thr Val Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Leu Lys Val Thr
50 55 60

Asp Val Ala Ser Ala Val Ala Ala Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Thr
65 70 75 80

Pro Asp Glu Phe Gln Gly Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn
85 90 95

Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His
100 105 110

Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala
115 120 125

ES 2 575 413 T3

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Thr Glu Phe Val Lys Gly Gly
130 135 140

Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Val Tyr Gln Asp Ala Ser Gly Asn Ala
145 150 155 160

Lys Asn Val Ala Leu Ser Tyr Ala Ser Gly Val Gly Gly Gly Arg Thr
165 170 175

Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe
180 185 190

Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Val Glu Leu Val Lys Ala
195 200 205

Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr
210 215 220

Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu
225 230 235 240

Gly Gly Ile Ala Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr
245 250 255

Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Ala Glu Ser Arg Gln
260 265 270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Val Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ala Met Met Pro Trp Ile Ala Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Thr
325 330 335

Lys Asn

<210> 47
<211> 336
<212> PRT
5 <213> Bacillus cereus
<400> 47

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Gly Asp Phe Val Ser Gly Pro Arg Val Val Thr Glu Asp Thr Lys Lys
260 265 270

Ala Met Gly Thr Val Leu Ala Glu Ile Gln Asp Gly Thr Phe Ala Arg
275 280 285

Gly Trp Ile Ala Glu His Lys Ala Gly Arg Pro Asn Phe His Ala Thr
290 295 300

Asn Glu Lys Glu Asn Glu His Glu Ile Glu Val Val Gly Arg Lys Leu
305 310 315 320

Arg Glu Met Met Pro Phe Val Gln Pro Arg Val Lys Val Gly Met Lys
325 330 335

<210> 48

<211> 335

<212> PRT

5 <213> Bacillus cereus

<400> 48

Met Lys Thr Tyr Tyr Glu Lys Asp Ala Asn Val Glu Leu Leu Lys Gly
1 5 10 15

Lys Thr Val Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
20 25 30

Gln Asn Leu Arg Asp Ser Gly Val Glu Val Val Val Gly Val Arg Pro
35 40 45

Gly Lys Ser Phe Glu Val Ala Lys Thr Asp Gly Phe Glu Val Met Ser
50 55 60

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

Asp Glu Gln Gln Ala His Val Tyr Lys Ala Gly Val Glu Glu Asn Leu
85 90 95

Arg Glu Gly Gln Met Leu Leu Phe Ser His Gly Phe Asn Ile His Phe
100 105 110

Gly Gln Ile Asn Pro Pro Ser Tyr Val Asp Val Ala Met Val Ala Pro
115 120 125

Lys Ser Pro Gly His Leu Val Arg Arg Val Phe Gln Glu Gly Asn Gly
130 135 140

ES 2 575 413 T3

Val Pro Ala Leu Val Ala Val His Gln Asp Ala Thr Gly Thr Ala Leu
145 150 155 160

His Val Ala Leu Ala Tyr Ala Lys Gly Val Gly Cys Thr Arg Ala Gly
165 170 175

Val Ile Glu Thr Thr Phe Gln Glu Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe Gly
180 185 190

Glu Gln Thr Val Leu Cys Gly Gly Val Thr Ala Leu Val Lys Ala Gly
195 200 205

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

Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu Gly
225 230 235 240

Gly Leu Thr Asn Met Arg His Ser Ile Ser Asp Thr Ala Glu Phe Gly
245 250 255

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

Met Lys Arg Val Leu Thr Glu Ile Gln Gln Gly Glu Phe Ala Lys Lys
275 280 285

Trp Ile Leu Glu Asn Gln Ala Gly Arg Pro Thr Tyr Asn Ala Met Lys
290 295 300

Lys Ala Glu Gln Asn His Gln Leu Glu Lys Val Gly Ala Glu Leu Arg
305 310 315 320

Glu Met Met Ser Trp Ile Asp Ala Pro Lys Glu Leu Val Lys Lys
325 330 335

<210> 49
<211> 22
<212> ADN
5 <213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador pBAD- 405

<220>
10 <221> característica_nueva
<222> (10)..(11)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 49

gctcaagcan nkaacctgaa gg 22

<210> 50
15 <211> 22

	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador pBAD 427	
5	<220>	
	<221> característica_nueva	
	<222> (12)..(13)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 50	
10	ccttcagggt knntgcttga gc	22
	<210> 51	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador pBAD435	
	<220>	
	<221> característica_nueva	
	<222> (10)..(11)	
20	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 51	
	gtagacgtgn nkgttgcct g	21
	<210> 52	
	<211> 21	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador pBAD456	
	<220>	
30	<221> característica_nueva	
	<222> (11)..(12)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 52	
	caggccaack nncacgtcta c	21
35	<210> 53	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> cebador pBAD484	
	<220>	
	<221> característica_nueva	
	<222> (9)..(10)	
	<223> n es a, c, g, o t	
45	<220>	
	<221> característica_nueva	
	<222> (15)..(16)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 53	
50	ctgaagccnn kggcnnkaaa gtgac	25

	<210> 54	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador pBAD509	
	<220>	
	<221> característica_nueva	
	<222> (10)..(11)	
10	<223> n es a, c, g, o t	
	<220>	
	<221> característica_nueva	
	<222> (16)..(17)	
	<223> n es a, c, g, o t	
15	<400> 54	
	gtcactttkn ngccknnggc ttcag	25
	<210> 55	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador pBAD519	
	<220>	
	<221> característica_nueva	
	<222> (10)..(11)	
25	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 55	
	gcagccgttn nkggtgccga ct	22
	<210> 56	
30	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador pBAD541	
35	<220>	
	<221> característica_nueva	
	<222> (12)..(13)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 56	
40	agtcggcacc knnaacggct gc	22
	<210> 57	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador pBAD545	
	<220>	
	<221> característica_nueva	
	<222> (11)..(12)	
50	<223> n es a, c, g, o t	

<400> 57
 catgatcctg nnkccggacg ag 22
 <210> 58
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador pBAD567
 <220>
 10 <221> característica_nueva
 <222> (11)..(12)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 58
 ctggtccgk nncaggatca tg 22
 15 <210> 59
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador pBAD608
 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (11)..(12)
 <223> n es a, c, g, o t
 25 <400> 59
 caagaagggc nnkactctgg cct 23
 <210> 60
 <211> 23
 <212> ADN
 30 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 60 pBAD631
 <220>
 35 <221> característica_nueva
 <222> (12)..(13)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 60
 aggccagagt knngcccttc ttg 23
 <210> 61
 40 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador pBAD663
 45 <220>
 <221> característica_nueva
 <222> (10)..(11)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 61

	gttgtgcctn nkgccgacct cg	22
	<210> 62	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador pBAD685	
	<220>	
	<221> característica_nueva	
10	<222> (12)..(13)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 62	
	cgaggtcggc knnaggcaca ac	22
	<210> 63	
15	<211> 491	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	
	<400> 63	

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Val	Glu	Glu	Gly	Thr	Asp	Pro	Ala	Tyr	Ala	Glu	Lys	Leu	Ile	Gln	Phe	
				245					250					255		
Gly	Trp	Glu	Thr	Ile	Thr	Glu	Ala	Leu	Lys	Gln	Gly	Gly	Ile	Thr	Leu	
			260					265					270			
Met	Met	Asp	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Ala	Lys	Leu	Arg	Ala	Tyr	Ala	Leu	
		275					280					285				
Ser	Glu	Gln	Leu	Lys	Glu	Ile	Met	Ala	Pro	Leu	Phe	Gln	Lys	His	Met	
	290					295					300					
Asp	Asp	Ile	Ile	Ser	Gly	Glu	Phe	Ser	Ser	Gly	Met	Met	Ala	Asp	Trp	
305					310					315					320	
Ala	Asn	Asp	Asp	Lys	Lys	Leu	Leu	Thr	Trp	Arg	Glu	Glu	Thr	Gly	Lys	
				325					330					335		
Thr	Ala	Phe	Glu	Thr	Ala	Pro	Gln	Tyr	Glu	Gly	Lys	Ile	Gly	Glu	Gln	
			340					345					350			
Glu	Tyr	Phe	Asp	Lys	Gly	Val	Leu	Met	Ile	Ala	Met	Val	Lys	Ala	Gly	
		355					360					365				
Val	Glu	Leu	Ala	Phe	Glu	Thr	Met	Val	Asp	Ser	Gly	Ile	Ile	Glu	Glu	
	370					375					380					
Ser	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Leu	His	Glu	Leu	Pro	Leu	Ile	Ala	Asn	Thr	
385					390					395					400	
Ile	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Tyr	Glu	Met	Asn	Val	Val	Ile	Ser	Asp	Thr	
				405					410					415		
Ala	Glu	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Leu	Phe	Ser	Tyr	Ala	Cys	Val	Pro	Leu	Leu	
			420					425					430			
Lys	Pro	Phe	Met	Ala	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Asp	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	
		435					440					445				
Pro	Glu	Gly	Ala	Val	Asp	Asn	Gly	Gln	Leu	Arg	Asp	Val	Asn	Glu	Ala	
	450					455					460					
Ile	Arg	Ser	His	Ala	Ile	Glu	Gln	Val	Gly	Lys	Lys	Leu	Arg	Gly	Tyr	
465					470					475					480	
Met	Thr	Asp	Met	Lys	Arg	Ile	Ala	Val	Ala	Gly						
				485					490							

<210> 64
<211> 493

ES 2 575 413 T3

<212> PRT

<213> gamma proteobacterium N4-7

<400> 64

```

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

Leu Gly Lys Cys Arg Phe Met Asp Arg Ser Glu Phe Thr Asp Gly Cys
          20          25          30

Asp Phe Ile Lys Asp Trp Asn Ile Val Ile Ile Gly Cys Gly Ala Gln
          35          40          45

Gly Leu Asn Gln Gly Leu Asn Met Arg Asp Ser Gly Leu Asn Ile Ser
50          55          60

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

Trp Ala Ser Glu Asn Gly Phe Thr Val Gly Thr Ala Glu Glu Leu Val
          85          90          95

Pro Ala Ala Asp Leu Val Leu Asn Leu Thr Pro Asp Lys Gln His Thr
          100          105          110

Ala Ala Val Thr Ala Val Met Pro Leu Met Lys Gln Gly Ala Thr Leu
          115          120          125

Ala Tyr Ser His Gly Phe Asn Ile Val Glu Glu Gly Met Gln Ile Arg
          130          135          140

Pro Asp Leu Thr Val Val Met Val Ala Pro Lys Cys Pro Gly Thr Glu
          145          150          155          160

Val Arg Glu Glu Tyr Lys Arg Gly Phe Gly Val Pro Thr Leu Ile Ala
          165          170          175

Val His Pro Glu Asn Asp Pro Gln Gly Asn Gly His Ala Ile Ala Lys
          180          185          190

Ala Tyr Ala Ser Ala Thr Gly Gly Asp Arg Ala Gly Val Leu Glu Ser
          195          200          205

Ser Phe Ile Ala Glu Val Lys Ser Asp Leu Met Gly Glu Gln Thr Ile
          210          215          220

```

ES 2 575 413 T3

Leu Cys Gly Met Leu Gln Thr Gly Ala Val Leu Gly His Gln Gln Leu
 225 230 235 240
 Ile Asn Leu Gly Val Asp Ala Ala Tyr Ala Arg Lys Leu Ile Gln Tyr
 245 250 255
 Gly Trp Glu Thr Val Thr Glu Gly Leu Lys His Gly Gly Ile Thr Asn
 260 265 270
 Met Met Asp Arg Leu Ser Asn Pro Ala Lys Ile Lys Ala Phe Asp Met
 275 280 285
 Ser Glu Glu Leu Lys Val Thr Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys His Met
 290 295 300
 Asp Asp Ile Ile Glu Gly Glu Phe Ser His Thr Met Met Ile Asp Trp
 305 310 315 320
 Ala Asn Asp Asp Ala Asn Leu Leu Lys Trp Arg Ala Glu Thr Ala Asp
 325 330 335
 Ser Ser Phe Glu Gln Ala Ala Asp Cys Asp Ile Glu Ile Thr Glu Gln
 340 345 350
 Glu Phe Tyr Asp Lys Gly Ile Tyr Leu Val Ala Met Ile Lys Ala Gly
 355 360 365
 Val Glu Leu Ala Phe Glu Thr Met Val Ala Ser Gly Ile Ile Glu Glu
 370 375 380
 Ser Ala Tyr Tyr Glu Ser Leu His Glu Thr Pro Leu Ile Ala Asn Cys
 385 390 395 400
 Ile Ala Arg Asn Lys Leu Tyr Glu Met Asn Val Val Ile Ser Asp Thr
 405 410 415
 Ala Glu Tyr Gly Asn Tyr Leu Phe Thr His Ala Ala Val Pro Leu Leu
 420 425 430
 Gln Ala His Ala Ser Ser Leu Thr Leu Glu Glu Leu Gly Gly Gly Leu
 435 440 445
 Ala Asp Ser Ser Asn Ala Val Asp Asn Leu Arg Leu Ile Glu Val Asn
 450 455 460
 Asp Ala Ile Arg Asp His Asp Val Glu Ile Ile Gly His Glu Leu Arg
 465 470 475 480
 Gly Tyr Met Thr Asp Met Lys Arg Ile Val Glu Ala Gly
 485 490

ES 2 575 413 T3

<210> 65
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Desulfuromonas acetoxidans

5 <400> 65

```

Met Gly Gln Asn Tyr Phe Asn Thr Leu Ser Met Arg Glu Lys Leu Asp
1          5          10          15

Glu Leu Gly Thr Cys Arg Phe Met Asp Ala Ser Glu Phe Ala Gly Gly
20          25          30

Cys Glu Tyr Ala Lys Gly Lys Lys Ile Val Ile Val Gly Cys Gly Ala
35          40          45

Gln Gly Leu Asn Gln Gly Leu Asn Met Arg Asp Ser Gly Leu Asp Val
50          55          60

Ser Tyr Thr Leu Arg Lys Glu Ala Ile Ala Glu Lys Arg Gln Ser Tyr
65          70          75          80

Ile Asn Ala Thr Glu Asn Gly Phe Thr Val Gly Ser Tyr Glu Glu Leu
85          90          95

Leu Pro Thr Ala Asp Ile Val Met Asn Leu Ala Pro Asp Lys Gln His
100         105         110

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

Phe Ser Tyr Ala His Gly Phe Asn Ile Val Glu Glu Gly Thr Ile Ile
130         135         140

Arg Lys Asp Leu Thr Val Ile Met Val Ala Pro Lys Cys Pro Gly Ser
145         150         155         160

Glu Val Arg Ala Glu Tyr Gln Arg Gly Phe Gly Val Pro Thr Leu Ile
165         170         175

Ala Val His Lys Glu Asn Asp Pro Asn Gly Asp Gly Leu Glu Leu Ala
180         185         190

Lys Ala Leu Cys Ser Ala Gln Gly Gly Asp Arg Ala Gly Val Leu Glu
195         200         205
  
```

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

450

455

460

Ala Asp Ile Arg Ser His Tyr Ile Glu Glu Ile Gly Glu Glu Leu Arg
465 470 475 480

Asp Ala Met Gln Gly Met Lys Ala Ile Val
485 490

<210> 66
<211> 581
<212> PRT
5 <213> Pisum sativum

<400> 66

Met Ala Ala Val Thr Ser Ser Cys Ser Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ser
1 5 10 15

Lys Thr Leu Ala Lys Pro Val Ala Ala Ser Phe Ala Pro Thr Asn Leu
20 25 30

Ser Phe Ser Lys Leu Ser Pro Gln Ser Ile Arg Ala Arg Arg Ser Ile
35 40 45

Thr Val Gly Ser Ala Leu Gly Ala Thr Lys Val Ser Ala Pro Pro Ala
50 55 60

Thr His Pro Val Ser Leu Asp Phe Glu Thr Ser Val Phe Lys Lys Glu
65 70 75 80

Arg Val Asn Leu Ala Gly His Glu Glu Tyr Ile Val Arg Gly Gly Arg
85 90 95

Asp Leu Phe His Leu Leu Pro Asp Ala Phe Lys Gly Ile Lys Gln Ile
100 105 110

Gly Val Ile Gly Trp Gly Ser Gln Gly Pro Ala Gln Ala Gln Asn Leu
115 120 125

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

Leu Arg Lys Gly Ser Ser Ser Phe Asn Glu Ala Arg Glu Ala Gly Phe
145 150 155 160

Ser Glu Glu Lys Gly Thr Leu Gly Asp Ile Trp Glu Thr Ile Ser Gly
165 170 175

Ser Asp Leu Val Leu Leu Leu Ile Ser Asp Ser Ala Gln Ala Asp Asn

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Arg Ser Thr Arg Pro Ala Gly Asp Leu Gly Pro Leu Tyr Pro Phe Thr
435 440 445

Ala Gly Val Phe Val Ala Met Met Met Ala Gln Ile Glu Val Leu Arg
450 455 460

Lys Lys Gly His Ser Tyr Ser Glu Ile Ile Asn Glu Ser Val Ile Glu
465 470 475 480

Ser Val Asp Ser Leu Asn Pro Phe Met His Ala Arg Gly Val Ser Phe
485 490 495

Met Val Asp Asn Cys Ser Thr Thr Ala Arg Leu Gly Ser Arg Lys Trp
500 505 510

Ala Pro Arg Phe Asp Tyr Ile Leu Thr Gln Gln Ala Leu Val Ala Val
515 520 525

Asp Ser Gly Ala Pro Ile Asn Gln Asp Leu Ile Ser Asn Phe Val Ser
530 535 540

Asp Pro Val His Gly Ala Ile Gln Val Cys Ala Glu Leu Arg Pro Thr
545 550 555 560

Leu Asp Ile Ser Val Pro Ala Ala Ala Asp Phe Val Arg Pro Glu Leu
565 570 575

Arg Gln Cys Ser Asn
580

<210> 67

<211> 338

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> mutante KARI 3361G8

<400> 67

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
20 25 30

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

Gly Ala Ala Asp Ala Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Phe Lys Val Thr

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala
325 330 335

Lys Asn

<210> 68

<211> 338

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> mutante KARI 2H10

<400> 68

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Phe Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
20 25 30

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

Gly Ala Ala Asp Ile Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Phe Lys Val Thr
50 55 60

Asp Val Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Ile
65 70 75 80

Pro Asp Glu Phe Gln Ser Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn
85 90 95

Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His
100 105 110

Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala
115 120 125

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly
130 135 140

Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Val Ser Gly Asn Ala
145 150 155 160

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

ES 2 575 413 T3

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

Lys Asn

<210> 69

<211> 338

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> mutante KARI 1D2

<400> 69

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly	1	5	10	15
---	---	---	----	----

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Phe Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala	20	25	30
---	----	----	----

ES 2 575 413 T3

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

ES 2 575 413 T3

275

280

285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala
325 330 335

Lys Asn

<210> 70

<211> 338

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> mutante KARI 3F12

<400> 70

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1 5 10 15

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Phe Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
20 25 30

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

Gly Ala Ala Asp Ala Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Phe Lys Val Thr
50 55 60

Asp Val Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Ile
65 70 75 80

Pro Asp Glu Phe Gln Ser Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn
85 90 95

Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His
100 105 110

Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala
115 120 125

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly
130 135 140

ES 2 575 413 T3

Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Val Ser Gly Asn Ala
145 150 155 160

Lys Asn Val Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Gly Val Gly Gly Gly Arg Thr
165 170 175

Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe
180 185 190

Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Val Glu Leu Val Lys Ala
195 200 205

Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr
210 215 220

Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu
225 230 235 240

Gly Gly Ile Ala Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr
245 250 255

Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Ala Glu Ser Arg Gln
260 265 270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala
325 330 335

Lys Asn

REIVINDICACIONES

1. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa como se expone en la ID de SEC N°: 17, en la que
 - a) el resto 52 se muta; o
 - b) los restos 47, 50 y 52 se mutan; o
- 5 c) el resto 52 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en 24, 33, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170 se mutan; o
- d) los restos 47, 50, 52 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en 24, 33, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170 se mutan; y
- 10 en la que dicha enzima cetol-ácido reductoisomerasa en el que dicha enzima cetol-ácido reductoisomerasa tiene una preferencia por la unión NADH en lugar de por NADPH, y en donde dicha mutación es una sustitución de aminoácidos.
2. La enzima cetol-ácido reductoisomerasa según la reivindicación 1, en la que el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N y S.
3. La enzima cetol-ácido reductoisomerasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que:
 - 15 a) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, F, G, I, L, N, P e Y;
 - b) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, M, N, V, W; y
 - 20 c) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N y S.
4. La enzima cetol-ácido reductoisomerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que:
 - a) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de V;
 - b) el resto en la posición 165 tiene una sustitución de aminoácido de M;
 - c) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
 - 25 d) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de A;
 - e) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
 - f) el resto en la posición 33 tiene una sustitución de aminoácidos de L;
 - g) el resto en la posición 80 tiene una sustitución de aminoácidos de I;
 - h) el resto en la posición 115 tiene una sustitución de aminoácidos de L; y
 - 30 i) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, H, I, W.
5. La enzima cetol-ácido reductoisomerasa según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC N°: 29.
- 35 6. Una molécula de ácido nucleico que codifica la enzima cetol-ácido reductoisomerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una célula recombinante que comprende la enzima cetol-ácido reductoisomerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. Un procedimiento para la evolución de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:
 - 40 a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADPH que tiene una secuencia de aminoácidos nativa específica;
 - b) identificar un resto que conmuta el cofactor en la enzima de a) basado en la secuencia de aminoácidos de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa *Pseudomonas fluorescens* como se expone en la ID de SEC N°: 17 en la que el resto que conmuta el cofactor de la ID de SEC N°: 17 se encuentra en la posición 52;

c) crear una mutación en el resto que conmuta el cofactor identificado en b) para crear una enzima mutante en donde dicha enzima mutante une NADH.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N y S.

5 10. El procedimiento de la reivindicación 8 en el que la enzima cetol-ácido reductoisomerasa tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC N°: 29.

11. Un procedimiento para la producción de isobutanol, que comprende:

a) proporcionar una célula anfitriona microbiana recombinante que comprende las siguientes constructos genéticos:

10 i) al menos un constructo genético que codifica una enzima acetolactato sintasa para la transformación de piruvato en acetolactato;

ii) al menos un constructo genético que codifica una enzima cetol-ácido reductoisomerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

iii) al menos un constructo genético que codifica una acetohidroxiácido deshidratasa para la transformación de 2,3-dihidroxi-isovalerato en α -ceto-isovalerato (ruta de la etapa c);

15 iv) al menos un constructo genético que codifica una cetoácido descarboxilasa de de cadena ramificada, para la transformación de α -cetoisovalerato en isobutiraldehído (ruta de la etapa d);

v) al menos un constructo genético que codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada para la transformación de isobutiraldehído a isobutanol (ruta de la etapa e); y

b) cultivar la célula anfitriona de a) en condiciones donde se produce iso-butanol.

20 12. Un procedimiento para la evolución e identificación de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:

a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC N°: 17;

25 b) identificar los restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos cuyas cadenas laterales están en cercana proximidad a la adenosil 2'-fosfato de NADPH como objetivos de mutagénesis;

c) crear una biblioteca de enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes a partir de la enzima de la etapa a), que tienen una mutación en el resto 52; y

d) cribar la biblioteca de enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes de la etapa c) para identificar enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes que unen NADH.

30

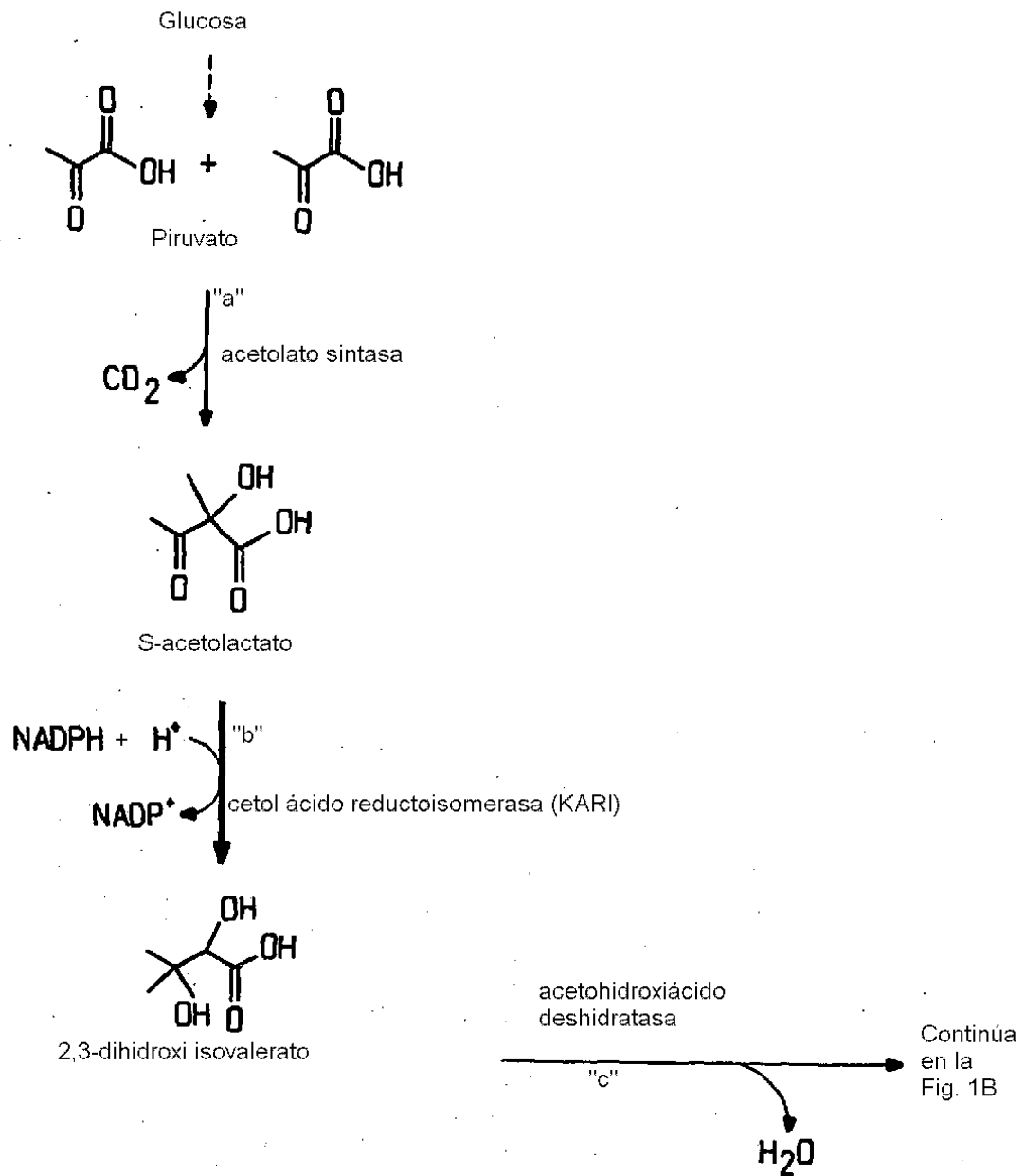


FIG. 1A

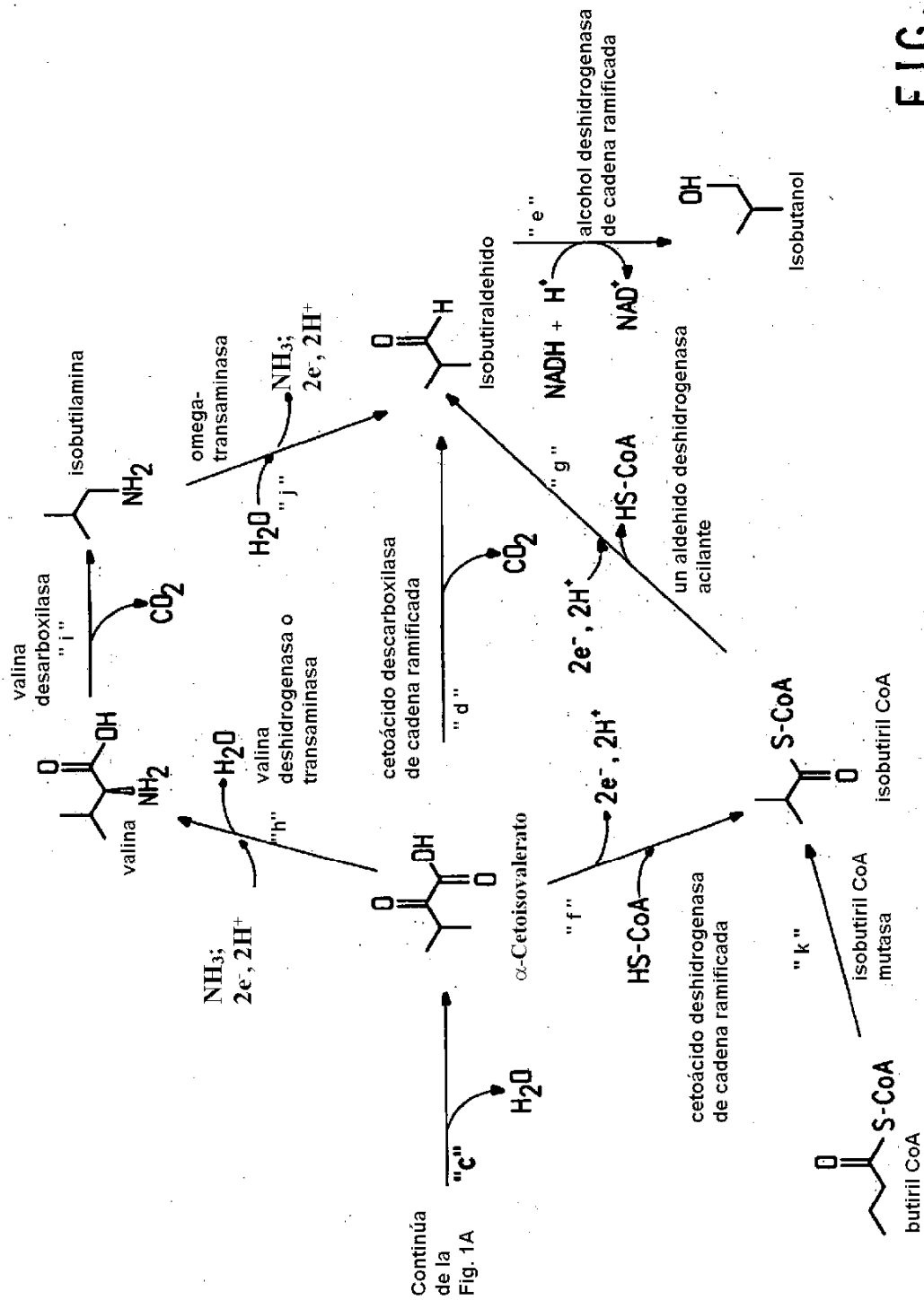


FIG. 1B

PF5 - KARI	(44)	VGLRKGSATVAKA
PAD - KARI	(44)	VGLRSGSATVAKA
Espinaca_KARI	(162)	IGLRKGSNSFAEA

FIG. 2A

	59	72
MMC5	(44)	VGLRKNGASWENAK
MMS2	(44)	VGLRKNGASWNNAK
MVSB	(44)	VGLRKNGASWENAK
PF5-ilvC	(44)	VGLRKGSATVAKAE
KARI-S1	(44)	VGLRKNGASWNAKAV
ilv5	(59)	IGVRKDGASWKAAI
KARI-D1	(48)	VGLEREGKSWELAK
KARI-D2	(45)	IGLRRGGKSWELAT
Consenso	(59)	VGLRKNGASWE AK

FIG. 2B

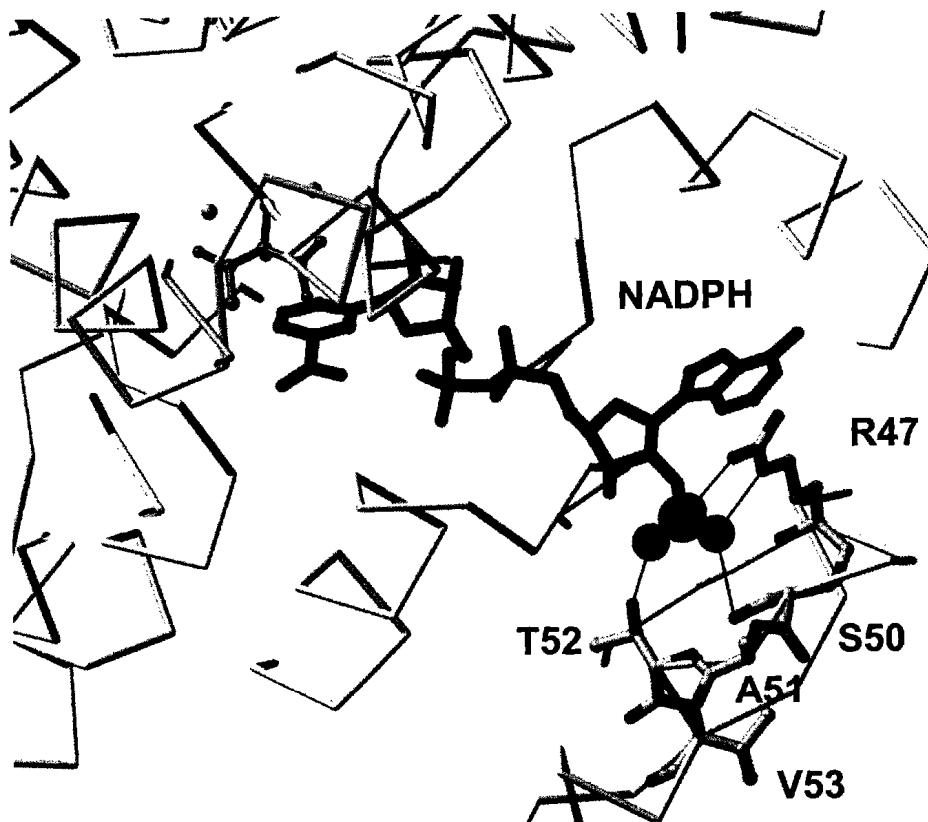


FIG. 3

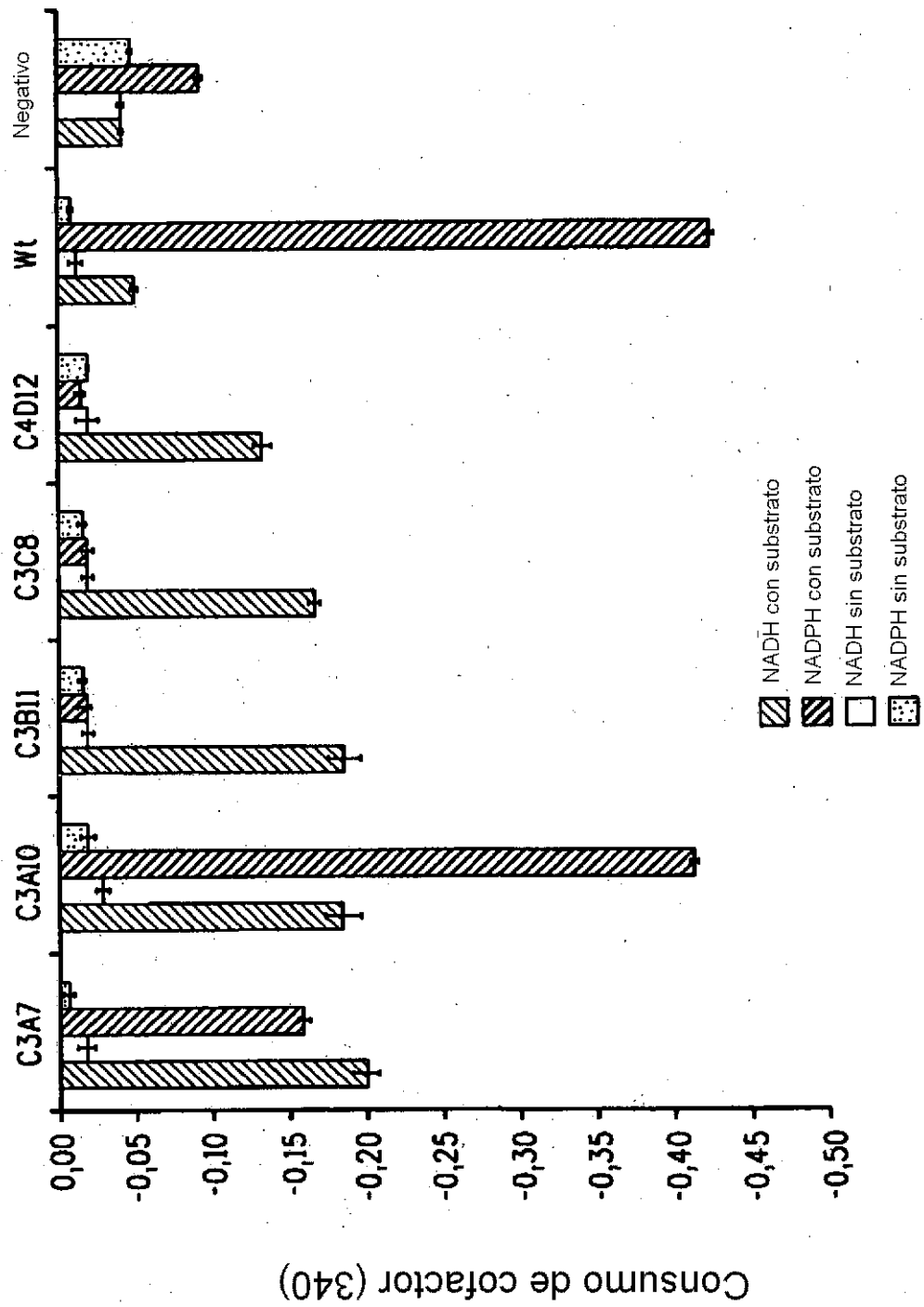


FIG. 4

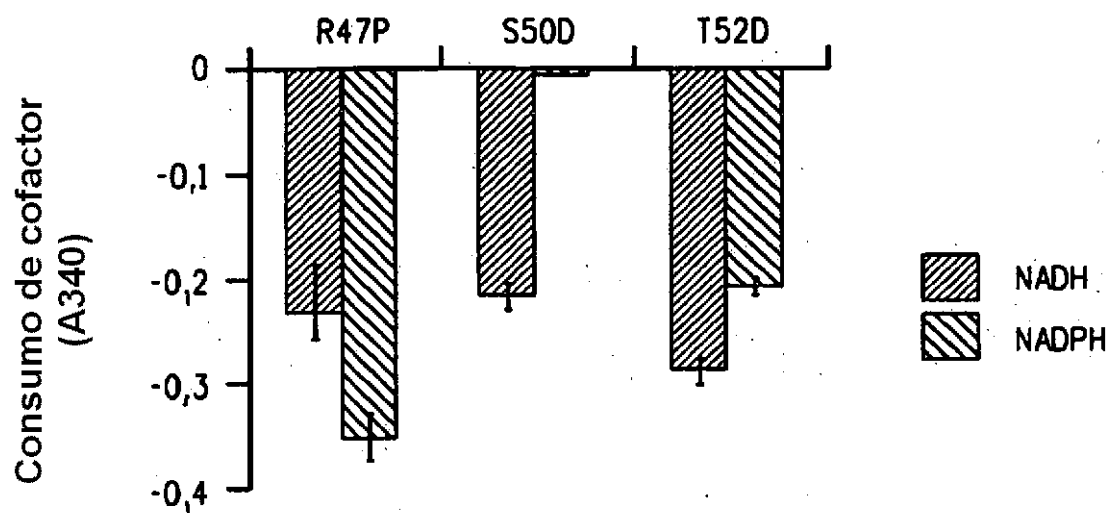


FIG. 5A

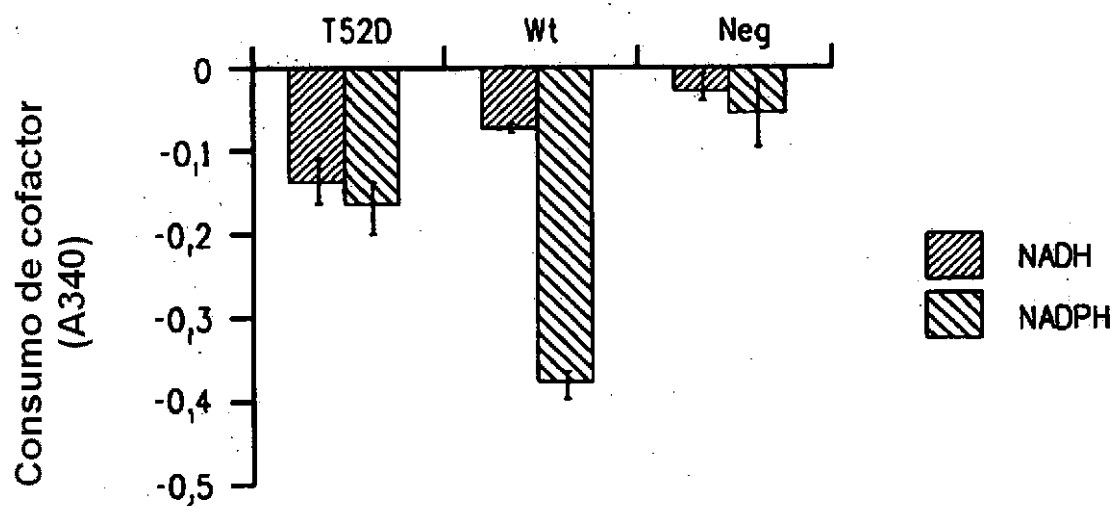


FIG. 5B

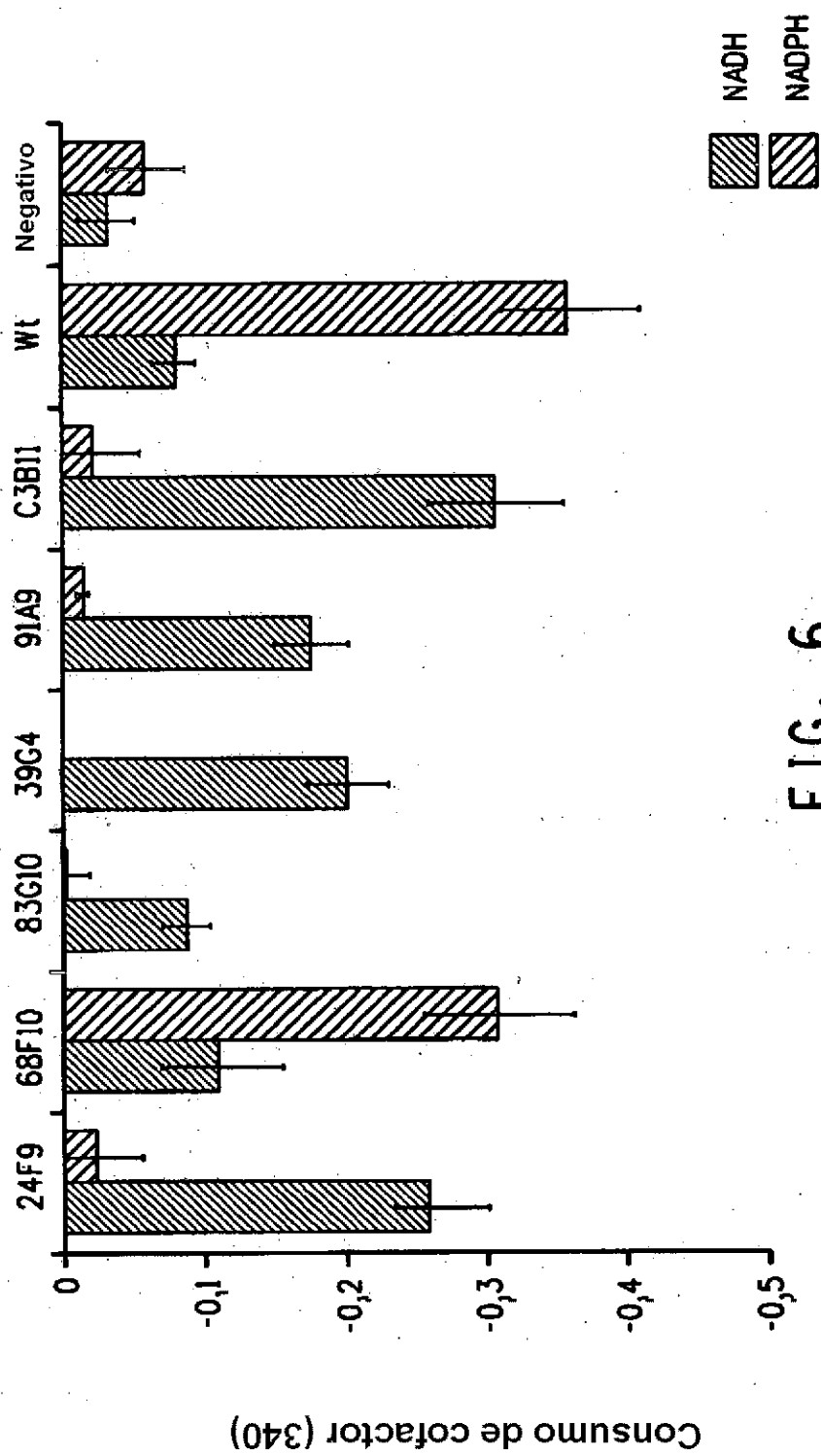


FIG. 6

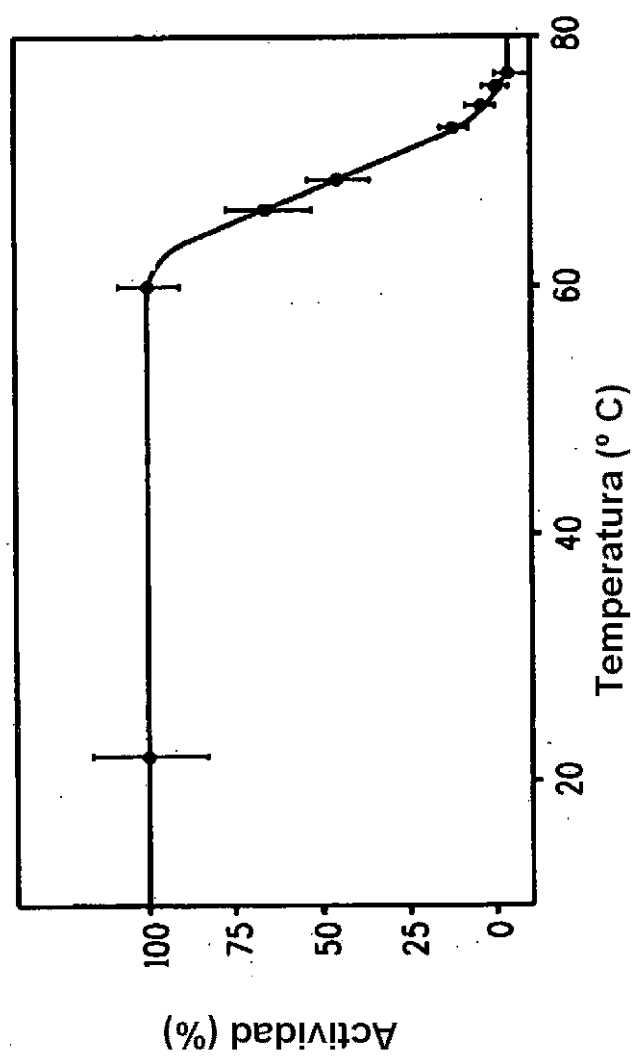


FIG. 7

	51		100
ilvC1 B cereus	(18)	-----KKVAIIIGYSSQGHAAQNLRD-----NGFDVVVGLRKG-KSWDKA	
ilvC2 B cereus	(17)	-----KTVAVIGYSSQGHAAQNLRD-----SGVEVWVVRPG-KSFEVA	
Espinaca KARI	(51)	FKGIKQIGVIGWGSQAPAAQNLRDLSLEAKSDVVVWIKIGLRKGSNSFAEA	
PAO KARI	(17)	-----KKVAIIIGYSSQGHAAQNLRD-----SGVDVTVGLRSGSATVAKA	
PF5 KARI	(17)	-----KKVAIIIGYSSQGHAAQNLRD-----SGVDVTVGLRSGSATVAKA	
	101		150
ilvC1 B cereus	(57)	KEIDFFS-----VYTVAEAKQADVVMIILPDELQPEVVEAEIAPNLQACN	
ilvC2 B cereus	(56)	KTDGFE-----VMSVSEAVRFAQVVQMILPDEQQAHVYKAGVEENLRGQ	
Espinaca KARI	(101)	RPAGFSENGTIGDMWETISGSDLVLLIISDSAQADNYEKVFSHMK-PNS	
PAO KARI	(57)	EPHGLK-----VADVKTAAADVVMIILPDEFQGRLYKEEIEPNLKKGA	
PF5 KARI	(57)	EPHGLK-----VTDVAAAVAGADLVMIILPDEFQSQLYKNEIEPNIKKGA	
	151		200
ilvC1 B cereus	(102)	SLVFAHGFNVHFDQVK----PPANVDVFLVAPKPGPHLVRRTFSEG-----	
ilvC2 B cereus	(101)	MLLFSGHFNHFQIN----PPSYVDVAMVAPKSPGHLVRRVFQEG-----	
Espinaca KARI	(150)	ILGLSHGFLIGHLQSLGQDFPKNISVIAVCPKMGPSVRRLYVQGKEVNG	
PAO KARI	(102)	TLAFAHGFSIHYNQV----PRADLDVIMIAPKAPGHTVRSEFVKG-----	
PF5 KARI	(102)	TLAFAHGFAIHYNQV----PRADLDVIMIAPKAPGHTVRSEFVKG-----	
	201		250
ilvC1 B cereus	(144)	GAVPALFAVYQDAATGVATEKALSADCTGATRAGVLETTFKEETETDLFG	
ilvC2 B cereus	(143)	NGVPALVAVHQDATTGTAHVALAYAKGVGCTRAGVIETTFQETETDLFG	
Espinaca KARI	(200)	AGINSSFAVHQDVVGRATDVALGWSIALG--SPFTFATTLEQYKSDIFG	
PAO KARI	(144)	GGIPDLIAIYQDASGNKNVALSYACGVGGGRTGIIETTFKDEETETDLFG	
PF5 KARI	(144)	GGIPDLIAIYQDASGNKNVALSYAAGVGGGRTGIIETTFKDEETETDLFG	

FIG. 8

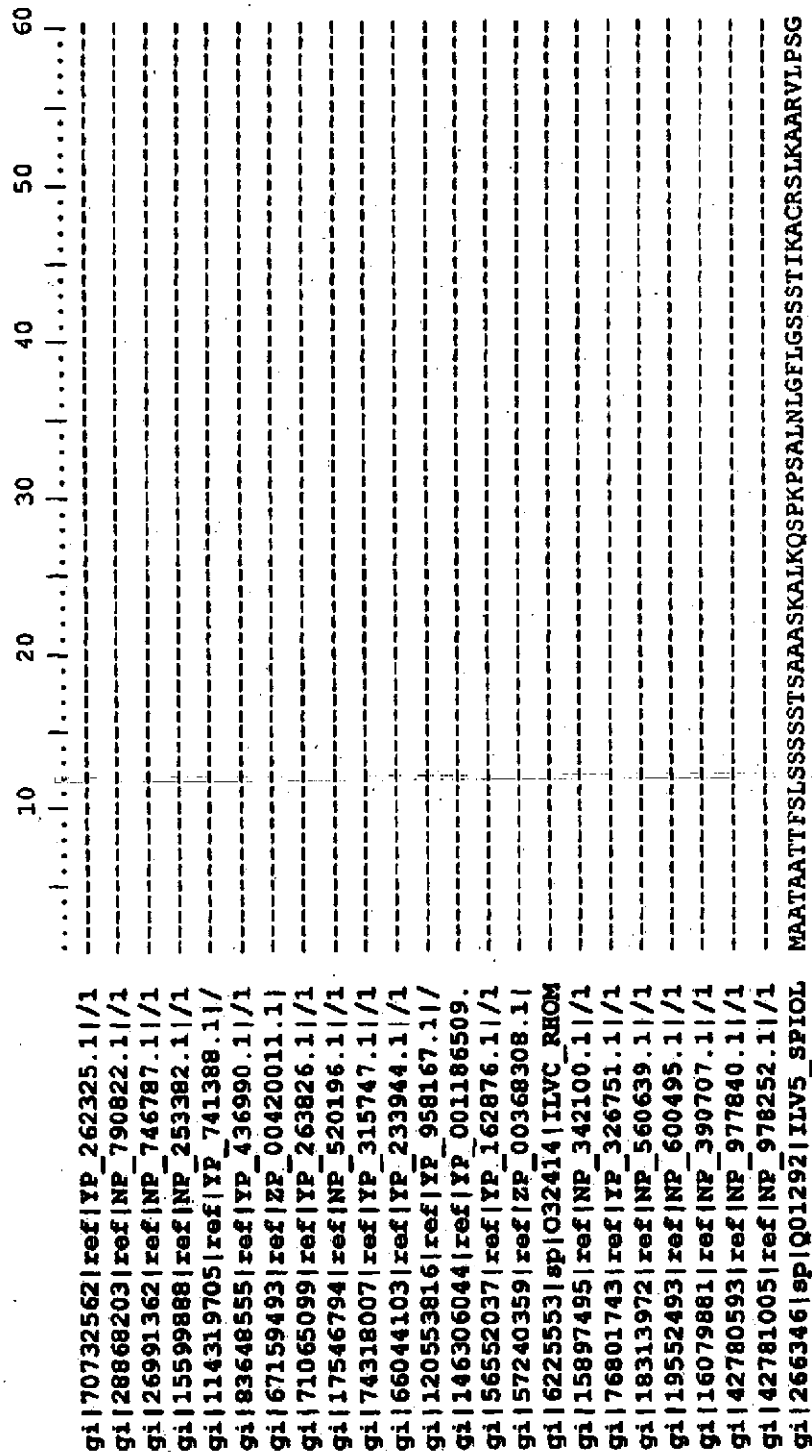


FIG. 9A

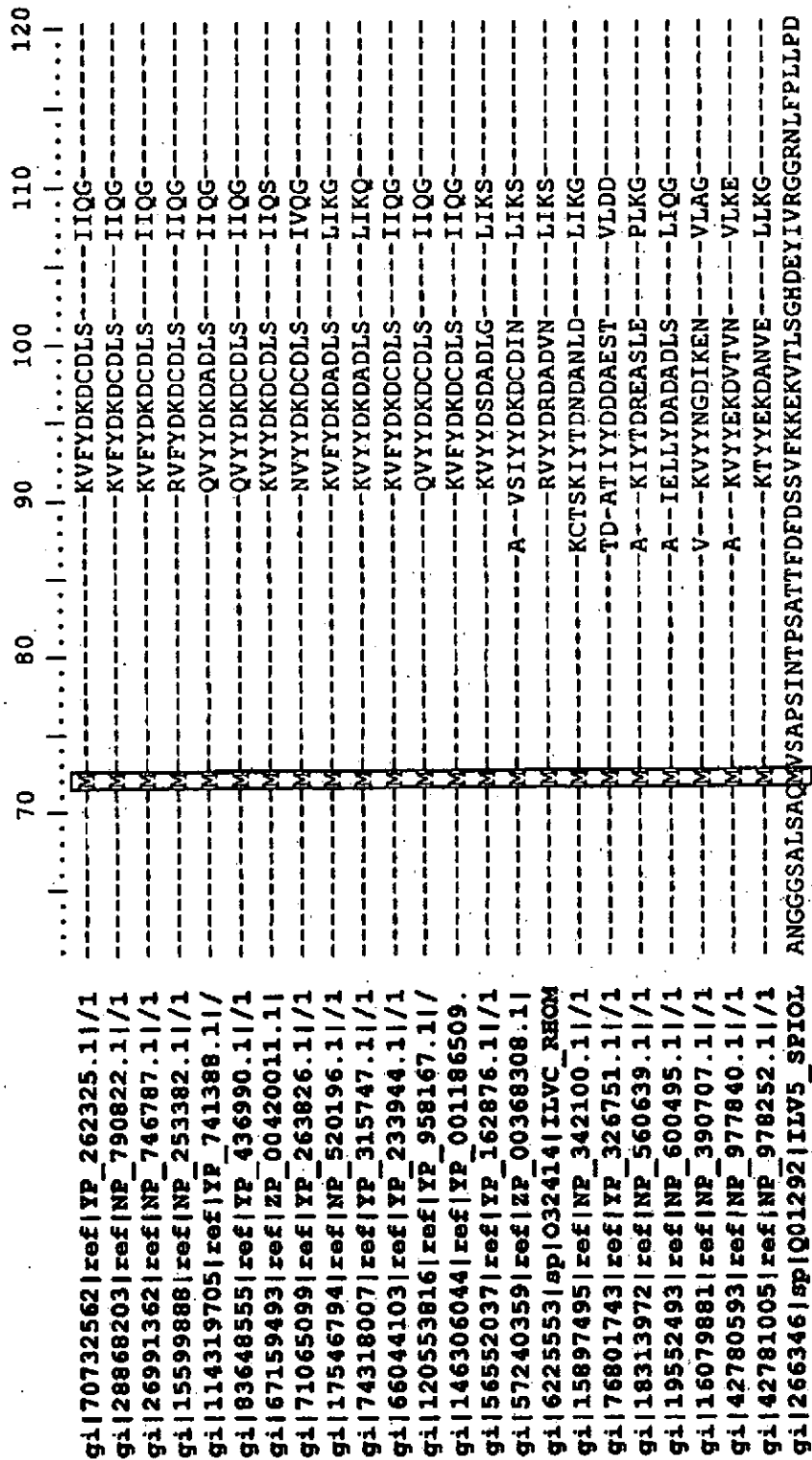


FIG. 9B

FIG. 9C

	190	200	210	220	230	240
						
gi	70732562 ref YP_262325.1 /1	VTDVAAVAGADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVAAVAGADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVAAVAGADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVAAVAGADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVAAVAGADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	28868203 ref NP_790822.1 /1	VTDVASAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVASAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVASAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVASAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVASAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	26991362 ref NP_746787.1 /1	VADVATAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VADVATAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VADVATAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VADVATAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VADVATAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	15599888 ref NP_253382.1 /1	VADVKTAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VADVKTAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VADVKTAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VADVKTAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VADVKTAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	114319705 ref YP_741388.1 /	VASIEDAAQAQADVMIITPDEHQAQVYHNQIAPNVKPGAAIAFAHGFNIHFGQIQPA	VASIEDAAQAQADVMIITPDEHQAQVYHNQIAPNVKPGAAIAFAHGFNIHFGQIQPA	VASIEDAAQAQADVMIITPDEHQAQVYHNQIAPNVKPGAAIAFAHGFNIHFGQIQPA	VASIEDAAQAQADVMIITPDEHQAQVYHNQIAPNVKPGAAIAFAHGFNIHFGQIQPA	VASIEDAAQAQADVMIITPDEHQAQVYHNQIAPNVKPGAAIAFAHGFNIHFGQIQPA
gi	83648555 ref YP_436990.1 /1	VKEVAEAVAGADVMIITPDEFFQAQLYKSEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKEVAEAVAGADVMIITPDEFFQAQLYKSEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKEVAEAVAGADVMIITPDEFFQAQLYKSEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKEVAEAVAGADVMIITPDEFFQAQLYKSEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKEVAEAVAGADVMIITPDEFFQAQLYKSEIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	167159493 ref ZP_00420011.1	VKSVDAAVAAADVMIITPDEFFQGRLYKDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKSVDAAVAAADVMIITPDEFFQGRLYKDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKSVDAAVAAADVMIITPDEFFQGRLYKDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKSVDAAVAAADVMIITPDEFFQGRLYKDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKSVDAAVAAADVMIITPDEFFQGRLYKDEIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	17065099 ref YP_263826.1 /1	VAEVEEAVKAADIIMILTPDEFFQKELYNDVIEPNKKGATLAFSGHGF	VAEVEEAVKAADIIMILTPDEFFQKELYNDVIEPNKKGATLAFSGHGF	VAEVEEAVKAADIIMILTPDEFFQKELYNDVIEPNKKGATLAFSGHGF	VAEVEEAVKAADIIMILTPDEFFQKELYNDVIEPNKKGATLAFSGHGF	VAEVEEAVKAADIIMILTPDEFFQKELYNDVIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	17546794 ref NP_520196.1 /1	VKEVAEAVKADADVMIITPDEFFQKELYNDVIEPNKKGATLAFSGHGF	VKEVAEAVKADADVMIITPDEFFQKELYNDVIEPNKKGATLAFSGHGF	VKEVAEAVKADADVMIITPDEFFQKELYNDVIEPNKKGATLAFSGHGF	VKEVAEAVKADADVMIITPDEFFQKELYNDVIEPNKKGATLAFSGHGF	VKEVAEAVKADADVMIITPDEFFQKELYNDVIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	174318007 ref YP_315747.1 /1	VKSPEAVAGADLVMIITPDEFFQSRLYRDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKSPEAVAGADLVMIITPDEFFQSRLYRDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKSPEAVAGADLVMIITPDEFFQSRLYRDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKSPEAVAGADLVMIITPDEFFQSRLYRDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VKSPEAVAGADLVMIITPDEFFQSRLYRDEIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	66044103 ref YP_233944.1 /1	VTDVASAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVASAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVASAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVASAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVASAVAAADLVMIITPDEFFQSOLYKNEIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	120553816 ref YP_958167.1 /	TSDVASAVASADVMIITPDEFFQAQLYREEIEPNKKGATLAFSGHGF	TSDVASAVASADVMIITPDEFFQAQLYREEIEPNKKGATLAFSGHGF	TSDVASAVASADVMIITPDEFFQAQLYREEIEPNKKGATLAFSGHGF	TSDVASAVASADVMIITPDEFFQAQLYREEIEPNKKGATLAFSGHGF	TSDVASAVASADVMIITPDEFFQAQLYREEIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	146306044 ref YP_001186509.	VTDVATAVAAADLVMIITPDEFFQGRLYKDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVATAVAAADLVMIITPDEFFQGRLYKDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVATAVAAADLVMIITPDEFFQGRLYKDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVATAVAAADLVMIITPDEFFQGRLYKDEIEPNKKGATLAFSGHGF	VTDVATAVAAADLVMIITPDEFFQGRLYKDEIEPNKKGATLAFSGHGF
gi	56552037 ref YP_162876.1 /1	VLTNAAAKWADILMILPDEHQAQVYHNQIAPNVKPGAAIAFAHGFNIHFGQIEPR	VLTNAAAKWADILMILPDEHQAQVYHNQIAPNVKPGAAIAFAHGFNIHFGQIEPR	VLTNAAAKWADILMILPDEHQAQVYHNQIAPNVKPGAAIAFAHGFNIHFGQIEPR	VLTNAAAKWADILMILPDEHQAQVYHNQIAPNVKPGAAIAFAHGFNIHFGQIEPR	VLTNAAAKWADILMILPDEHQAQVYHNQIAPNVKPGAAIAFAHGFNIHFGQIEPR
gi	57240359 ref ZP_00368308.1	VKSVEATKEADLIMILPDEIQSEIFNEEIKPELKAGKTAFSGHGFNIHYGQIVAP	VKSVEATKEADLIMILPDEIQSEIFNEEIKPELKAGKTAFSGHGFNIHYGQIVAP	VKSVEATKEADLIMILPDEIQSEIFNEEIKPELKAGKTAFSGHGFNIHYGQIVAP	VKSVEATKEADLIMILPDEIQSEIFNEEIKPELKAGKTAFSGHGFNIHYGQIVAP	VKSVEATKEADLIMILPDEIQSEIFNEEIKPELKAGKTAFSGHGFNIHYGQIVAP
gi	6225553 sp O32414 ILVC_RHOM	VLTPAEAAWADVMIITPDELOQADLYKSELAANLKPAAALVFAHGLAIHFKLIEAR	VLTPAEAAWADVMIITPDELOQADLYKSELAANLKPAAALVFAHGLAIHFKLIEAR	VLTPAEAAWADVMIITPDELOQADLYKSELAANLKPAAALVFAHGLAIHFKLIEAR	VLTPAEAAWADVMIITPDELOQADLYKSELAANLKPAAALVFAHGLAIHFKLIEAR	VLTPAEAAWADVMIITPDELOQADLYKSELAANLKPAAALVFAHGLAIHFKLIEAR
gi	15897495 ref NP_342100.1 /1	PLHTKDAVKDADIIFLVPMVQRTLWLESVQPYMKKGADLVFAHGFNIHYKLIJDP	PLHTKDAVKDADIIFLVPMVQRTLWLESVQPYMKKGADLVFAHGFNIHYKLIJDP	PLHTKDAVKDADIIFLVPMVQRTLWLESVQPYMKKGADLVFAHGFNIHYKLIJDP	PLHTKDAVKDADIIFLVPMVQRTLWLESVQPYMKKGADLVFAHGFNIHYKLIJDP	PLHTKDAVKDADIIFLVPMVQRTLWLESVQPYMKKGADLVFAHGFNIHYKLIJDP
gi	76801743 ref YP_326751.1 /1	VATPRGAAEQADLVSVIIPDETVQPAVYE-QIEDVLQPGDTLQFAHGFNIHYGQIEPS	VATPRGAAEQADLVSVIIPDETVQPAVYE-QIEDVLQPGDTLQFAHGFNIHYGQIEPS	VATPRGAAEQADLVSVIIPDETVQPAVYE-QIEDVLQPGDTLQFAHGFNIHYGQIEPS	VATPRGAAEQADLVSVIIPDETVQPAVYE-QIEDVLQPGDTLQFAHGFNIHYGQIEPS	VATPRGAAEQADLVSVIIPDETVQPAVYE-QIEDVLQPGDTLQFAHGFNIHYGQIEPS
gi	18313972 ref NP_560639.1 /1	VYEIGEAVRKADVILVILIPDEQPKVWQEQIAPNLKEGVVDFAHGFNVHFGLIKPP	VYEIGEAVRKADVILVILIPDEQPKVWQEQIAPNLKEGVVDFAHGFNVHFGLIKPP	VYEIGEAVRKADVILVILIPDEQPKVWQEQIAPNLKEGVVDFAHGFNVHFGLIKPP	VYEIGEAVRKADVILVILIPDEQPKVWQEQIAPNLKEGVVDFAHGFNVHFGLIKPP	VYEIGEAVRKADVILVILIPDEQPKVWQEQIAPNLKEGVVDFAHGFNVHFGLIKPP
gi	19552493 ref NP_600495.1 /1	VKTAEAAWADVIMILPDETSQAEIFTNDIEPNLNAGDALLFGHGLNIHFDLIKPA	VKTAEAAWADVIMILPDETSQAEIFTNDIEPNLNAGDALLFGHGLNIHFDLIKPA	VKTAEAAWADVIMILPDETSQAEIFTNDIEPNLNAGDALLFGHGLNIHFDLIKPA	VKTAEAAWADVIMILPDETSQAEIFTNDIEPNLNAGDALLFGHGLNIHFDLIKPA	VKTAEAAWADVIMILPDETSQAEIFTNDIEPNLNAGDALLFGHGLNIHFDLIKPA
gi	16079881 ref NP_390707.1 /1	VFSVKEAAQAQAEIIMVLLPDEQQQKVYEAIEKDELTAAGKSLVFAHGFNVHFGQIVPP	VFSVKEAAQAQAEIIMVLLPDEQQQKVYEAIEKDELTAAGKSLVFAHGFNVHFGQIVPP	VFSVKEAAQAQAEIIMVLLPDEQQQKVYEAIEKDELTAAGKSLVFAHGFNVHFGQIVPP	VFSVKEAAQAQAEIIMVLLPDEQQQKVYEAIEKDELTAAGKSLVFAHGFNVHFGQIVPP	VFSVKEAAQAQAEIIMVLLPDEQQQKVYEAIEKDELTAAGKSLVFAHGFNVHFGQIVPP
gi	42780593 ref NP_977840.1 /1	VYTVAEAAKQADVMIITPDELOQADLYKSELAANLKPAAALVFAHGLAIHFKLIEAR	VYTVAEAAKQADVMIITPDELOQADLYKSELAANLKPAAALVFAHGLAIHFKLIEAR	VYTVAEAAKQADVMIITPDELOQADLYKSELAANLKPAAALVFAHGLAIHFKLIEAR	VYTVAEAAKQADVMIITPDELOQADLYKSELAANLKPAAALVFAHGLAIHFKLIEAR	VYTVAEAAKQADVMIITPDELOQADLYKSELAANLKPAAALVFAHGLAIHFKLIEAR
gi	42781005 ref NP_978252.1 /1	VMSVSEAVRTAQVQVMIITPDEQQAQHVYKAGVEENLREGQMLLFSHGFNIHFGQINPP	VMSVSEAVRTAQVQVMIITPDEQQAQHVYKAGVEENLREGQMLLFSHGFNIHFGQINPP	VMSVSEAVRTAQVQVMIITPDEQQAQHVYKAGVEENLREGQMLLFSHGFNIHFGQINPP	VMSVSEAVRTAQVQVMIITPDEQQAQHVYKAGVEENLREGQMLLFSHGFNIHFGQINPP	VMSVSEAVRTAQVQVMIITPDEQQAQHVYKAGVEENLREGQMLLFSHGFNIHFGQINPP
gi	266346 sp Q01292 ILV5_SPIOL	NGTLGDMWETISGSDLVLLIISDSAQADNYE-KVFSHMKPNISILGLSHGFLIGHLQSLGQ	NGTLGDMWETISGSDLVLLIISDSAQADNYE-KVFSHMKPNISILGLSHGFLIGHLQSLGQ	NGTLGDMWETISGSDLVLLIISDSAQADNYE-KVFSHMKPNISILGLSHGFLIGHLQSLGQ	NGTLGDMWETISGSDLVLLIISDSAQADNYE-KVFSHMKPNISILGLSHGFLIGHLQSLGQ	NGTLGDMWETISGSDLVLLIISDSAQADNYE-KVFSHMKPNISILGLSHGFLIGHLQSLGQ

FIG. 9D

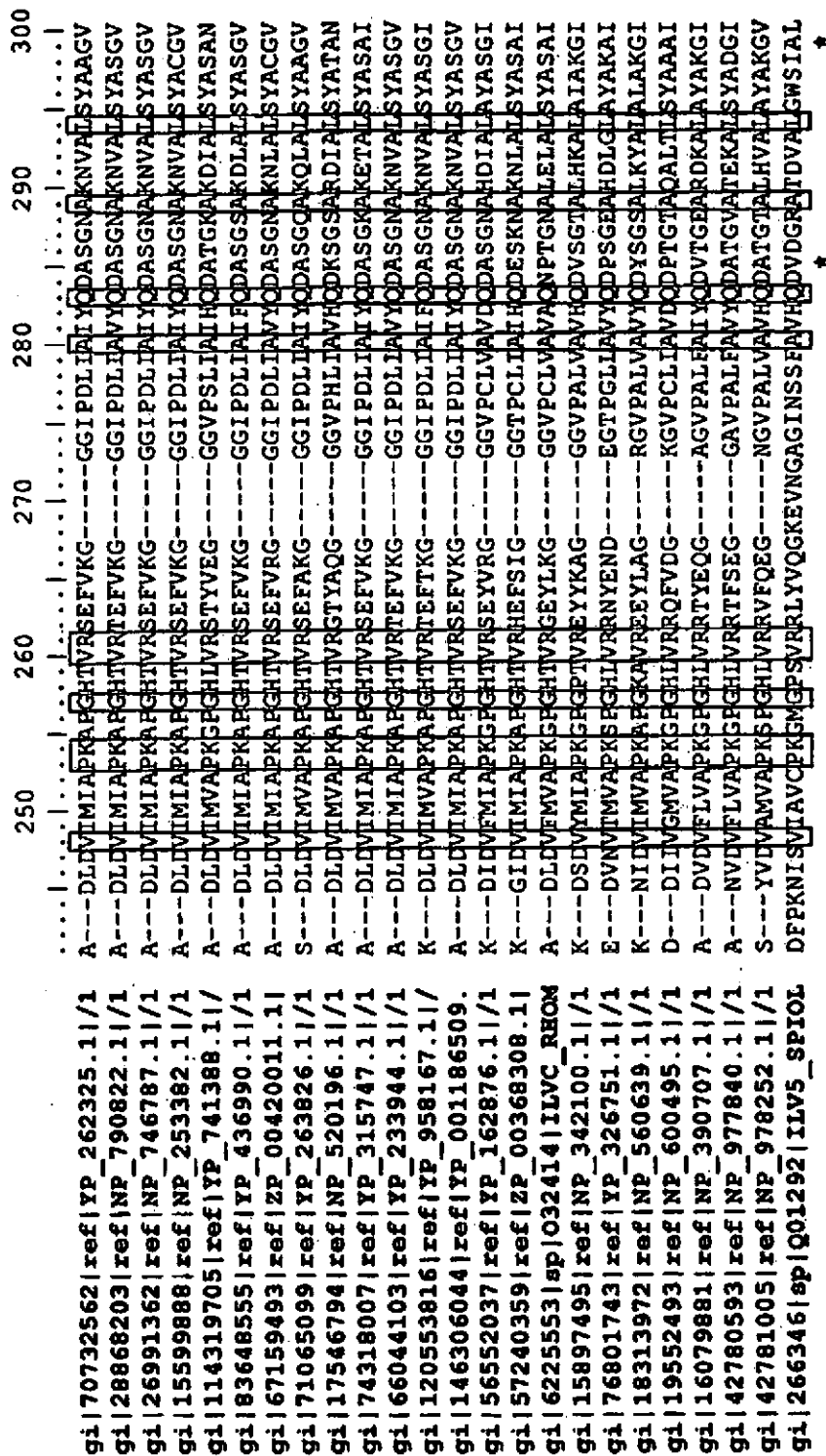


FIG. 9E

gi 70732562 ref YP_262325.1 1/1	GGRTGIETTFKDETE	DLFGEQAVLGGTV	ELVKAGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHEL	310	320	330	340	350	360
gi 28868203 ref NP_790822.1 1/1	gi 28868203 ref NP_790822.1 1/1	GGRTGIETTFKDETE	DLFGEQAVLGGTV	ELVKAGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHEL					
gi 26991362 ref NP_746787.1 1/1	gi 26991362 ref NP_746787.1 1/1	GGRTGIETTFKDETE	DLFGEQAVLGGTV	ELVKAGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHEL					
gi 15599888 ref NP_253382.1 1/1	gi 15599888 ref NP_253382.1 1/1	GGRTGIETTFKDETE	DLFGEQAVLGGTV	ELVKAGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHEL					
gi 114319705 ref YP_741388.1 1/1	gi 114319705 ref YP_741388.1 1/1	GGRAGVIEITFREETE	DTLFG	EQAVLGGTISLIQAGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHET					
gi 83648555 ref YP_436990.1 1/1	gi 83648555 ref YP_436990.1 1/1	GGRTGIETTFKDETE	DTLFG	EQAVLGGAVELVKAGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHEL					
gi 67159493 ref ZP_00420011.1 1/1	gi 67159493 ref ZP_00420011.1 1/1	GGRTGIETTFKDETE	DTLFG	EQAVLGGCVELVKAGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHEL					
gi 71065099 ref YP_263826.1 1/1	gi 71065099 ref YP_263826.1 1/1	GGRSGIETTFKDETE	DTLFG	EQAVLGGAVELVKMGFETTLTEAGYAPENAYFEC	LHEL					
gi 17546794 ref NP_520196.1 1/1	gi 17546794 ref NP_520196.1 1/1	GGRAGVIEITFREETE	DTLFG	EQAVLGGTVELIKAGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHEL					
gi 74318007 ref YP_315747.1 1/1	gi 74318007 ref YP_315747.1 1/1	GGRTGIETTFKDETE	DTLFG	EQAVLGGAVELVKAGFDTLVEAGYAPENAYFEC	LHEL					
gi 66044103 ref YP_233944.1 1/1	gi 66044103 ref YP_233944.1 1/1	GGRTGIETTFKDETE	DTLFG	EQAVLGGTVELVKAGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHEL					
gi 120553816 ref YP_958167.1 1/1	gi 120553816 ref YP_958167.1 1/1	GGRTGIETTFKDETE	DTLFG	EQAVLGGAVELVKAGFETTLTEAGYAPENAYFEC	LHEL					
gi 146306044 ref YP_001186509	gi 146306044 ref YP_001186509	GGRTGIETTFKDETE	DTLFG	EQAVLGGTVELVKAGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHEL					
gi 56552037 ref YP_162876.1 1/1	gi 56552037 ref YP_162876.1 1/1	GGRSVIEITFREEVET	DTLFG	EQAVLGGSLTALITAGFETTLTEAGYAPENAYFEC	MHEM					
gi 57240359 ref ZP_00368308.1 1/1	gi 57240359 ref ZP_00368308.1 1/1	GGRTGIETTFKDETE	DTLFG	EQAVLGGSLALIQAGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHEM					
gi 6225553 sp O32414 ILVC RHOM	gi 6225553 sp O32414 ILVC RHOM	GGRSVIEITFREECET	DTLFG	EQAVLGGSLKLIQYGFETTLVEAGYAPENAYFEC	LHEV					
gi 15897495 ref NP_342100.1 1/1	gi 15897495 ref NP_342100.1 1/1	GATRAGVIEITFKDETE	DTLFG	EQVILGGIMELMRAAFETTLVEEGYQPEVAYFETINEL						
gi 76801743 ref YP_326751.1 1/1	gi 76801743 ref YP_326751.1 1/1	GCTRAGVVEITFREETE	DTLFG	EQAVLGGVTSLVKTYETLVDAGYSPENAYFEC	LNEL					
gi 18313972 ref NP_560639.1 1/1	gi 18313972 ref NP_560639.1 1/1	GATRAGVIEITFAETE	DTLIG	EQVILGGIMELIKKGFVILVMGYQPEVAYFEVLNEA						
gi 19552493 ref NP_600495.1 1/1	gi 19552493 ref NP_600495.1 1/1	GSARAGVIEITFAETV	DTLFG	EQAVLGGTEELVKVGFVILTEAGYEPENAYFEVLHEL						
gi 16079881 ref NP_390707.1 1/1	gi 16079881 ref NP_390707.1 1/1	GSARAGVLEITFKETE	DTLFG	EQAVLGGSLALVKAGFETTLTEAGYQPEIAYFEC	LHEL					
gi 42780593 ref NP_977840.1 1/1	gi 42780593 ref NP_977840.1 1/1	GATRAGVLEITFKETE	DTLFG	EQAVLGGVTLVKAGFETTLVDAGYQPEIAYFEC	LHEL					
gi 42781005 ref NP_978252.1 1/1	gi 42781005 ref NP_978252.1 1/1	GCTRAGVIEITFQETE	DTLFG	EQVILGGVTLVKAGFETTLTEGYRPEIAYFEC	LHEL					
gi 266346 sp Q01292 ILV5 SPIOL	gi 266346 sp Q01292 ILV5 SPIOL	GSPP--TFATILEQVKSDFG	ERGIILGAVH	GIVECLFRRYTESCMSEDIAYKNTVECI						

FIG. 9F

155

gi 70732562 ref YP_262325.1 /1	ISEGATGYP--SMTAKRRNNAAHGIE-IIGEQIRSMMPWIGANKIVDKAKN----	430	440	450	460	470	480
gi 28868203 ref NP_790822.1 /1	ITEGATGYP--SMTAKRRNNAEHGIE-VIGEKIRSMMPWIAANKIVDKKN----						
gi 26991362 ref NP_746787.1 /1	ISEGATNYP--SMTAKRRNNAAHGIE-IIGEQIRSMMPWISANKIVDKTKN----						
gi 15599888 ref NP_253382.1 /1	ITEGAANYP--SMTAYRRNNAAHPIE-QIGEKIRAMPWPWIAANKIVDKSKN----						
gi 114319705 ref YP_741388.1 /1	VLENQAGCP--TLTARRRIAEEHIE-VVGERIRGMPWIAANKIVDKKN----						
gi 83648555 ref YP_436990.1 /1	IAEGAHNYP--SMTAYRRNNAAHPIE-QVGEKIRSMMPWIASNKIVDKSKN----						
gi 67159493 ref ZP_00420011.1 /1	ITEGAANYP--SMTAYRRNNAAHQIE-VVGEKIRTMPWIAANKIVDKTKN----						
gi 71065099 ref YP_263826.1 /1	ISEGATNYP--SMTARRRNNAAHQIE-ITGAKIRGMPWIGGNKIIDKDKN----						
gi 17546794 ref NP_520196.1 /1	LLENKAGAP--TLISRRRLTADHQIE-QVGAKIRAMPWIAKNKIVDQSKN----						
gi 74318007 ref YP_315747.1 /1	ILEGOANYP--EMTAWRRNNAAHQIE-VVGAKIRSMMPWIAANKIVDHSKN----						
gi 66044103 ref YP_233944.1 /1	ISEGATGYP--SMTAKRRNNAAHGIE-IIGEKIRSMMPWIAANKIVDKDN----						
gi 120553816 ref YP_958167.1 /1	ISEGALNYP--SMTARRRNNAAHEIE-TVGEKIRSMMPWISANKIVDKDN----						
gi 146306044 ref YP_001186509.1 /1	ISEGATNYP--SMTAKRRNNAAHGIE-IIGEQIRSMMPWISANKIVDKTKN----						
gi 56552037 ref YP_162876.1 /1	VLDNRAGQP--ELKAARKRMAAHPIE-QVGARIRKMPWIASNKIVDKARN----						
gi 57240359 ref ZP_00368308.1 /1	ILERRANFA--RMHAERKLMNDSLIE-KTGREIRAMPWISAKKIVDKDN----						
gi 6225553 sp O32414 ILVC_RHQM	MLECKAGQP--SFKATRRIQXEHVIE-VVGEKIRGMPWISKNKIVDKARN----						
gi 15897495 ref NP_342100.1 /1	VEEYGRGMP--TVVNGLSNVQNSLEE-KIGNQLRDLVQK-----GKPKS----						
gi 76801743 ref YP_326751.1 /1	ISENQAGRP--SYKQLRAAEKNHDIE-AVGEDILRALFAW-----GDD-----						
gi 18313972 ref NP_560639.1 /1	VEEYNRGAP--TLRKLMEEARHTPIE-KVGEEMRKLLF-----GP-----						
gi 19552493 ref NP_600495.1 /1	IANVENGNT--ELEGRLASYNHPIE-ETGAKIRDLMSWVKVDARAETA-----						
gi 16079881 ref NP_390707.1 /1	IVENQVNRP--RFNAINASENEHQIE-VVGRKLREMPFVKQKKKEAVVSVQON----						
gi 42780593 ref NP_977840.1 /1	IAEHKAGRP--NPHATNEKENEHEIE-VVGRKLREMPFV-QPRVKVGMK-----						
gi 42781005 ref NP_978252.1 /1	ILENQAGRP--TYNAMKKAQNHQIE-KVGAELREMSWIDAPKELVKK-----						
gi 266346 sp Q01292 ILV5_SPIOL	VLAGRRFYEKEGIPAPFMGKIDQTRMWKVGKVRSP--AGD--LGPLYPFTAGVYVAL						

FIG. 9H

	490	500	510	520	530	540
gi 70732562 ref YP_262325.1 /1						
gi 28868203 ref NP_790822.1 /1						
gi 26991362 ref NP_746787.1 /1						
gi 15599888 ref NP_253382.1 /1						
gi 114319705 ref YP_741388.1 /						
gi 83648555 ref YP_436990.1 /1						
gi 67159493 ref XP_00420011.1						
gi 71065099 ref YP_263826.1 /1						
gi 17546794 ref NP_520196.1 /1						
gi 74318007 ref YP_315747.1 /1						
gi 66044103 ref YP_233944.1 /1						
gi 120553816 ref YP_958167.1 /						
gi 146306044 ref YP_001186509.						
gi 56552037 ref YP_162876.1 /1						
gi 57240359 ref XP_00368308.1						
gi 6225553 sp O32414 ILVC_RHOM						
gi 15897495 ref NP_342100.1 /1						
gi 76801743 ref YP_326751.1 /1						
gi 18313972 ref NP_560639.1 /1						
gi 19552493 ref NP_600495.1 /1						
gi 16079881 ref NP_390707.1 /1						
gi 42780593 ref NP_977840.1 /1						
gi 42781005 ref NP_978252.1 /1						
gi 266346 sp Q01292 ILV5_SPIOL						
						MMAQIEILRKKGHSYSEIINESVIEAVDSLNPENHARGVSEMVNDNCSTTARLGSRRKWAPR

FIG. 9I

gi 70732562 ref YP_262325.1 /1	550	560	570	580	590	600
gi 28868203 ref NP_790822.1 /1						
gi 26991362 ref NP_746787.1 /1	-----					
gi 15599888 ref NP_253382.1 /1	-----					
gi 114319705 ref YP_741388.1 /	-----					
gi 83648555 ref YP_436990.1 /1	-----					
gi 67159493 ref ZP_00420011.1	-----					
gi 71065099 ref YP_263826.1 /1	-----					
gi 17546794 ref NP_520196.1 /1	-----					
gi 74318007 ref YP_315747.1 /1	-----					
gi 66044103 ref YP_233944.1 /1	-----					
gi 120553816 ref YP_958167.1 /	-----					
gi 146306044 ref YP_001186509.	-----					
gi 56552037 ref YP_162876.1 /1	-----					
gi 57240359 ref ZP_00368308.1	-----					
gi 6225553 sp O32414 ILVC_RHOM	-----					
gi 15897495 ref NP_342100.1 /1	-----					
gi 76801743 ref YP_326751.1 /1	-----					
gi 18313972 ref NP_560639.1 /1	-----					
gi 19552493 ref NP_600495.1 /1	-----					
gi 16079881 ref NP_390707.1 /1	-----					
gi 42780593 ref NP_977840.1 /1	-----					
gi 42781005 ref NP_978252.1 /1	-----					
gi 266346 sp Q01292 ILV5_SF10L	FDYILSQQALVAVDNGAPINQDLISNFLSDPVHEAIGVCAQLRPSVDISVTADADFVRPE					

FIG. 9J

```

gi|70732562|ref|YP_262325.1|/1
gi|28868203|ref|NP_790822.1|/1
gi|26991362|ref|NP_746787.1|/1
gi|15599888|ref|NP_253382.1|/1
gi|114319705|ref|YP_741388.1|/
gi|83648555|ref|YP_436990.1|/1
gi|67159493|ref|ZP_00420011.1|
gi|71065099|ref|YP_263826.1|/1
gi|17546794|ref|NP_520196.1|/1
gi|74318007|ref|YP_315747.1|/1
gi|66044103|ref|YP_233944.1|/1
gi|120553816|ref|YP_958167.1|/
gi|146306044|ref|YP_001186509.
gi|56552037|ref|YP_162876.1|/1
gi|57240359|ref|ZP_00368308.1|
gi|6225553|sp|O32414|ILVC_RHOM
gi|15897495|ref|NP_342100.1|/1
gi|76801743|ref|YP_326751.1|/1
gi|18313972|ref|NP_560639.1|/1
gi|19552493|ref|NP_600495.1|/1
gi|16079881|ref|NP_390707.1|/1
gi|42780593|ref|NP_977840.1|/1
gi|42781005|ref|NP_978252.1|/1
gi|266346|sp|Q01292|ILV5_SPIOL
LRQA

```

FIG. 9K

gi|70732562|ref|YP_262325.1|: dominio 1 de 1, desde 1 a 338: puntuación 926,8, E = 1e-270

```

*->qmfafskvYVDkdadlsGhdeylkGKKVAVIGYGSQGHAAQNLrD
M    kV+YDkd+dlS    +I+GKkVA+IGYGSQGHAA+R+NL+D
gi|7073256    1    -M----KVFDKDCDLS-----IIQGRKVAIIIGYGSQGHAAQNLKD    37

SGVdV+vGILKkdsSwakAeaaGfKvktvaEAvagADvvmlIIPDefQae
SGVdV+vGILKkdsS+akAeaa+G+kv +va A+va+AD+VmlI+PDefQ++
gi|7073256    38    SGVDVTVGILKkdsS+VAKAEAHGDKVTDVAAAVAGADLVMIIPDEFQSQ    87

vYeeelEpnLkPgatlaFAHGfNIHsqIvPrafpKdIDVIMVAPKGPQH
+Y++eIepn+k+GatlaF+HGF+IH++G+vPra    D+DVIM+APK+PGH
gi|7073256    88    LYONEIEPNIKKGATLAFSHGFAlHYNQVVPRA---DLDVIMLAPKAPGH    134

tVRreYvkGgVVPaLiAVyQdasGnAkdlALsYAMGIGggRAGvIETTFk
tVR+e+vkGgG+P+LiA+yQdasGnAk++ALsYA+G+GgGR+G+IETTFk
gi|7073256    135    TVRSEFVKGGIPDLLIAIYQDASGNAKNVALSYAMGVGGGRTGIIETTFK    184

eETETDLFGEQaVLCGGvtelVkaGFETLVZaGYaPEmAYFECLHELKLI
+ETETDLFGEQaVLCGG++eLVkaGFETLVZaGYaPEmAYFECLHELKLI
gi|7073256    185    DETETDLFGEQaVLCGGTVELVYAGFETLVZaGYaPEmAYFECLHELKLI    234

```

FIG. 10A


```

VDLmYEGGIANMrySiSdTAeYGDyvtGprVideeskeatkevIkdiQSG
VDLmYEGGIANM+ySiS++AeYG+yvtGp+VI++es++aM+++Ik+IQ+G
235 VDLmYEGGIANMYSISNNAEYGEYVTGPEVINAESRQAMRNALKRIQDG 284

eFAkewilEnqaGyPkettalrrneaeHqIEWkVGekLRsmpwIaank
e+Ak++i+E+++GyP ++ta xrn+a+H IE +Ge+LRsmpwI ank
285 EYAKGFISEGATGYP--SMTAKRRNNAHGHIE-IIGQLRSMTPWIGANK 331

lvdkdlen<--*
+vdk+len
332 IVDKAKN 338

g1|7073256
g1|7073256
g1|7073256

```

FIG. 10B