

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 203**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2013 E 13743087 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2710117**

54 Título: **Microorganismos recombinantes y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

31.01.2012 US 201261593269 P

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

19.09.2016

73 Titular/es:

**LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED (100.0%)
24 Balfour Road
Parnell, Auckland 1052, NZ**

72 Inventor/es:

**KOEPKE, MICHAEL;
NAGARAJU, SHILPA y
CHEN, WENDY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 583 203 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microorganismos recombinantes y métodos de uso de los mismos

Campo

5 La presente invención se refiere a métodos para la producción de compuestos químicos, en particular, pero no exclusivamente etanol, por fermentación microbiana y microorganismos genéticamente modificados útiles en dichos métodos.

Antecedentes

10 Se sabe que los microorganismos acetógenos son útiles para la producción de combustibles (por ejemplo, etanol o butanol) y otros productos químicos por fermentación de sustratos que incluyen monóxido de carbono, dióxido de carbono, hidrógeno y metanol, por ejemplo. Muchos de estos microorganismos producen de forma natural al menos dos, si no más productos. Sin embargo, cuando los microorganismos se van a usar para producir productos, en particular a una escala comercial, no es siempre deseable que los microorganismos produzcan múltiples productos. Por ejemplo, la producción de múltiples productos puede darse a expensas de la eficacia de la producción y el rendimiento de un producto de valor particular, puesto que los subproductos pueden desviar el carbono de las rutas implicadas en la producción del producto principal deseado. Además, los subproductos pueden ser tóxicos para el microorganismo, la producción de múltiples productos puede hacer difícil la recuperación y separación de los productos, y puede ser difícil controlar las condiciones de fermentación para favorecer la producción de un producto frente a otro. Los subproductos también pueden ser una fuente potencial de contaminación en un fermentador ya que pueden ser sustratos para organismos indeseables.

20 En el caso de la producción de etanol por fermentación microbiana de sustratos que comprenden monóxido de carbono, típicamente se produce 2,3-butanodiol como un subproducto. Esto puede reducir la eficacia y rendimiento de la producción de etanol, así como producir otros problemas, como se ha indicado antes.

25 Kopke et al (2010, *PNAS*, 107:13087-13092) describe que *Clostridium ljungdahlii* puede representar una plataforma de producción microbiana basada en gas de síntesis. Köpke et al (2011, *Current Opin. Biotech.*, 22:320-325) describen la producción de etanol por fermentación a partir de monóxido de carbono.

Un objeto de la invención es superar una o más de las desventajas de la técnica anterior, o al menos proporcionar al público una opción útil.

Compendio de la invención

30 La invención se refiere, entre otros, a nuevos microorganismos genéticamente modificados capaces de usar monóxido de carbono para producir uno o más productos y que producen una cantidad reducida de 2,3-butanodiol comparado con un microorganismo original.

En una realización, el microorganismo genéticamente modificado no produce sustancialmente 2,3-butanodiol comparado con un microorganismo original. En una realización particular, el microorganismo produce etanol como producto principal.

35 En un primer aspecto, la invención proporciona un microorganismo acetógeno carboxidotrófico que está adaptado para producir uno o más productos y una cantidad reducida o no producir sustancialmente 2,3-butanodiol por fermentación de un sustrato que comprende monóxido de carbono, comprendiendo el microorganismo una o más modificaciones genéticas que alteran la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol comparado con un microorganismo original.

40 En una realización particular, la invención proporciona un microorganismo acetógeno carboxidotrófico que está adaptado para producir etanol como producto principal y una cantidad reducida o no producir sustancialmente 2,3-butanodiol por fermentación de un sustrato que comprende monóxido de carbono, comprendiendo el microorganismo una o más modificaciones genéticas que alteran la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol comparado con un microorganismo original.

45 En una realización, el microorganismo está adaptado para producir además uno o más de formiato, lactato, piruvato, succinato, valina, leucina, isoleucina, acetolactato, malato, fumarato, 2-oxoglutarato, citrato.

En una realización, el microorganismo está adaptado para producir una mayor cantidad de uno o más de etanol, formiato, lactato, piruvato, succinato, valina, leucina, isoleucina, acetolactato, malato, fumarato, 2-oxoglutarato, citrato comparado con un microorganismo original.

50 En una realización, el microorganismo comprende al menos una modificación genética que altera la expresión y/o actividad de una o más enzimas capaces de convertir el piruvato en acetolactato.

En una realización, la una o más enzimas capaces de convertir el piruvato en acetolactato es una acetolactato

sintasa (alsS).

En una realización, el microorganismo comprende al menos una modificación genética que altera la expresión y/o actividad de una o más capaces de convertir el acetolactato en acetoína.

5 En una realización, la una o más enzimas capaces de convertir el acetolactato en acetoína es una acetolactato descarboxilasa (budA).

En una realización, el microorganismo comprende al menos una modificación genética que altera la expresión y/o actividad de una o más enzimas capaces de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol.

10 En una realización, la una o más enzimas capaces de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol es una enzima seleccionada de 2,3-butanodiol deshidrogenasa (2,3bdh), una acetoína reductasa, una alcohol primario:secundario deshidrogenasa.

En una realización, el microorganismo comprende al menos una modificación genética que altera la expresión y/o actividad de una combinación de dos o más enzimas capaces de convertir el piruvato en acetolactato, el acetolactato en acetoína, y/o la acetoína en 2,3-butanodiol.

En una realización, la modificación genética altera la expresión y/o actividad de una o más de:

15 Acetolactato sintasa (alsS);

Acetolactato descarboxilasa (BudA);

2,3-Butanodiol deshidrogenasa (2,3 bdh);

Acetoína reductasa; y,

Alcohol primario:secundario deshidrogenasa.

20 En una realización, la modificación genética altera la expresión y/o actividad de una o más de:

Acetolactato sintasa (alsS);

Acetolactato descarboxilasa (BudA); y,

2,3-Butanodiol deshidrogenasa (2,3 bdh).

25 En una realización, la una o más modificaciones genéticas alteran uno o más de los genes que codifican una o más de las enzimas anteriores. En una realización, la una o más modificaciones genéticas alteran la actividad de un compuesto necesario para la expresión o actividad de una o más de las enzimas anteriores. En una realización, la una o más modificaciones genéticas aumentan la expresión o actividad de uno o más compuestos que inhiben la expresión o actividad de una o más de las enzimas anteriores.

30 En una realización particular, el microorganismo se selecciona del grupo que comprende Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii, y Clostridium ragsdalei y aislados relacionados. En otra realización, el grupo también comprende Clostridium coskatii.

En una realización particular, el microorganismo es Clostridium autoethanogenum DSM23693.

35 En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para la producción de un microorganismo acetógeno carboxidotrófico que está adaptado para producir uno o más productos y una cantidad reducida o no producir sustancialmente 2,3-butanodiol por fermentación de un sustrato que comprende monóxido de carbono, comprendiendo el método modificar genéticamente un microorganismo acetógeno carboxidotrófico original para alterar la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol.

En una realización, el método da como resultado mayor producción de uno o más productos comparado con un microorganismo original.

40 En una realización particular, la invención proporciona un método para la producción de un microorganismo acetógeno carboxidotrófico que está adaptado para producir etanol como el producto principal y una cantidad reducida o no producir sustancialmente 2,3-butanodiol por fermentación de un sustrato que comprende monóxido de carbono, comprendiendo el método modificar genéticamente un microorganismo acetógeno carboxidotrófico original para alterar la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol.

45 La invención también proporciona microorganismos hechos por un método del segundo aspecto.

En una realización, el método comprende introducir en el microorganismo original una o más modificaciones genéticas que alteran uno o más genes que codifican una o más enzimas capaces de convertir el piruvato en

acetolactato. En una realización, la una o más enzimas capaces de convertir el piruvato en acetolactato es una acetolactato sintasa (alsS).

5 En una realización, el método comprende introducir en el microorganismo original una o más modificaciones genéticas que alteran uno o más genes que codifican una o más enzimas capaces de convertir el acetolactato en acetoína. En una realización, la una o más enzimas capaces de convertir el acetolactato en acetoína es una acetolactato descarboxilasa (budA).

10 En una realización, el método comprende introducir en el microorganismo original una o más modificaciones genéticas que alteran uno o más genes que codifican una o más enzimas capaces de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol. En una realización, la una o más enzimas capaces de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol se selecciona de una 2,3-butanodiol deshidrogenasa (2,3bdh), una acetoína reductasa, una alcohol primario:secundario deshidrogenasa.

En una realización, el método comprende introducir en el microorganismo original una o más modificaciones genéticas que alteran una combinación de dos o más genes que codifican una enzima capaz de convertir el piruvato en acetolactato, el acetolactato en acetoína, y/o la acetoína en 2,3-butanodiol.

15 En una realización, el método comprende introducir en el microorganismo original una o más modificaciones genéticas que alteran uno o más de los genes que codifican una o más de la acetolactato sintasa (alsS), acetolactato descarboxilasa (BudA) y 2,3-butanodiol deshidrogenasa (2,3 bdh).

En una realización, el método comprende introducir una modificación genética que altera la actividad de un compuesto necesario para la expresión o actividad de una o más de las enzimas anteriores.

20 En una realización, el método comprende introducir una modificación genética que aumenta la expresión o actividad de uno o más compuestos que inhiben la expresión o actividad de una o más de las enzimas anteriores.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para la producción de uno o más productos. En una realización, el método es para la producción de uno o más de etanol, formiato, lactato, piruvato, succinato, valina, leucina, isoleucina, acetolactato, malato, fumarato, 2-oxoglutarato, citrato.

25 En una realización particular, la invención proporciona un método para la producción de uno o más productos (en una realización, que incluyen etanol y uno o más de otros productos) por fermentación microbiana que comprende fermentar un sustrato que comprende CO usando uno o más microorganismos del primer aspecto de la invención y/o hechos por el método del segundo aspecto de la invención. En una realización, el uno o más productos se seleccionan del grupo que consiste en succinato, lactato, formiato, valina, leucina, piruvato, isoleucina, acetolactato, malato, fumarato, 2-oxoglutarato, citrato.

30 En una realización el método comprende las etapas de:

(a) proporcionar un sustrato que comprende CO a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos del primer aspecto de la invención y/o hechos por el segundo aspecto de la invención; y

35 (b) fermentar el cultivo de forma anaerobia en el biorreactor para producir uno o más de los productos mencionados antes, preferiblemente incluyendo etanol.

En otra realización el método comprende las etapas de:

capturar el gas que contiene CO producido como resultado del procedimiento industrial, antes de liberar el gas a la atmósfera;

40 la fermentación anaerobia del gas que contiene CO para producir uno o más de los productos mencionados antes, preferiblemente incluyendo etanol, mediante un cultivo de uno o más microorganismos del primer aspecto de la invención y/o hechos por el segundo aspecto de la invención.

En realizaciones particulares de los aspectos del método, el microorganismo se mantiene en un medio de cultivo acuoso.

En realizaciones particulares de los aspectos del método, la fermentación del sustrato tiene lugar en un biorreactor.

45 Preferiblemente, el sustrato que comprende CO es un sustrato gaseoso que comprende CO. En una realización, el sustrato comprende un gas residual industrial. En algunas realizaciones, el gas es gas residual de aceria o gas de síntesis.

50 En una realización, el sustrato típicamente contendrá una proporción principal de CO, tal como al menos de aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de CO en volumen, de 20% a 70% de CO en volumen, de 30% a 60% de CO en volumen, y de 40% a 55% de CO en volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o

aproximadamente 45%, o aproximadamente 50% de CO, o aproximadamente 55% de CO, o aproximadamente 60% de CO en volumen.

5 Aunque no es necesario que el sustrato contenga hidrógeno, la presencia de H₂ no debería ser perjudicial para la formación de producto de acuerdo con métodos de la descripción. En descripciones particulares, la presencia de hidrógeno da como resultado una eficacia total mejorada de producción de alcohol. Por ejemplo, en descripciones particulares, el sustrato puede comprender una relación de aproximadamente 2:1, o 1:1, o 1:2 de H₂:CO. En una descripción, el sustrato comprende aproximadamente 30% o menos H₂ en volumen, 20% o menos H₂ en volumen, aproximadamente 15% o menos H₂ en volumen o aproximadamente 10% o menos H₂ en volumen. En otras descripciones, la corriente de sustrato comprende concentraciones bajas de H₂, por ejemplo menos de 5%, o menos de 4%, o menos de 3%, o menos de 2%, o menos de 1%, o está sustancialmente exenta de hidrógeno. El sustrato también puede contener algo de CO₂ por ejemplo, tal como de aproximadamente 1% a aproximadamente 80% CO₂ en volumen, o de 1% a aproximadamente 30% de CO₂ en volumen.

15 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la etapa de recuperar el uno o más productos del caldo de fermentación. En una realización, se recupera etanol del caldo de fermentación. En una realización, se recuperan uno o más productos del caldo de fermentación, que incluyen formiato, lactato, piruvato, succinato, valina, leucina, isoleucina, acetolactato, malato, fumarato, citrato y 2-oxoglutarato.

20 En un cuarto aspecto, la invención proporciona uno o más productos cuando se producen por un método del tercer aspecto. En una realización, el uno o más productos se seleccionan del grupo que consiste en etanol, formiato, lactato, piruvato, succinato, valina, leucina, isoleucina, acetolactato, malato, fumarato, citrato y 2-oxoglutarato. En una realización particular, el uno o más productos comprenden al menos etanol.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un microorganismo acetógeno carboxidotrófico en el que se han alterado uno o más genes no esenciales comparado con un microorganismo original.

25 En un sexto aspecto, la invención proporciona un método de producción de un microorganismo acetógeno carboxidotrófico en el que se han alterado uno o más genes no esenciales, comprendiendo el método modificar genéticamente uno o más genes no esenciales en un microorganismo original.

La invención también proporciona microorganismos hechos por los métodos del sexto aspecto.

En una realización, el uno o más genes no esenciales, es un gen que codifica una enzima que convierte el acetolactato en acetoína y/o codifica una enzima que convierte la acetoína en 2,3-butanodiol. En una realización, las enzimas son como se describen en la presente memoria.

30 En algunas realizaciones, el microorganismo se selecciona del grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium coskatii*, *Butyrubacterium limosum*, *Butyrubacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Oxobacter pfennigii*, y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

35 En una realización particular, el microorganismo se selecciona del grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium ragsdalei*. En otra realización, el grupo también comprende *Clostridium coskatii*.

En una realización particular, el microorganismo es *Clostridium autoethanogenum* DSM23693.

40 En un séptimo aspecto, la invención proporciona un método para la producción de uno o más productos por fermentación microbiana usando uno o más microorganismos del quinto aspecto y/o hechos por un método del sexto aspecto.

En una realización particular, la invención proporciona un método para la producción de etanol y uno o más de otros productos por fermentación microbiana que comprende fermentar un sustrato que comprende CO usando uno o más microorganismos del quinto aspecto y/o hechos por un método del sexto aspecto.

En una realización el método comprende las etapas de:

45 (a) proporcionar un sustrato que comprende CO a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos del quinto aspecto y/o hechos por un método del sexto aspecto; y

(b) fermentar el cultivo de forma anaerobia en el biorreactor para producir uno o más productos.

En otra realización el método comprende las etapas de:

50 (a) capturar el gas que contiene CO producido como resultado del procedimiento industrial, antes de liberar el gas a la atmósfera;

b) la fermentación anaerobia del gas que contiene CO para producir uno o más productos mediante un cultivo que

contiene uno o más microorganismos del quinto aspecto y/o hechos por un método del sexto aspecto.

En una realización, el uno o más productos son como se describe en la presente memoria.

En una realización, el sustrato que comprende CO es como se describe en la presente memoria.

- 5 También se puede decir que, de forma amplia, la descripción consiste en las partes, elementos y propiedades referidas a o indicadas en la memoria descriptiva de la solicitud, de forma individual o colectiva, en cualquiera o todas las combinaciones de dos o más de dichas partes, elementos o propiedades, y donde se mencionen números enteros específicos en la presente memoria que tienen equivalentes conocidos en la técnica a la que se refiere la invención.

Breve descripción de las figuras

- 10 Estos y otros aspectos de la presente invención, que deberían considerarse en todos sus nuevos aspectos, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, que se da solo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 muestra la ruta metabólica a partir de CO en acetógenos carboxidotróficos que producen 2,3-butanodiol (por ejemplo, *C. autoethanogenum*, DSM23693).

- 15 La figura 1b ilustra los efectos de la inactivación génica de la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol en acetógenos carboxidotróficos que producen 2,3-butanodiol, con redistribución del flujo de carbono hacia etanol, y muestra la producción de nuevos productos, por ejemplo, succinato, 2-oxoglutarato, formiato, valina, leucina a partir de CO.

- 20 La figura 2 muestra el gen *budA* y sus regiones flanqueadoras 5' y 3' en el genoma de *C. autoethanogenum* DSM23693. También están indicados los cebadores usados para la amplificación por PCR y posterior clonación de los fragmentos flanqueadores en el plásmido pMTL85141.

La figura 3 muestra un plásmido pMTL85141-*budA*-ko de ejemplo, que alberga los fragmentos de ADN que flanquean el gen *budA* 5' y 3' separados por un gen *lacZ* para la inactivación génica de *budA* en *C. autoethanogenum* DSM23693.

La figura 4 muestra un plásmido de metilación de ejemplo útil en la descripción.

- 25 La figura 5 muestra (A): presentación gráfica de la región genómica de *C. autoethanogenum* DSM23693 después de inactivación génica de *budA* y también indica la posición de cebadores usados para el cribado de las inactivaciones génicas de *BudA* en *C. autoethanogenum* DSM23693 y el tamaño esperado de los productos de PCR a partir de *C. autoethanogenum* DSM23693 de tipo natural y su correspondiente inactivación génica de *budA*. (B) Una imagen de electroforesis en gel de agarosa del cribado de PCR de inactivaciones génicas de *budA* en *C. autoethanogenum* DSM23693. Las bandas 1 y 9 muestran la escalera de ADN GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. Las bandas 2-6 muestran la amplificación por PCR de la región diana de *budA* a partir del ADN genómico aislado de *C. autoethanogenum*, DSM23693 (+, 2,7 kb) de tipo natural y seis potenciales inactivaciones génicas de *budA* en *C. autoethanogenum* DSM23693 (1-6, 2,2 kb) con cebadores Og09 y Og12r. Las bandas 10-16 muestran la PCR con ADN genómico aislado de *C. autoethanogenum* DSM23693 (+) de tipo natural y seis potenciales inactivaciones génicas de *budA* en *C. autoethanogenum* DSM23693 con cebadores Og44f y Og45r específicos para la región interna de 273 pb del gen *budA* (*).
- 30
- 35

Figura 6: confirmación por PCR de inserción de RAM en genes *budA* y *2,3bdh* en *C. autoethanogenum* DSM23693 usando cebadores Og44f / Og45r y Og42f / Og43r.

- 40 La figura 7 muestra la tasa de conversión de acetoina en butanodiol por *C. autoethanogenum* DSM23693 y el mutante $\Delta 2,3bdh$ ClosTron en la fermentación.

Breve descripción de la lista de secuencias

Esta memoria descriptiva va acompañada de una lista de secuencias en la que se citan las siguientes secuencias.

SEQ ID 1: Secuencia de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos del gen *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693.

- 45 SEQ ID 2: Secuencia de aminoácidos de la proteína *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693. SEQ ID 3: Secuencia de nucleótidos de la región flanqueadora 5' del gen *BudA* de *C. autoethanogenum* DSM23693. SEQ ID 4: Secuencia de nucleótidos de la secuencia flanqueadora 3' del gen *budA*.

SEQ ID 5 a 8 y 10 y 11: Se describen en la tabla 1 en lo sucesivo.

SEQ ID 9: Secuencia de nucleótidos del vector transportador de *E. coli*-*Clostridium* - plásmido pMTL85141

- 50 SEQ ID 12: Resultados de la secuenciación de nucleótidos de pMTL85141-*budA*-ko que demuestra que los

ES 2 583 203 T3

fragmentos de ADN flanqueadores encontrados en el plásmido no tenían mutaciones.

SEQ ID 13: gen de ARNr 16s de *C. autoethanogenum* (Y18178, GI:7271109)

SEQ ID 14: gen de ARNr 16s de la colonia 1 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693: (93%) de identidad

5 SEQ ID 15: gen de ARNr 16s de la colonia 2 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693: (94%)

SEQ ID 16: gen de ARNr 16s de la colonia 3 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693: (95%)

10 SEQ ID 17: gen de ARNr 16s de la colonia 4 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693: (93%)

SEQ ID 18: gen de ARNr 16s de la colonia 5 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693: (94%)

SEQ ID 19: gen de ARNr 16s de la colonia 6 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693: (92%)

15 SEQ ID 20: Resultado de la secuenciación de nucleótidos del producto de PCR de la colonia 1 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693 con cebador Og09f. (92%)

SEQ ID 21: Resultado de la secuenciación de nucleótidos del producto de PCR de la colonia 1 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693 con cebador Og12r. (92%)

20 SEQ ID 22: Resultado de la secuenciación de nucleótidos del producto de PCR de la colonia 3 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693 con cebador Og12r. (92%)

SEQ ID 23: Resultado de la secuenciación de nucleótidos del producto de PCR de la colonia 4 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693 con cebador Og12r. (92%)

SEQ ID 24: Resultado de la secuenciación de nucleótidos del producto de PCR de la colonia 5 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693 con cebador Og12r.

25 SEQ ID 25: Resultado de la secuenciación de nucleótidos del producto de PCR de la colonia 6 del potencial transformante de inactivación génica de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693 con cebador Og09f.

SEQ ID 26: Resultado de la secuenciación de nucleótidos de la región diana de *budA* de *C. autoethanogenum* DSM23693 a partir del clon 6 con cebador Og12r.

SEQ ID 27 y 28: Se describen en la tabla 4 en lo sucesivo.

30 SEQ 29 y 30: Se describen en la tabla 4 en lo sucesivo.

SEQ ID 31: Secuencia de nucleótidos del nuevo gen de la metiltransferasa fusionado con un promotor *lac* inducible.

SEQ ID 32: Secuencia de proteína de una nueva metiltransferasa.

SEQ ID 33: Secuencia de nucleótidos del plásmido pGS20.

35 SEQ ID NO 34: Secuencia de aminoácidos de una nueva alcohol deshidrogenasa de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* y *C. ragsdalei*.

SEQ ID NO 35: Secuencia de ácido nucleico de la nueva alcohol deshidrogenasa de *C. autoethanogenum*.

SEQ ID NO 36: Secuencia de ácido nucleico de la nueva alcohol deshidrogenasa de *C. ljungdahlii*.

SEQ ID NO 37: Secuencia de ácido nucleico de la nueva alcohol deshidrogenasa de *C. ragsdalei*.

SEQ ID 38: Secuencia de nucleótidos de la enzima málica 1 de *C. autoethanogenum*

40 SEQ ID 39: Secuencia de aminoácidos de la enzima málica 1 de *C. autoethanogenum*:

SEQ ID 40: Secuencia de nucleótidos de la enzima málica 2 de *C. autoethanogenum*

SEQ ID 41: Secuencia de aminoácidos de la enzima málica 2 de *C. autoethanogenum*:

SEQ ID 42: Secuencia de nucleótidos de la malato deshidrogenasa de *C. autoethanogenum*

ES 2 583 203 T3

- SEQ ID 43: Secuencia de aminoácidos de la malato deshidrogenasa de *C. autoethanogenum*.
- SEQ ID 44: Secuencia de nucleótidos de la piruvato fosfato diquinasa de *C. autoethanogenum*.
- SEQ ID 45: Secuencia de aminoácidos de la piruvato fosfato diquinasa de *C. autoethanogenum*.
- SEQ ID 46: Secuencia de nucleótidos de la piruvato carboxilasa de *C. autoethanogenum*.
- 5 SEQ ID 47: Secuencia de aminoácidos de la piruvato carboxilasa de *C. autoethanogenum*
- SEQ ID 48: Secuencia de nucleótidos de la PEP carboxiquinasa de *C. autoethanogenum*.
- SEQ ID 49: Secuencia de aminoácidos de la PEP carboxiquinasa de *C. autoethanogenum*
- SEQ ID 50: Secuencia de nucleótidos de la subunidad A de la fumarato hidratasa de *C. autoethanogenum*
- SEQ ID 51: Secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la fumarato hidratasa de *C. autoethanogenum*.
- 10 SEQ ID 52: Secuencia de nucleótidos de la subunidad B de la fumarato hidratasa de *C. autoethanogenum*
- SEQ ID 53: Secuencia de aminoácidos de la subunidad B de la fumarato hidratasa de *C. autoethanogenum*.
- SEQ ID 54: Secuencia de nucleótidos de la fumarato reductasa 1 de *C. autoethanogenum*
- SEQ ID 55: Secuencia de aminoácidos la fumarato reductasa 1 de *C. autoethanogenum*.
- SEQ ID 56: Secuencia de nucleótidos de la fumarato reductasa 2 de *C. autoethanogenum*
- 15 SEQ ID 57: Secuencia de aminoácidos la fumarato reductasa 2 de *C. autoethanogenum*.
- SEQ ID 58: Secuencia de nucleótidos de la fumarato reductasa 3 de *C. autoethanogenum*
- SEQ ID 59: Secuencia de aminoácidos la fumarato reductasa 3 de *C. autoethanogenum*.
- SEQ ID 60: Secuencia de nucleótidos de la enzima málica 1 de *C. ragsdalei*.
- SEQ ID 61: Secuencia de aminoácidos de la enzima málica 1 de *C. ragsdalei*.
- 20 SEQ ID 62: Secuencia de nucleótidos de la malato deshidrogenasa de *C. ragsdalei*
- SEQ ID 63: Secuencia de aminoácidos de la malato deshidrogenasa de *C. ragsdalei*.
- SEQ ID 64: Secuencia de nucleótidos de la piruvato fosfato diquinasa de *C. ragsdalei*.
- SEQ ID 65: Secuencia de aminoácidos de la piruvato fosfato diquinasa de *C. ragsdalei*.
- SEQ ID 66: Secuencia de nucleótidos de la piruvato carboxilasa de *C. ragsdalei*.
- 25 SEQ ID 67: Secuencia de aminoácidos de la piruvato carboxilasa de *C. ragsdalei*
- SEQ ID 68: Secuencia de nucleótidos de la PEP carboxiquinasa de *C. ragsdalei*.
- SEQ ID 69: Secuencia de aminoácidos de la PEP carboxiquinasa de *C. ragsdalei*
- SEQ ID 70: Secuencia de nucleótidos de la subunidad A de la fumarato hidratasa de *C. ragsdalei*
- SEQ ID 71: Secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la fumarato hidratasa de *C. ragsdalei*.
- 30 SEQ ID 72: Secuencia de nucleótidos de la subunidad B de la fumarato hidratasa de *C. ragsdalei*
- SEQ ID 73: Secuencia de aminoácidos de la subunidad B de la fumarato hidratasa de *C. ragsdalei*.
- SEQ ID 74: Secuencia de nucleótidos de la fumarato reductasa 1 de *C. ragsdalei*
- SEQ ID 75: Secuencia de aminoácidos la fumarato reductasa 1 de *C. ragsdalei*.
- SEQ ID 76: Secuencia de nucleótidos de la fumarato reductasa 2 de *C. ragsdalei*
- 35 SEQ ID 77: Secuencia de aminoácidos la fumarato reductasa 2 de *C. ragsdalei*.
- SEQ ID 78: Secuencia en la dirección 5' o brazo de homología del gen budA de *Clostridium ljungdahlii*.
- SEQ ID 79: Secuencia en la dirección 3' o brazo de homología del gen budA de *Clostridium ljungdahlii*

ES 2 583 203 T3

- SEQ ID 80: Secuencia en la dirección 5' o brazo de homología del gen budA de Clostridium ragsdalei.
- SEQ ID 81: Secuencia en la dirección 3' o brazo de homología del gen budA de Clostridium ragsdalei
- SEQ ID 82: Secuencia de nucleótidos de la región a la que se dirige ClosTron en budA de C. autoethanogenum DSM23693
- 5 SEQ ID 83: Secuencia de nucleótidos de la región a la que se dirige ClosTron en 2,3bdh de C. autoethanogenum DSM23693
- SEQ ID 84: Oligonucleótido Og42f usado para el cribado de mutantes de Δ 2,3bdh ClosTron
- SEQ ID 85: Oligonucleótido Og43r usado para el cribado de mutantes de Δ 2,3bdh ClosTron
- 10 SEQ ID 86: Secuencia de nucleótidos del producto amplificado por PCR de ARNr 16s del clon 2 de Δ 2,3bdh ClosTron de C. autoethanogenum DSM23693 obtenido usando el cebador fd1.
- SEQ ID 87: Secuencia de nucleótidos del producto amplificado por PCR de ARNr 16s del clon 2 de Δ 2,3bdh ClosTron de C. autoethanogenum DSM23693 obtenido usando el cebador rP2.
- SEQ ID 88: Secuencia de nucleótidos del producto de PCR de ARNr 16s del clon 4 de Δ 2,3bdh ClosTron de C. autoethanogenum DSM23693 obtenido usando el cebador fd1.
- 15 SEQ ID 89: Secuencia de nucleótidos del producto de PCR de ARNr 16s del clon 4 de Δ 2,3bdh ClosTron de C. autoethanogenum DSM23693 obtenido usando el cebador rP2.
- SEQ ID 90: Secuencia de nucleótidos del producto de PCR de ARNr 16s del clon 1 de Δ budA ClosTron de C. autoethanogenum DSM23693 obtenido usando el cebador fd1.
- 20 SEQ ID 91: Secuencia de nucleótidos del producto de PCR de ARNr 16s del clon 1 de Δ bud4 ClosTron de C. autoethanogenum DSM23693 obtenido usando el cebador rP2.
- SEQ ID 92: Secuencia de nucleótidos del producto de PCR de ARNr 16s del clon 3 de Δ budA ClosTron de C. autoethanogenum DSM23693 obtenido usando el cebador fd1.
- SEQ ID y 93: Secuencia de nucleótidos del producto de PCR de ARNr 16s del clon 3 de Δ budA ClosTron de C. autoethanogenum DSM23693 obtenido usando el cebador rP2.
- 25 SEQ ID 94: Secuencia de nucleótidos del brazo de homología 5' del gen 2,3bdh de C. autoethanogenum DSM23693.
- SEQ ID 95: Secuencia de nucleótidos del brazo de homología 3' del gen 2,3bdh de C. autoethanogenum DSM23693.
- SEQ ID 96 y 97: Los cebadores usados para amplificar el brazo de homología 5' del gen 2,3bdh de C. autoethanogenum DSM23693.
- 30 SEQ ID 98 y 99: Los cebadores usados para amplificar el brazo de homología 3' del gen 2,3bdh de C. autoethanogenum DSM23693.
- SEQ ID 100 y 101: Cebadores flanqueadores que se pueden usar para confirmar la inactivación del gen 2,3bdh de C. autoethanogenum DSM23693.
- SEQ ID 102: Secuencia de ácido nucleico del brazo de homología 5' del gen SecAdh de C. autoethanogenum DSM23693
- 35 SEQ ID 103: Secuencia de ácido nucleico del brazo de homología 3' del gen SecAdh de C. autoethanogenum DSM23693
- SEQ ID 104 y 105: Cebadores usados para amplificar el brazo de homología 5' del gen 2,3bdh de C. autoethanogenum DSM23693.
- 40 SEQ ID 106 y 107: Cebadores usados para amplificar el brazo de homología 3' de C. autoethanogenum DSM23693 2,3bdh.
- SEQ ID 108 y 109: Cebadores que se pueden usar para confirmar la inactivación génica del gen SecAdh de C. autoethanogenum DSM23693.
- SEQ ID 110: Secuencia de nucleótidos del casete director de intrón del grupo II para el gen SecAdh de C. autoethanogenum DSM23693.
- 45 SEQ ID 111 y 112: Cebadores flanqueadores que se pueden usar para confirmar la inactivación insercional del gen

ES 2 583 203 T3

- SecAdh de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 113: Secuencia de nucleótidos del brazo de homología 5' del gen alsS de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 114: Secuencia de nucleótidos del brazo de homología 3' del gen alsS de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- 5 SEQ ID 115 y 116: Secuencia de cebadores usados para amplificar el brazo de homología 5' del gen alsS de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 117 y 118: Secuencia de cebadores usados para amplificar el brazo de homología 3' del gen alsS de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 119 y 120: Secuencias de cebadores flanqueadores que se pueden usar para confirmar el silenciamiento génico del gen alsS de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- 10 SEQ ID 120: Secuencia de nucleótidos del brazo de homología 5' del gen ilvC de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 121: Secuencia de ácido nucleico del brazo de homología 3' del gen de ilvC *C. autoethanogenum* DSM23693
- SEQ ID 123 y 124: Secuencia de cebadores usados para amplificar el brazo de homología 5' del gen ilvC de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- 15 SEQ ID 125 y 126: Secuencia de cebadores usados para amplificar el brazo de homología 3' del gen ilvC de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 127 y 128: Secuencias de cebadores flanqueadores que se pueden usar para confirmar el silenciamiento génico del gen ilvC de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 129: Secuencia de nucleótidos del brazo de homología 5' del gen ilvI de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- 20 SEQ ID 130: Secuencia de nucleótidos del brazo de homología 3' (SEQ ID 130) del gen ilvI de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 131 y 132: Secuencia de cebadores usados para amplificar el brazo de homología 5' del gen ilvI de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- 25 SEQ ID 133 y 134: Secuencia de cebadores usados para amplificar el brazo de homología 3' del gen ilvI de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 135 y 136: Secuencias de cebadores flanqueadores que se pueden usar para confirmar la inactivación del gen ilvI de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 137: Secuencia de nucleótidos del brazo de homología 5' del gen ilvB de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 138: Secuencia de nucleótidos del brazo de homología 3' del gen ilvB de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- 30 SEQ ID 139 y 140: Secuencia de cebadores usados para amplificar el brazo de homología 5' del gen ilvB de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 141 y 142: Secuencia de cebadores usados para amplificar el brazo de homología 3' del gen ilvB de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- 35 SEQ ID 143 y 144: Secuencias de cebadores flanqueadores que se pueden usar para confirmar la inactivación del gen ilvB de *C. autoethanogenum* DSM23693.
- SEQ ID 145: Ejemplo de secuencia de nucleótidos directora del intrón ClosTron de alsS
- SEQ ID 146: Ejemplo de secuencia de nucleótidos directora del intrón ClosTron de ilvC
- SEQ ID 147: Ejemplo de secuencia de nucleótidos directora del intrón ClosTron de ilvI
- SEQ ID 148: Ejemplo de secuencia de nucleótidos directora del intrón ClosTron de ilvB
- 40 SEQ ID 149 y 150: Oligonucleótidos que se pueden usar para cribar mutantes de alsS ClosTron
- SEQ ID 151 y 152: Oligonucleótidos que se pueden usar para cribar mutantes de ilvC ClosTron
- SEQ ID 153 y 154: Oligonucleótidos que se pueden usar para cribar mutantes de ilvI ClosTron
- SEQ ID 155 y 156: Oligonucleótidos que se pueden usar para cribar mutantes de ilvB ClosTron

Se usan abreviaturas IUPAC convencionales para todas las secuencias, véase

http://en.M.wikipedia.org/wiki/Nucleic_acid_notation#section_1. A modo de ejemplo:

	A	Adenosina
	C	Citidina
5	G	Guanosina
	T	Timidina
	W	A o T
	S	C o G
	M	A o C
10	K	G o T
	R	A o G
	Y	C o T
	B	C, G o T
	D	A, G o T
15	H	A, C o T
	V	A, C o G
	N o -	cualquier base (no un hueco), A, C, G, T

Descripción detallada de la invención

20 A continuación se da una descripción de la presente invención, que incluye realizaciones generales de la misma, dadas en términos generales. La invención se elucida adicionalmente en la descripción dada bajo el encabezado "Ejemplos" a continuación en la presente memoria, que proporciona datos experimentales que respaldan la invención, ejemplos específicos de diferentes aspectos de la invención y medios ilustrativos de llevar a cabo la invención.

25 La invención proporciona microorganismos capaces de producir uno o más productos por fermentación de un sustrato que comprende CO. En una realización particular, la invención proporciona microorganismos capaces de producir etanol o, etanol y uno o más de otros productos, por fermentación de un sustrato que comprende CO. El microorganismo recombinante produce al menos una cantidad reducida de 2,3-butanodiol comparado con un microorganismo original. En una realización, no produce sustancialmente 2,3-butanodiol o un precursor del mismo comparado con un microorganismo original.

30 Mediante varios estudios de inactivación de genes, los autores de la invención han identificado sorprendentemente que si se altera la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol en un microorganismo acetógeno carboxidotrófico, el microorganismos es capaz de producir niveles mayores de formiato, lactato, succinato, 2-oxoglutarato, valina, leucina, isoleucina y etanol, comparado con el microorganismo original. Los autores de la invención también creen que los microorganismos producen niveles mayores de piruvato y compuestos intermedios del ciclo de TCA
 35 acetolactato, malato, fumarato, citrato, puesto que estos son precursores de la producción de succinato, 2-oxoglutarato y valina, leucina e isoleucina. Esto tiene una serie de ventajas significativas. Una ventaja principal es un aumento de la eficacia de la producción de etanol incluyendo niveles mayores de etanol producido. Sin querer estar limitados por ninguna teoría particular, los autores de la invención creen que los niveles mayores de valina, leucina, formiato, lactato y piruvato, dan como resultado que estén disponibles más de estos productos químicos para los
 40 microorganismos para alimentar la producción de etanol. Además, los caldos de fermentación a menudo deben ser complementados con aminoácidos y otros productos químicos para asegurar la viabilidad y eficacia de producción del microorganismo durante la fermentación. La producción de valina, leucina, formiato, lactato y piruvato por un microorganismo recombinante de la invención obvia la necesidad de complementar el caldo de fermentación con estos productos químicos, lo cual puede producir ahorro en los costes. Además, la reducción o eliminación de la
 45 producción de 2,3-butanodiol en los microorganismos de la invención tiene ventajas. El 2,3-butanodiol puede ser tóxico para los microorganismos y por lo tanto puede tener un efecto negativo en la fermentación y crecimiento. La reducción o eliminación de 2,3-butanodiol del caldo de fermentación también permite una recuperación más fácil del etanol del caldo; típicamente tanto el etanol como el 2,3-butanodiol deben recuperarse juntos y después separar en una etapa posterior. El 2,3-butanodiol también es una fuente de potencial contaminación microbiana en un
 50 fermentador, puesto que es un sustrato para muchos organismos indeseables. Además, el succinato, 2-oxoglutarato,

formiato, lactato, piruvato, valina, leucina e isoleucina tienen valor económico independiente ya que se pueden usar en una serie de procedimientos comerciales y como compuestos intermedios en la producción de productos químicos corriente abajo.

5 Los autores de la invención han demostrado por primera vez la alteración o inactivación génica de un gen no esencial en un microorganismo acetógeno carboxidotrófico. Por consiguiente, en otro aspecto, la invención también proporciona microorganismos acetógenos carboxidotróficos en los que se ha alterado uno o más genes no esenciales comparado con un microorganismo original, junto con métodos de producción de dichos microorganismos y métodos de uso de dichos microorganismos. Un gen "no esencial" es uno que codifica una proteína que no es necesaria para la supervivencia de un microorganismo, de modo que el microorganismo puede sobrevivir sin suministro de la proteína. Los ejemplos de genes no esenciales incluyen los que codifican la acetolactato descarboxilasa y 2,3-butanodiol deshidrogenasa. Los expertos en la técnica serán capaces de identificar genes no esenciales usando técnicas convencionales en la materia, incluyendo técnicas recombinantes para alterar genes (como se describen en la presente memoria) junto con ensayos convencionales para ensayar si dichas modificaciones genéticas tienen un efecto en la supervivencia de los microorganismos.

15 Aunque la descripción de la invención en lo sucesivo se centra en la alteración de la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol por modificación genética, debe apreciarse que los microorganismos de la descripción también pueden incluir una o más modificaciones genéticas adicionales si se desea (incluyendo la alteración de uno o más genes no esenciales no asociados con la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol. En el caso del aspecto de la descripción relacionado con la alteración de genes no esenciales, debe apreciarse que están abarcadas modificaciones genéticas en genes que codifican otras enzimas distintas de las de la ruta del 2,3-butanodiol.

20 Además, aunque la descripción en lo sucesivo se puede centrar en la producción y recuperación de etanol como producto principal, debe apreciarse que la invención se puede usar para aumentar el nivel de producción de uno o más productos distintos del etanol o además del etanol.

Definiciones

25 Como se menciona en la presente memoria, un "caldo de fermentación" es un medio de cultivo que comprende al menos un medio nutriente y células bacterianas.

Como se menciona en la presente memoria, un microorganismo transportador es un microorganismo en el que se expresa una enzima metiltransferasa y es distinto del microorganismo destino.

30 Como se menciona en la presente memoria, un microorganismo destino es un microorganismo en el que son expresados los genes incluidos en una construcción/vector de expresión y es distinto del microorganismo transportador.

La expresión "producto de fermentación principal" se pretende que signifique el producto de fermentación que es producido en la mayor concentración y/o rendimiento.

35 Las expresiones "aumento de la eficacia", "mayor eficacia" y similares, cuando se usan en relación con un proceso de fermentación incluyen, pero no se limitan, a aumentar uno o más de la velocidad de crecimiento de los microorganismos que catalizan la fermentación, la velocidad de crecimiento y/o producción de producto, el volumen de producto deseado (tal como alcoholes) producido por volumen de sustrato consumido, la velocidad de producción o nivel de producción del producto deseado, y la proporción relativa del producto deseado producido comparado con otros subproductos de la fermentación.

40 Debe entenderse que la frase "sustrato que comprende monóxido de carbono" y las expresiones similares incluyen cualquier sustrato en el que haya disponible monóxido de carbono para una o más cepas de bacterias para el crecimiento y/o la fermentación, por ejemplo.

45 La frase "sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono" y frases y términos similares, incluyen cualquier gas que contiene un nivel de monóxido de carbono. En algunas realizaciones, el sustrato contiene al menos de aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de CO en volumen. El sustrato también puede contener de 20% a 70% de CO en volumen, de 30% a 60% de CO en volumen, y de 40% a 55% de CO en volumen, aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 50% de CO, o aproximadamente 55% de CO, o aproximadamente 60% de CO en volumen.

50 Aunque no es necesario que el sustrato contenga hidrógeno, la presencia de H₂ no debería ser perjudicial para la formación de producto de acuerdo con métodos de la descripción. En realizaciones particulares, la presencia de hidrógeno da como resultado una eficacia total mejorada de producción de alcohol. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el sustrato puede comprender una relación aproximada de 2:1, o 1:1, o 1:2 de H₂:CO. En una descripción, el sustrato comprende aproximadamente 30% o menos de H₂ en volumen, 20% o menos de H₂ en volumen, aproximadamente 15% o menos de H₂ en volumen o aproximadamente 10% o menos de H₂ en volumen.

55 En otras descripciones, la corriente de sustrato comprende concentraciones bajas de H₂, por ejemplo menos de 5%, o menos de 4%, o menos de 3%, o menos de 2%, o menos de 1%, o está sustancialmente exenta de hidrógeno. El

5 sustrato también puede contener algo de CO₂ por ejemplo, tal como de aproximadamente 1% a aproximadamente 80% de CO₂ en volumen, o de 1% a aproximadamente 30% de CO₂ en volumen. En una descripción el sustrato comprende menos o igual a aproximadamente 20% de CO₂ en volumen. En descripciones particulares, el sustrato comprende menos de o igual a aproximadamente 15% de CO₂ en volumen, menos de o igual a aproximadamente 10% de CO₂ en volumen, menos de o igual a aproximadamente 5% de CO₂ en volumen o sustancialmente no comprende CO₂.

10 En la siguiente descripción, las realizaciones de la invención se describen en términos de suministro y fermentación de un "sustrato gaseoso que contiene CO". Sin embargo, debe apreciarse que el sustrato gaseoso se puede proporcionar en formas alternativas. Por ejemplo, el sustrato gaseoso que contiene CO se puede proporcionar disuelto en un líquido. Esencialmente, se satura un líquido con un gas que contiene monóxido de carbono y después se añade el líquido al biorreactor. Esto se puede lograr usando metodología convencional. A modo de ejemplo, se podría usar un generador de dispersión de microburbujas (Hensirisak et. al. "Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation"; *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volumen 101, Número 3 / Octubre, 2002). A modo de ejemplo adicional, el sustrato gaseoso que contiene CO se puede adsorber en un soporte sólido. Dichos métodos alternativos están englobados por el uso de la expresión "sustrato que contiene CO" y similares.

15 En descripciones particulares de la invención, el sustrato gaseoso que contiene CO es un gas residual o de descarga industrial. Los "gases residuales o de descarga industrial" deben considerarse de forma amplia que incluyen cualesquiera gases que comprenden CO producido por un procedimiento industrial, e incluyen gases producidos como resultados de la fabricación de productos metálicos ferrosos, fabricación de productos no ferrosos, procedimientos de refinado del petróleo, gasificación de carbón, gasificación de biomasa, producción de energía eléctrica, producción de negro de humo y fabricación de coque. Se pueden proporcionar ejemplos adicionales en otra parte en la presente memoria.

20 Salvo que el contexto requiera otra cosa, las frases "fermentación", "procedimiento de fermentación" o "reacción de fermentación" y similares, como se usan en la presente memoria, se pretende que abarquen tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis de producto del procedimiento. Como se describirá además en la presente memoria, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, la adición de metales o composiciones a la reacción de fermentación debe entenderse que incluye la adición a uno o ambos de estos reactores.

25 El término "biorreactor" incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o torres o disposición de tuberías, que incluyen el reactor de tanque agitado continuo (CSTR), reactor de celdas inmovilizadas (ICR), reactor de lecho percolador (TBR), columna de burbujeo, fermentador de levantamiento por aire, mezclador estático u otro recipiente u otros dispositivos adecuados para el contacto con el gas-líquido. Como se describe en lo sucesivo, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, cuando se menciona la adición de sustrato al biorreactor o reacción de fermentación debe entenderse que incluye adición a cualquiera o ambos de estos reactores donde sea apropiado.

30 Cuando se usa en relación con los productos de fermentación de acuerdo con la invención, "uno o más productos" y frases similares se pretende que incluyan etanol, succinato, piruvato, lactato, valina, formiato, isoleucina, y leucina, por ejemplo. En una realización, "uno o más productos" también pueden incluir uno o más de acetolactato, malato, fumarato, citrato y 2-oxoglutarato. Debe apreciarse que los métodos de la invención se pueden aplicar a métodos destinados a la producción y recuperación de etanol (solo o en combinación con otros productos) o la producción y recuperación de productos distintos del etanol.

35 El término "acetato" incluye tanto la sal de acetato sola como una mezcla de ácido acético molecular o libre y sal de acetato, tal como la mezcla de sal de acetato y ácido acético libre presente en un caldo de fermentación como se puede describir en la presente memoria. La relación de ácido acético molecular a acetato en el caldo de fermentación depende del pH del sistema. Los términos succinato, piruvato, lactato, formiato, acetolactato, malato, fumarato, citrato y 2-oxoglutarato, deben considerarse de forma similar.

40 Salvo que el contexto requiera otra cosa, la referencia a cualquier compuesto en la presente memoria que puede existir en una o más formas isómeras (por ejemplo, forma D, L, meso, S, R, cis o trans) debe considerarse en general que incluye la referencia a uno cualquiera o más de dichos isómeros del compuesto. Por ejemplo, la referencia a "acetoína" debe considerarse que incluye la referencia a cualquiera o ambos de sus isómeros D y L.

45 Los "ácidos nucleicos exógenos" son ácidos nucleicos que se originan fuera del microorganismo en el que se introducen. Los ácidos nucleicos exógenos se pueden obtener de cualquier fuente adecuada incluyendo, pero no limitado, al microorganismo en el que se van a introducir, cepas o especies de los organismos que difieren del organismo en el que se deben introducir, o se pueden crear de forma artificial o recombinante. El ácido nucleico exógeno se puede adaptar para integrarlo en el genoma del microorganismo al que se va a introducir o para permanecer en un estado extracromosómico.

50 La "ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol" es una ruta de reacciones que incluyen la conversión de piruvato en acetolactato, acetolactato en acetoína, y acetoína en 2,3-butanodiol.

Como se usa en la presente memoria, "alterar la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol" y frases similares, se pretende que signifique que la producción de 2,3-butanodiol se reduce, o en una realización, se elimina sustancialmente.

Se pretende que un "precursor de 2,3-butanodiol" abarque acetoína y acetolactato.

- 5 Una enzima es "capaz de convertir" un primer compuesto o sustrato en un segundo compuesto o producto, si en su forma activa puede catalizar una reacción en la que al menos una parte del primer compuesto se convierte en el segundo compuesto.

La referencia a "alcohol deshidrogenasas" debe considerarse que incluye alcohol deshidrogenasas que son capaces de catalizar la conversión de cetonas (tales como acetoína) a alcoholes secundarios (tales como 2,3-butanodiol), o viceversa. Dichas alcohol deshidrogenasas incluyen alcohol secundario deshidrogenasas y alcohol primario deshidrogenasas. Una "alcohol secundario deshidrogenasa" es una que puede convertir cetonas (tales como acetoína) en alcoholes secundarios (tales como 2,3-butanodiol), o viceversa. Una "alcohol primario deshidrogenasa" es una que puede convertir aldehídos en alcoholes primarios, o viceversa; sin embargo, una serie de alcohol primario deshidrogenasas son capaces de catalizar la conversión de cetonas en alcoholes secundarios, o viceversa. Estas alcohol deshidrogenasas también se pueden denominar "alcohol primario-secundario deshidrogenasas". Por consiguiente, en algunas realizaciones de la invención, la referencia a la "2,3-butanodiol deshidrogenasa" debe considerarse que incluye la referencia a las 2,3-butanodiol deshidrogenasas que se pueden clasificar como alcohol primario, secundario o primario-secundario deshidrogenasas.

Una "modificación genética que altera" la ruta de biosíntesis de 2,3-butanodiol o la expresión o actividad de una o más enzimas de acuerdo con la invención, debe considerarse de forma amplia que incluye cualquier modificación genética que al menos reduce la biosíntesis del 2,3-butanodiol, la expresión o actividad de una o más enzimas, o en una realización bloquea sustancialmente la expresión o actividad de una o más enzimas o previene sustancialmente la producción de 2,3-butanodiol. Debe considerarse que la frase incluye, por ejemplo: la modificación de un gen que codifica una o más enzimas, incluyendo una modificación de un elemento regulador genético implicado en la expresión de un gen; la introducción de un ácido nucleico que produce una proteína que reduce o inhibe la actividad de una o más de las enzimas o que reduce o previene la expresión de una o más de las enzimas; introducción de un ácido nucleico que expresa un ácido nucleico que está adaptado para bloquear la expresión de un gen (por ejemplo, ARN de sentido contrario, ARNip (ARN interferente pequeño), CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas)); reducción o inhibición de una proteína que es necesaria para la expresión o actividad de una o más enzimas, introduciendo una modificación en un gen que codifica la proteína. Debe apreciarse que una proteína que se requiere para la expresión o actividad de una o más de las enzimas, puede actuar directamente en un gen o una o más enzimas, o puede actuar indirectamente a través de otro compuesto. De forma similar, una proteína que reduce o inhibe la actividad o expresión de una o más enzimas puede actuar directamente en el gen o la una o más enzimas, o puede actuar indirectamente a través de otro compuesto.

Una "modificación genética" debe considerarse de forma amplia y se pretende que incluya, por ejemplo, la introducción de uno o más ácidos nucleicos exógenos en un microorganismo, introducción de una mutación en un sitio genético, adición al o eliminación del genoma de uno o más nucleótidos, sustitución de uno o más nucleótidos por diferentes nucleótidos, sustitución de un gen, eliminación de un gen, adición de un gen y similares.

40 Un "microorganismo original" es un microorganismo usado para generar un microorganismo recombinante de la invención. En una realización, el microorganismo original puede ser uno que se encuentra en la naturaleza (es decir, un microorganismo de tipo natural) o uno que se ha modificado previamente (un microorganismo genéticamente modificado o recombinante). En realizaciones de la invención relacionadas con microorganismos que producen una cantidad reducida o no producen sustancialmente 2,3-butanodiol, el microorganismo original es uno que incluye una ruta funcional del 2,3-butanodiol (incluyendo los que se encuentran en la naturaleza o los que se han modificado previamente). Los ejemplos de microorganismos originales que incluyen una ruta funcional de biosíntesis de 2,3-butanodiol incluyen *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium coskatii* y aislados relacionados.

50 Una ruta "funcional" de biosíntesis de 2,3-butanodiol es una en la que el microorganismo puede convertir piruvato en 2,3-butanodiol. En una realización particular, la ruta incluye la conversión de piruvato en acetolactato, acetolactato en acetoína y acetoína en 2,3-butanodiol. En una realización particular, la conversión de piruvato en acetolactato es catalizada por una acetolactato sintasa, la conversión de acetolactato en acetoína es catalizada por una acetolactato descarboxilasa y la conversión de acetoína en 2,3-butanodiol es catalizada por una 2,3-butanodiol deshidrogenasa o una acetoína reductasa.

55 Los términos "construcciones" o "vectores" de ácido nucleico y términos similares, debe considerarse de forma amplia que incluyen cualquier ácido nucleico (incluyendo ADN o ARN) adecuado para usar como un vehículo para transferir material genético a una célula. Se debe considerar que los términos incluyen plásmidos, virus (incluyendo bacteriófagos), cósmidos y cromosomas artificiales. Las construcciones o vectores pueden incluir uno o más elementos reguladores, un origen de replicación, un sitio de multiclonación y/o un marcador seleccionable, entre

otros elementos, sitios y marcadores. En una realización particular, las construcciones o vectores están adaptados para permitir la alteración de un gen natural de un microorganismo original. En otra descripción, las construcciones o vectores se adaptan para permitir la expresión de uno o más genes codificados por la construcción o vector. Las construcciones o vectores de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos desnudos así como ácidos nucleicos formulados con uno o más agentes para facilitar el suministro a una célula (por ejemplo, ácido nucleico conjugado con liposoma, un organismo en el que está contenido el ácido nucleico).

A lo largo de esta memoria descriptiva, se proporciona información de secuencias de ejemplo para enzimas aplicables a la invención (por ejemplo, acetolactato sintasa, acetolactato descarboxilasa, 2,3-butanodiol deshidrogenasa, acetoína reductasa). Esta información se proporciona para identificar enzimas de ejemplo aplicables a la invención y permitir a un experto en la técnica la práctica de realizaciones específicas de la invención sin excesiva experimentación. Debe apreciarse que las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos para las enzimas pueden diferir de un microorganismo a otro. Por consiguiente, la invención no debe considerarse que esté limitada a esas realizaciones específicas sino que se extiende a la alteración de enzimas que tienen diferentes secuencias pero que son capaces de catalizar la conversión de piruvato en acetolactato, la conversión de acetolactato en acetoína, y/o la conversión de acetoína en 2,3-butanodiol. Típicamente, dichas enzimas tendrán una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 75% con la enzima ilustrada en la presente memoria. En descripciones particulares, dichas enzimas tendrán al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con una enzima ilustrada en la presente memoria. A nivel del ácido nucleico, los genes que codifican dichas enzimas variantes tendrán al menos una homología de secuencia de aproximadamente 75% con un ácido nucleico que codifica una enzima ilustrada en la presente memoria. En descripciones particulares dichos ácidos nucleicos tendrán una homología de secuencia de al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95% o 99% con un ácido nucleico que codifica una enzima ilustrada en la presente memoria.

Debe apreciarse que no es necesario que la enzima variante tenga el mismo nivel de actividad que una enzima ilustrada específicamente en la presente memoria. Todo lo que se requiere es que tenga algún nivel de actividad en la catálisis de la conversión de interés. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente otras de dichas enzimas, en particular a la luz de la información contenida en la presente memoria. Los ensayos enzimáticos útiles para evaluar actividades de enzimas para la ruta del 2,3-butanodiol incluyen, por ejemplo, el ensayo Voges-Proskauer descrito por Speckman y Collins (Specificity of the Westerfeld Adaptation of the Voges-Proskauer Test, 1982, *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 40-43) o Dulieu y Poncellet (Spectrophotometric assay of acetolactate decarboxylase, 1999, *Enzy and Microbiol Technol*, 25, 537-42).

Microorganismo

Como se ha descrito en la presente memoria antes, la invención proporciona un microorganismo recombinante capaz de usar monóxido de carbono para producir uno o más productos (en una realización particular, etanol como el producto principal) y producir una cantidad reducida o no producir sustancialmente 2,3-butanodiol y/o un precursor del mismo comparado con un microorganismo original. El microorganismo comprende una o más modificaciones genéticas (comparado con el microorganismo original) que alteran la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol.

Como se ha indicado antes, en una realización, el microorganismo produce etanol como el producto principal. En una realización, el microorganismo también produce uno o más de formiato, lactato, piruvato, succinato, valina, leucina, isoleucina. En una realización particular, el microorganismo está adaptado para producir una mayor cantidad de uno o más de etanol, formiato, lactato, piruvato, succinato, valina, leucina, isoleucina, comparado con el microorganismo original. En algunas realizaciones, el microorganismo produce uno o más de acetolactato, malato, citrato, fumarato, 2-oxoglutarato. En una realización particular, el microorganismo está adaptado para producir una mayor cantidad de uno o más de acetolactato, malato, fumarato, 2-oxoglutarato.

La una o más modificaciones genéticas preferiblemente alteran la expresión y/o actividad de una o más enzimas capaces de convertir piruvato en acetolactato, acetolactato en acetoína, acetoína en 2,3-butanodiol. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones genéticas alteran la conversión de piruvato en acetolactato solo, la conversión de acetolactato en acetoína solo, o la conversión de acetoína en 2,3-butanodiol solo. En otras realizaciones, la una o más modificaciones genéticas alteran dos o tres de estas conversiones.

En una realización, la una o más enzimas capaces de convertir el piruvato en acetolactato es una acetolactato sintasa (alsS).

La actividad de la acetolactato sintasa es capaz de convertir piruvato en acetolactato y es esencial para la producción de aminoácidos de cadena ramificada (incluyendo valina, leucina, isoleucina) (Figura 1). En un microorganismo original pueden ser expresadas una o más enzimas que tienen actividad de acetolactato sintasa. Los ejemplos de secuencia de aminoácidos de *C. autoethanogenum* (AEI90719.1, AEI90730.1, AEI90731.1, AEI90713.1, AEI90714.1), *C. ljungdahlii* (ADK15104.1, ADK15104.1, ADK15105.1, ADK15400.1, ADK15400.1), y *C. ragsdalei* (AEI90734.1, AEI90734.1, AEI90735.1, AEI90727.1, AEI90727.1) y respectivas secuencias de ácidos nucleicos de *C. autoethanogenum* (HQ876013.1, HQ876023.1, HQ876021.1), *C. ljungdahlii* (CP001666.1 - CLJU_c38920, CLJU_c32420, CLJU_c20420-30), y *C. ragsdalei* (HQ876014.1, HQ876024.1, HQ876022.1) se pueden obtener de GenBank. Sin embargo, como se ha indicado antes en la presente memoria, la secuencia del

gen que codifica dichas enzimas y la secuencia de aminoácidos de las enzimas, puede variar de un microorganismo a otro.

5 En algunas realizaciones, un microorganismo original puede contener más de una enzima que es capaz de convertir el piruvato en acetolactato. Cuando un microorganismo original contiene más de una enzima que es capaz de convertir piruvato en acetolactato, se pueden introducir una o más modificaciones genéticas de modo que se altera la expresión y/o actividad de dos o más de las enzimas. Cuando hay más de una enzima presente en un microorganismo original, la alteración de más de una de dichas enzimas puede tener el efecto de aumentar la producción de succinato, uno o más compuestos intermedios del ciclo de TCA y/o etanol, por encima del nivel que se puede lograr si solo se altera una enzima. Los niveles de producción se pueden aumentar con la alteración de cada enzima adicional presente en el microorganismo original. Aunque la alteración de la expresión y/o actividad de todas dichas enzimas de actividad puede proporcionar algunas ventajas en términos de producción de los productos deseados, los autores de la invención no contemplan que sea necesaria alterar la expresión y/o actividad de todas dichas enzimas con el fin de obtener los beneficios de la invención.

En una realización, se alteran al menos 2, 3, 4 o 5 enzimas capaces de convertir el piruvato en acetolactato.

15 En realizaciones de la invención donde la conversión de piruvato en acetolactato está sustancial o completamente bloqueada, el crecimiento de y la fermentación por lo microorganismos puede requerir el complemento con uno o más aminoácidos, incluyendo, por ejemplo, valina, leucina e isoleucina. Esto se puede lograr por cualquier medio que haga que el o los aminoácidos estén disponibles para el microorganismo. A modo de ejemplo, se pueden añadir uno o más aminoácidos a un cultivo, medio de crecimiento o fermentación, a un cultivo de los microorganismos y/o a un caldo de fermentación. El o los aminoácidos se pueden añadir directamente al medio o caldo o se pueden añadir en forma de un extracto, por ejemplo extracto de levadura.

En una realización, la una o más enzimas capaces de convertir el acetolactato en acetoína es una acetolactato descarboxilasa (budA).

25 La actividad de la acetolactato descarboxilasa es capaz de convertir la acetolactato en acetoína (Figura 1). Una o más enzimas que tienen actividad de acetolactato descarboxilasa pueden ser expresadas en un microorganismo original. La información de secuencias de aminoácidos (AEI90717.1, ADK13906.1, AEI90718.1) y ácidos nucleicos (HQ876011.1, CP001666.1 - CLJU_c08380, HQ876012.1) de ejemplo para la acetolactato descarboxilasa de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* y *C. ragsdalei*, se puede obtener de GenBank. Sin embargo, como se ha indicado antes en la presente memoria, la secuencia del gen que codifica dichas enzimas y la secuencia de aminoácidos de las enzimas, puede variar de un microorganismo a otro.

35 En algunas realizaciones, un microorganismo original puede contener más de una enzima que es capaz de convertir el acetolactato en acetoína. Cuando el microorganismo original contiene más de una de dichas enzimas, se pueden introducir una o más modificaciones genéticas de modo que se altere la expresión y/o actividad de dos o más de las enzimas. Cuando está presente más de una de dichas enzimas en un microorganismo original, la alteración de más de una enzima puede tener el efecto de aumentar la producción de valina, leucina, isoleucina, etanol, lactato, formiato y succinato, y/o uno o más compuestos intermedios del ciclo de TCA por encima del nivel que se puede lograr si solo se altera una sola enzima. Los niveles de producción se pueden aumentar más con la alteración de cada enzima adicional presente en el microorganismo original. Aunque la alteración de la expresión y/o actividad de todas dichas enzimas de actividad puede proporcionar algunas ventajas en términos de producción de los productos deseados, los autores de la invención no contemplan que sea necesaria alterar la expresión y/o actividad de todas dichas enzimas con el fin de obtener los beneficios de la invención.

En una realización, la una o más enzimas capaces de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol se elige del grupo que comprende 2,3-butanodiol deshidrogenasa (2,3 bdh) y una acetoína reductasa.

45 La actividad de la 2,3-butanodiol deshidrogenasa es capaz de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol (Figura 1). La información de secuencias de aminoácidos (AEI90715.1, ADK15380.1, AEI90716.1) y ácidos nucleicos (HQ876009.1, CP001666.1 - CLJU_c23220, HQ876010.1) de ejemplo para la 2,3-butanodiol deshidrogenasa de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* y *C. ragsdalei*, se puede obtener de GenBank. En un microorganismo original pueden ser expresadas una o más enzimas que tienen actividad de acetolactato sintasa. A modo de ejemplo, los autores de la invención han identificado que *C. autoethanogenum*, *C. ragsdalei* y *C. ljungdahlii* incluyen una alcohol primario-secundario deshidrogenasa adicional capaz de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol. La información de secuencias de ejemplo para esta enzima se proporciona en las SEQ ID NO: 34, 35, 36 y 37. Sin embargo, como se ha indicado antes en la presente memoria, la secuencia del gen que codifica dichas enzimas y la secuencia de aminoácidos de las enzimas, puede variar de un microorganismo a otro.

55 En algunas realizaciones, un microorganismo original puede contener más de una enzima que es capaz de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol Cuando el microorganismo original contiene más de una de dichas enzimas, se pueden introducir una o más modificaciones genéticas de modo que se altere la expresión y/o actividad de dos o más de las enzimas. Cuando está presente más de una de dichas enzimas en un microorganismo original, la alteración de más de una de dichas enzima puede tener el efecto de aumentar la producción de valina, leucina,

isoleucina, etanol, lactato, formiato y succinato, y/o uno o más compuestos intermedios del ciclo de TCA por encima del nivel que se puede lograr si solo se altera una sola enzima. Los niveles de producción se pueden aumentar más con la alteración de cada enzima adicional presente en el microorganismo original. Aunque la alteración de la expresión y/o actividad de todas dichas enzimas de actividad puede proporcionar algunas ventajas en términos de producción de los productos deseados, los autores de la invención no contemplan que sea necesaria alterar la expresión y/o actividad de todas dichas enzimas con el fin de obtener los beneficios de la invención.

En una realización, se alteran al menos dos o tres enzimas capaces de convertir la acetoina en 2,3-butanodiol.

En una realización, el microorganismo se selecciona del grupo de organismos acetógenos carboxidotróficos, que comprenden las especies *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*.

Estos acetógenos carboxidotróficos se definen por su capacidad para usar y crecer de forma quimioautótrofa en fuentes gaseosas de un carbono (C1) tales como monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO₂) con monóxido de carbono (CO) y/o hidrógeno (H₂) como fuente de energía en condiciones anaerobias, formando acetil-CoA, acetato y otros productos. Comparten el mismo modo de fermentación, la ruta Wood-Ljungdahl o reductora de la acetil-CoA, y se definen por la presencia del conjunto de enzimas que consiste en monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH), hidrogenasa, formiato deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato sintasa, metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato ciclohidrolasa, metileno-tetrahidrofolato reductasa, y monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa (CODH/ACS), cuya combinación es característica y única de este tipo de bacterias (Drake, Küsel, Matthies, Wood, y Ljungdahl, 2006). A diferencia del crecimiento quimioheterótrofo de bacterias fermentadoras de azúcar que convierten el sustrato en biomasa, metabolitos secundarios y piruvato a partir de los cuales se forman productos (vía la acetil-CoA o directamente), en acetógenos el sustrato es canalizado directamente en acetil-CoA, a partir de los cuales se forman productos, biomasa y metabolitos secundarios.

En una realización, el microorganismo se selecciona de un grupo de Clostridia carboxidotróficas que comprenden las especies *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, y "*C. ragsdalei* y aislados relacionados. Estas incluyen, pero no se limitan a las cepas *C. autoethanogenum* JAI-1¹ (DSM10061) (Abrini, Naveau, y Nyns, 1994), *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) (WO/2009/064200), *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETC^T (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, Miller, y Yang, 1993), *C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) (patente de EE.UU. 5.593.886), *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) (patente de EE.UU. 6.368.819), *C. ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989) (patente de EE.UU. 6.368.819), o "*C. ragsdalei* P11^T" (ATCC BAA-622) (WO 2008/028055), y aislados relacionados tales como "*C. coskatii*" (patente de EE.UU. 2011/0229947), y cepas mutantes de los mismos tales como *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. "Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*. Tesis doctoral, North Carolina State University, 2010).

Estas cepas forman una subagrupación dentro de la agrupación I de ARNr de clostridio (Collins et al., 1994), que tiene una identidad de al menos 99% en el nivel del gen de ARNr 16S, aunque son distintas especies determinado por reasociación de ADN-ADN y experimentos de huella dactilar de ADN (WO 2008/028055, patente de EE.UU. 2011/0229947).

Las cepas de esta agrupación están definidas por características comunes, teniendo tanto genotipo como fenotipo similar, y todas comparten el mismo modo de conservación de energía y metabolismo fermentador. Estas cepas de esta agrupación carecen de citocromos y conservan energía por un complejo Rnf.

Todas las cepas de esta agrupación tiene un tamaño de genoma de aproximadamente 4,2 Mpb (Köpke et al., 2010) y una composición de GC de aproximadamente 32% en moles (Abrini et al., 1994; Köpke et al., 2010; Tanner et al., 1993) (documento WO 2008/028055; patente de EE.UU. 2011/0229947), y operones de genes clave esenciales conservados que codifican las enzimas de la ruta Wood-Ljungdahl (monóxido de carbono deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato sintetasa, metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato ciclohidrolasa, metileno-tetrahidrofolato reductasa, y monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa), hidrogenasa, formiato deshidrogenasa, complejo Rnf (rnfCDGEAB), piruvato:ferredoxina oxidoreductasa, aldehído:ferredoxina oxidoreductasa (Köpke et al., 2010, 2011). Se ha encontrado que la organización y número de genes de la ruta Wood-Ljungdahl, responsables de la absorción de gas, son los mismos en todas las especies, a pesar de las diferencias en las secuencias nucleicas y de aminoácidos (Köpke et al., 2011).

Las cepas tienen todas morfología y tamaño similares (las células en crecimiento logarítmico son entre 0,5-0,7 x 3-5 µm), son mesófilos (temperatura de crecimiento óptimo entre 30-37 °C) y estrictamente anaerobios (Abrini et al., 1994; Tanner et al., 1993) (documento WO 2008/028055). Además, comparten todos los mismos rasgos filogenéticos principales, tal como un mismo intervalo de pH (pH 4-7,5, con un pH inicial óptimo de 5,5-6), crecimiento autótrofo fuerte en gases que contienen CO con velocidades de crecimiento similares y un perfil metabólico con etanol y ácido acético como el producto final de fermentación principal, con pequeñas cantidades de 2,3-butanodiol y ácido láctico formados en determinadas condiciones (Abrini et al., 1994; Köpke et al., 2011; Tanner et al., 1993)(documento WO 2008/028055). Se ha observado la producción de indol con todas las especies. Sin embargo, las especies se diferencian en el uso de sustratos de diferentes azúcares (p. ej. ramnosa, arabinosa), ácidos (p. ej. gluconato, citrato), aminoácidos (p. ej. arginina, histidina), u otros sustratos (p. ej. betaína, butanol). Algunas de las especies se encontró que eran auxótrofas para determinadas vitaminas (p. ej., tiamina, biotina)

mientras que otras no lo eran. Se ha mostrado la reducción de ácidos carboxílicos a sus correspondientes alcoholes en una variedad de estos organismos (Perez, Richter, Loftus, y Angenent, 2012).

5 Por lo tanto, los rasgos descritos no son específicos a un organismo como *C. autoethanogenum* o *C. ljungdahlii*, sino más bien rasgos generales para clostridios sintetizadores de etanol, caboxidotróficos. Por lo tanto, la invención se puede prever para trabajar con estas cepas, aunque puede haber diferencias de rendimiento.

En algunas realizaciones, el microorganismo original se selecciona del grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, y *Clostridium ragsdalei*. En una realización, el grupo también comprende *Clostridium coskatii*. En una realización particular, el microorganismo original es *Clostridium autoethanogenum* DSM23693.

10 Los microorganismos originales se pueden modificar para llegar a los microorganismos de la invención usando cualquier número de técnicas de transformación y ácidos nucleicos recombinantes conocidas. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook et al, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). A modo de ejemplo adicional, se puede usar la metodología descrita en la sección de ejemplos en lo sucesivo.

15 A modo de ejemplo general, en el caso de introducir una mutación en un gen, o alterar de otra forma o inactivar un gen, se puede diseñar una construcción o vector de ácido nucleico adecuado para integrar en el genoma del microorganismo original para alterar el gen. Dichas construcciones incluirán típicamente secuencias de ácido nucleico (brazos) homólogos a una región dentro o que flanquea el gen que se va a alterar, lo que permite que se produzca la recombinación homóloga, y en contraste que se produzca la introducción de una mutación, la escisión de una región de ácido nucleico del gen, o la sustitución de una región del gen por un ácido nucleico. Aunque se prefiere que los brazos en las construcciones tengan 100% de complementariedad con la región en el genoma a la que se dirigen, esto no es necesario, con la condición de que la secuencia sea suficientemente complementaria para permitir la recombinación dirigida con la región genética de interés. Típicamente, los brazos tendrán un nivel de homología que permitiría la hibridación con una región diana en condiciones restrictivas, como se define en Sambrook et al 1989.

20 Los expertos en la técnica apreciarán las secuencias de ácidos nucleicos suficientes para permitir la recombinación homóloga dirigida e integración de un ácido nucleico exógeno en el genoma de un microorganismo original, teniendo en cuenta la información de secuencia disponible para las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol. Sin embargo, a modo de ejemplo, en el caso de *budA*, se pueden usar los brazos de homología flanqueadores (por ejemplo, SEQ ID 3, 4 y 78-81), o en el caso de *C. ljungdahlii*, diseñados a partir de la información de secuencias de ácidos nucleicos de Genbank (CP001666.1). A modo de ejemplo adicional, las secuencias flanqueadoras de genes que codifican enzimas que se van a alterar de acuerdo con la invención, se pueden determinar a partir de la información de secuencia genómica de microorganismos relevantes. A modo de ejemplo particular, las secuencias flanqueadoras en *C. ljundahlii* se pueden determinar a partir de la información en GenBank CP001666.1

35 A modo de ejemplo general adicional, cuando se introduce un ácido nucleico en un microorganismo original para expresar una proteína o ácido nucleico que inhibe la expresión o actividad de una enzima en la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol, o para expresar una proteína que aumenta la expresión de un compuesto que inhibe la expresión o actividad de una enzima en la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodio, la construcción se diseñará para permitir la expresión de la proteína en el microorganismo. Típicamente incluirán elementos reguladores adecuados, incluyendo un promotor. Se pueden usar promotores constitutivos o inducibles.

40 Donde la invención usa la alteración directa de un gen introduciendo una mutación o similar, la construcción o vector usado para transformar el microorganismo original se adaptará para que se integre en el genoma del microorganismo, como se ha mencionado antes. En el caso de expresión de una proteína o ácido nucleico que se adapte para alterar la expresión o actividad de una enzima en la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol, o aumentar la expresión o actividad de un inhibidor de una enzima implicada en la ruta, las construcciones pueden permanecer extracromosómicas tras la transformación de un microorganismo original, o se pueden adaptar para la integración en el genoma del microorganismo. Por consiguiente, las construcciones útiles en la invención pueden incluir secuencias de nucleótidos adaptadas para ayudar a la integración (por ejemplo, una región que permite la recombinación homóloga e integración dirigida en el genoma del hospedante) o expresión y replicación de una construcción extracromosómica (por ejemplo, origen de replicación y otras secuencias reguladoras).

45 Las construcciones de ácido nucleico útiles en la invención se pueden construir usando cualquier número de técnicas convencionales en la materia. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de síntesis química o recombinante. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook et al, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Se describen técnicas de ejemplo adicionales en la sección de ejemplos en lo sucesivo. Esencialmente, los genes individuales, elementos reguladoras, brazos de homología y similares, se unirán operativamente entre sí de modo que puedan realizar su función deseada. Los expertos en la técnica apreciarán los vectores adecuados para usar en la invención. Sin embargo, a modo de ejemplo, los siguientes vectores pueden ser adecuados: pMTL, pIMP, pJIR y los plásmidos ilustrados en la sección

de ejemplos en lo sucesivo.

Debe apreciarse que los ácidos nucleicos útiles para generar los microorganismos de la invención, pueden estar en una forma adecuada, que incluye ARN, ADN o ADNc, incluyendo ácidos nucleicos bicatenarios y monocatenarios.

5 El uno o más ácidos nucleicos exógenos se pueden suministrar a un microorganismo original como ácidos nucleicos desnudos o se pueden formular con uno o más agentes para facilitar el proceso de transformación (por ejemplo, ácido nucleico conjugado con liposoma, un organismo en el que está contenido el ácido nucleico). El uno o más ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN o combinaciones de los mismos, si es adecuado.

10 Los microorganismos de la invención se pueden preparar a partir de un microorganismo original y uno o más ácidos nucleicos exógenos usando cualquier número de técnicas conocidas en la materia para la producción de microorganismos recombinantes. Solo a modo de ejemplo, la transformación (incluyendo transducción o transfección) se puede lograr por electroporación, conjugación, inducción de profago o competencia química y natural. Se describen técnicas de transformación adecuadas, por ejemplo, en Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Labrotary Press, Cold Spring Harbour, 1989.

15 A modo de ejemplo adicional, se podrían usar las técnicas de electroporación descritas en: Koepke et al. 2010, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 13087-92; PCT/NZ2011/000203; documento WO2012/053905; Straetz et al., 1994, *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1033-37; Mermelstein et al., 1992, *Biotechnology*, 10, 190-195; Jennert et al., 2000, *Microbiology*, 146: 3071-3080; Tyurin et al., 2004, *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 883-890; se podrían usar. A modo de ejemplo adicional, se podrían usar las técnicas de inducción de profago como se describen en Prasanna Tamarapu Parthasarathy, 2010, "Development of a Genetic Modification System in *Clostridium scatologenes* ATCC 25775 for Generation of Mutants", Masters Project Western Kentucky University. A modo de ejemplo adicional, se podrían usar los métodos de conjugación descritos en Herbert et al., 2003, *FEMS Microbiol. Lett.* 229: 103-110 o Williams et al., 1990, *J. Gen. Microbiol.* 136: 819826.

20 En algunas descripciones, debido a los sistemas de restricción que son activos en el microorganismo que se va a transformar, es necesario metilar el ácido nucleico que se va a introducir en el microorganismo. Esto se puede hacer usando una variedad de técnicas, incluyendo las descritas a continuación e ilustradas además en la sección de ejemplos en lo sucesivo.

A modo de ejemplo, se produce un microorganismo recombinante por un método que comprende las siguientes etapas:

30 introducción en un microorganismo transportador de (i) una construcción/vector que se va a introducir en el microorganismo original como se describe en la presente memoria, y (ii) una construcción/vector de metilación que comprende un gen de metiltransferasa;

expresión del gen de metiltransferasa;

aislamiento de una o más construcciones/vectores a partir del microorganismo transportador; e,

introducción de una o más construcciones/vectores en el microorganismo destino.

35 En una descripción, el gen de metiltransferasa de la etapa B se expresa de forma constitutiva. En otra descripción, la expresión del gen de metiltransferasa de la etapa B es inducida.

40 El microorganismo transportador es un microorganismo, preferiblemente un microorganismo de restricción negativa, que facilita la metilación de las secuencias de ácido nucleico que componen la construcción/vector de expresión. En una descripción particular, el microorganismo transportador es *E. coli*, *Bacillus subtilis* o *Lactococcus lactis* de restricción negativa.

La construcción/vector de metilación comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una metiltransferasa.

45 Una vez que la construcción/vector de expresión y la construcción/vector de metilación se introducen en el microorganismo transportador, es inducido el gen de metiltransferasa presente en la construcción/vector de metilación. La inducción puede ser cualquier sistema promotor adecuado aunque en una descripción particular, la construcción/vector de metilación comprende un promotor lac inducible (por ejemplo, como en la SEQ ID NO: 31) y es inducido por la adición de lactosa o un análogo de la misma, más preferiblemente de isopropil-β-D-tio-galactósido (IPTG). Otros promotores adecuados incluyen los sistemas ara, tet o T7. En una descripción adicional, el promotor de la construcción/vector de metilación es un promotor constitutivo.

50 En una descripción particular, la construcción/vector de metilación tiene un origen de replicación específico para la identidad del microorganismo transportador, de modo que cualquiera de los genes presentes en la construcción/vector de metilación son expresados en el microorganismo transportador. Preferiblemente, la construcción/vector que se va a introducir en el microorganismo original tiene un origen de replicación específico para la identidad del microorganismo.

La expresión de la enzima metiltransferasa produce la metilación de los genes presentes en la construcción/vector que se va a introducir en el microorganismo original. La construcción/vector después se puede aislar del microorganismo transportador de acuerdo con uno cualquiera de una serie de métodos conocidos. A modo de ejemplo solo, se puede usar la metodología descrita en la sección de ejemplos en lo sucesivo para aislar la construcción/vector.

5

En una descripción particular, se aíslan simultáneamente ambas construcciones/vectores.

La construcción/vector destinada para el microorganismo original se puede introducir en el microorganismo usando cualquier número de métodos conocidos. Sin embargo, a modo de ejemplo, se puede usar la metodología descrita en la sección de ejemplos en lo sucesivo.

10 Está previsto que se pueda introducir un gen de metiltransferasa en un microorganismo transportador y ser expresado en exceso. Por lo tanto, en una descripción, la enzima metiltransferasa resultante se puede recoger usando métodos conocidos y usar para metilar in vitro la construcción que se va a introducir en el microorganismo original. Después la construcción/vector se puede introducir en el microorganismo destino (original). En otra descripción, se introduce el gen de metiltransferasa en el genoma del microorganismo transportador seguido de introducción de la construcción destinada al microorganismo original en el microorganismo transportador, aislamiento de una o más construcciones/vectores a partir del microorganismo transportador y después introducción de la construcción/vector en el microorganismo destino (original).

15

Está previsto que la construcción/vector destinada para el microorganismo original y la construcción/vector de metilación como se ha definido antes, se puedan combinar para proporcionar una composición importante. Dicha composición tiene utilidad particular para evitar mecanismos barrera de restricción para producir microorganismos recombinantes de la invención.

20

En una descripción particular, las construcciones/vectores descritos en la presente memoria antes son plásmidos.

El experto en la técnica apreciará una serie de metiltransferasas adecuadas útiles para producir los microorganismos de la invención. Sin embargo, a modo de ejemplo se puede usar la metiltransferasa del fago Φ T1 de *Bacillus subtilis* y la metiltransferasa descrita en los ejemplos en lo sucesivo. Los ácidos nucleicos que codifican metiltransferasas adecuadas serán fácilmente evidentes teniendo en cuenta la secuencia de la metiltransferasa deseada y el código genético. En una descripción, el ácido nucleico que codifica una metiltransferasa se describe en los ejemplos en lo sucesivo (por ejemplo, el ácido nucleico de SEQ ID NO: 31).

25

Se puede usar cualquier número de construcciones/vectores adaptados para permitir la expresión de un gen de metiltransferasa, para generar una construcción/vector de metilación. Sin embargo, a modo de ejemplo, se puede usar el plásmido descrito en la sección de ejemplos en lo sucesivo.

30

A partir de la información contenida en la presente memoria, se apreciará que se puede adaptar la modificación genética a un microorganismo original para favorecer la producción de uno o más productos frente a uno o más de otros productos. Por ejemplo, la alteración de la conversión de piruvato en acetolactato favorece la producción de lactato, formiato, malato, fumarato, citrato, succinato y 2-oxoglutarato frente a la producción de valina, leucina e isoleucina.

35

Método de producción

La invención proporciona un método para producir uno o más productos por fermentación microbiana, que comprende fermentar un sustrato que comprende CO usando un microorganismo de la invención. En una realización particular, el método es para producir etanol o uno o más de otros productos para la fermentación microbiana, que comprende fermentar un sustrato que comprende CO usando un microorganismo de la invención. Los métodos de la invención se pueden usar para reducir las emisiones atmosféricas totales de carbono de un procedimiento industrial.

40

Preferiblemente, la fermentación comprende las etapas de fermentar anaeróticamente un sustrato en un biorreactor para producir uno o más productos (en una realización particular, etanol, o etanol y uno o más de otros productos) usando un microorganismo recombinante de la invención.

45

En una realización el método comprende las etapas de:

(a) proporcionar un sustrato que comprende CO a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos del primer aspecto de la invención; y

(b) fermentar anaeróticamente el cultivo en el biorreactor para producir uno o más productos (en una realización, incluyendo etanol).

50

En una realización el método comprende las etapas de:

i. capturar el gas que contiene CO producido como resultado del procedimiento industrial, antes de liberar el gas a la atmósfera;

ii. la fermentación anaerobia del gas que contiene CO para producir uno o más productos (en una realización, incluyendo etanol) mediante un cultivo que contiene uno o más microorganismos del primer aspecto de la invención.

Como se describe en la presente memoria, el sustrato gaseoso fermentado por el microorganismo es un sustrato gaseoso que contiene CO. El sustrato gaseoso puede ser un gas residual que contiene CO obtenido como un subproducto de un procedimiento industrial, o de alguna otra fuente tal como de humos de escape de automóvil. En ciertas descripciones, el proceso industrial se selecciona del grupo que consiste en fabricación de productos metálicos ferrosos, tal como una planta siderúrgica, fabricación de productos no ferrosos, procesos de refinado de petróleo, gasificación de carbón, producción de energía eléctrica, producción de negro de carbono, producción de amoníaco, refinado de gas natural, producción de metanol y fabricación de coque. En estas descripciones, el gas que contiene CO puede capturarse del procedimiento industrial antes de emitirse a la atmósfera, usando cualquier método conveniente. El CO puede ser un componente de gas de síntesis (gas que comprende monóxido de carbono e hidrógeno). El CO producido de procedimientos industriales normalmente se quema para producir CO₂ y por lo tanto, la invención tiene utilidad particular en la reducción de las emisiones gaseosas de CO₂ de efecto invernadero y producción de butanol para usar como un biocombustible. Dependiendo de la composición del sustrato que contiene CO gaseoso, puede ser conveniente tratarlo para eliminar cualquier impureza indeseada, tal como partículas de polvo antes de introducirlo a la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso se puede filtrar o depurar por métodos conocidos.

Se apreciará que para el crecimiento de las bacterias y que se produzca el paso de CO a etanol (y/o otro(s) producto(s)), además del gas sustrato que contiene CO, será necesario alimentar un medio nutriente líquido adecuado al biorreactor. El sustrato y medio se pueden alimentar al biorreactor en una forma continua, discontinua o discontinua alimentada. Un medio nutriente contendrá vitaminas y minerales suficientes para permitir el crecimiento del microorganismo usado. Los medios anaerobios adecuados para la fermentación para producir etanol (y opcionalmente uno o más de otros productos) usando CO son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describen medios adecuados en Biebel (*Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (2001) 27, 18-26). El sustrato y medio se pueden alimentar al biorreactor en una forma continua, discontinua o discontinua alimentada. En una descripción de la invención, el medio es como se describe en la sección de ejemplos en lo sucesivo.

La fermentación debería llevarse a cabo convenientemente en condiciones adecuadas para que se produzca la fermentación de CO a etanol (y/o otro(s) producto(s)). Las condiciones de reacción que deberían considerarse incluyen presión, temperatura, caudal de gas, caudal de líquido, pH del medio, potencial rédox del medio, velocidad de agitación (si se usa un reactor de tanque agitado continuo), nivel de inóculo, concentraciones de sustrato gaseoso máximo para asegurar que el CO en la fase líquida no se convierte en limitante, y concentraciones de producto máximas para evitar la inhibición de producto.

Además, a menudo es conveniente aumentar la concentración de CO de una corriente de sustrato (o presión parcial de CO en un sustrato gaseoso) y por lo tanto aumentar la eficacia de las reacciones de fermentación cuando el CO es un sustrato. El trabajo a mayores presiones permite un aumento significativo de la velocidad de transferencia de CO de la fase gaseosa a la fase líquida, donde puede ser absorbido por el microorganismo como una fuente de carbono para la producción de etanol (y/u otro(s) producto(s)), Esto a su vez significa que el tiempo de retención (definido como el volumen líquido en el biorreactor dividido entre el caudal de gas de entrada) se puede reducir cuando los biorreactores se mantienen a presión elevada en lugar de a presión atmosférica. Las condiciones de reacción óptimas dependerán en parte del microorganismo particular de la invención usado.

Sin embargo, en general, se prefiere que la fermentación se lleve a cabo a presión mayor que la presión ambiente. Además, puesto que una velocidad dada de conversión de CO a etanol (y/u otro(s) producto(s)) es en parte una función del tiempo de retención del sustrato, y alcanzar un tiempo de retención deseado a su vez dicta el volumen necesario de un biorreactor, el uso de sistemas presurizados pueden reducir en gran medida el volumen del biorreactor necesario, y por consiguiente el coste de capital del equipo de fermentación. Según los ejemplos dados en la patente de EE.UU. n° 5.593.886, el volumen del reactor se puede reducir en proporción lineal a los aumentos de la presión de trabajo del reactor, es decir, los biorreactores que trabajan a 10 atmósferas de presión necesitan solo una décima parte del volumen de los que trabajan a 1 atmósfera de presión.

Los beneficios de llevar a cabo una fermentación de gas a etanol a presiones elevadas se han descrito en otra parte. Por ejemplo, el documento WO 02/08438 describe fermentaciones de gas a etanol realizadas a presiones de 2,11 kg/cm² (30 psig) y 5,27 kg/cm² (75 psig), dando productividades de etanol de 150 g/l/día a 369 g/l/día respectivamente. Sin embargo, se encontró que fermentaciones de ejemplo realizadas usando medios y composiciones de gas de entrada similares a presión atmosférica, producen entre 10 y 20 veces menos etanol por litro por día.

Es conveniente también que la velocidad de introducción del sustrato gaseoso que contiene CO sea tal que asegure que la concentración de CO en la fase líquida no se convierte en limitante. Esto se debe a que una consecuencia de condiciones limitadas por el CO puede ser que el producto etanol sea consumido por el cultivo.

La composición de las corrientes de gas usadas para alimentar una reacción de fermentación pueden tener un impacto importante en la eficacia y/o costes de esta reacción. Por ejemplo, el O₂ puede reducir la eficacia de un

proceso de fermentación anaerobio. El procesamiento de gases no deseados o innecesarios en etapas de un proceso de fermentación antes o después de la fermentación, puede aumentar la carga en dichas etapas (p. ej., donde la corriente de gas es comprimida antes de entrar en un biorreactor, se puede usar energía innecesaria para comprimir gases que no son necesarios en la fermentación). Por consiguiente, puede ser conveniente tratar las corrientes de sustrato, en particular corrientes de sustrato obtenidas de fuentes industriales, para separar componentes no deseados y aumentar la concentración de los componentes convenientes.

En algunas descripciones, un cultivo de una bacteria de la invención se mantiene en un medio de cultivo acuoso. Preferiblemente, el medio de cultivo acuoso es un medio de crecimiento microbiano anaerobio mínimo. Los medios adecuados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.173.429 y 5.593.886 y documento WO 02/08438, y se describen en la sección de ejemplos en lo sucesivo.

El uno o más productos producidos por un método de la invención (en una realización, etanol o una corriente mixta de alcohol que contiene etanol y/o uno o más de otros productos) se puede recuperar del caldo de fermentación por métodos conocidos en la técnica, tales como destilación fraccionada o evaporación, pervaporación y fermentación extractiva, incluyendo, por ejemplo, extracción líquido-líquido. Los subproductos tales como ácidos, incluyendo acetato, también se pueden recuperar del caldo de fermentación usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un sistema de adsorción que implica un filtro de carbón activado o electrodiálisis. Alternativamente, también se puede usar separación de gas continua.

En algunas realizaciones, el etanol y/o uno o más de otros productos se recuperan del caldo de fermentación separando de forma continua una parte del caldo del biorreactor, separando células microbianas del caldo (convenientemente por filtración) y recuperando uno o más productos del caldo. Los alcoholes se pueden recuperar convenientemente por ejemplo por destilación, y los ácidos se pueden recuperar, por ejemplo, por adsorción sobre carbón activado. Las células microbianas separadas preferiblemente se devuelven al biorreactor de fermentación. El permeado exento de células que queda después de haber separado todos los alcoholes y ácidos, preferiblemente también se devuelve al biorreactor de fermentación. Se pueden añadir nutrientes adicionales (tales como vitamina B) al permeado exento de células para recargar el medio nutriente antes de devolverlo al biorreactor.

Además, si el pH del caldo se ajustó como se ha descrito antes para potenciar la absorción de ácido acético en el carbón activado, el pH debería reajustarse a un pH similar al del caldo en el biorreactor de fermentación, antes de devolverlo al biorreactor.

El succinato se puede recuperar del caldo de fermentación usando una serie de técnicas tales como la acidificación, electrodiálisis acoplada con cromatografía de intercambio iónico (Song y Lee, 2006, *Enzyme Microb Technol* 39, 352-361), precipitación con Ca(OH) acoplada con filtración y adición de ácido sulfúrico (Lee et al 2008, *Appl Microbiol Biotechnol* 79, 11-22), o extracción reactiva con agentes de extracción basados en amina tales como tri-n-octilamina (Huhet al, 2006, *Proc Biochem* 41, 1461-1465). Para todos los métodos es importante tener la forma de ácido libre, y no la sal. Sin embargo, la mayoría de los procedimientos de producción biotecnológicos para ácido succínico trabajan en el intervalo neutro o ligeramente ácido de pH 6-7. Dado el pKa del ácido succínico (pKa = 4,16 y 5,61), la mayor parte está presente como sal y no como el ácido libre en esas condiciones. Sin embargo, se sabe que *C. autoethanogenum* y los acetógenos carboxidotróficos toleran y crecen a un intervalo de pH convenientemente bajo de pH 4-6.

Los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina, se puede recuperar de forma relativamente fácil del caldo de fermentación por concentración (p. ej., ósmosis inversa) y cristalización o separación de la biomasa (p. ej., ultrafiltración o centrifugación) y cromatografía de intercambio iónico (Ikeda, A., 2003, *Amino Acid Production Processes*, en R. Faurie y J. Thommel (eds.) *Microbial production of L-amin acids*, 1-35).

El lactato, formiato, 2-oxoglutarato y otros productos se pueden recuperar del caldo de fermentación por cualquier método conocido. Sin embargo, a modo de ejemplo, en el caso del lactato, el proceso de fermentación convencional produce precipitado de lactato de calcio, que se puede recoger y reacidificar. Alternativamente, se pueden usar técnicas de membrana, tal como electrodiálisis, para separar el lactato. Concentraciones bajas de lactato se pueden separar de un caldo de fermentación aplicando un potencial adecuado a través de una membrana selectiva permeable a iones. Otras técnicas adecuadas incluyen nanofiltración, en donde los iones monovalentes pueden pasar selectivamente a través de una membrana bajo presión.

Debe apreciarse que en algunas situaciones, el método se puede llevar a cabo para producir y recuperar productos distintos del etanol (por ejemplo, uno o más productos que comprenden valina, leucina, succinato, piruvato, lactato y formiato). Por consiguiente, debe entenderse que la invención incluye métodos para la producción de uno o más de estos productos.

Ejemplos:

La invención ahora se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1:

Eliminación del gen budA de *C. autoethanogenum* por recombinación homóloga

5 Se llevaron a cabo modificaciones genéticas usando un plásmido que contenía brazos de homología 5' y 3' del gen budA de *C. autoethanogenum* DSM23693 (Fig. 1-2). Este plásmido se metiló in vivo usando una nueva metiltransferasa y después se transformó en *C. autoethanogenum*, DSM23693 (DSMZ, Alemania). La inactivación del gen budA se ha mostrado por PCR y por la inhibición de la producción de 2,3-butanodiol en cepas de *C. autoethanogenum* DSM23693 ΔbudA.

10 Construcción del plásmido de expresión:

Se usaron técnicas de ADN recombinante y clonación molecular convencionales y se describen en Sambrook et al, 1989 y Ausubel et al, 1987. Las secuencias de ADN del brazo de homología flanqueador en la dirección 5' (SEQ ID 3) y brazo de homología flanqueador en la dirección 3' (SEQ ID 4) del gen budA de *Clostridium autoethanogenum*, DSM23693 se obtuvieron de NCBI.

15 El ADN genómico de *Clostridium autoethanogenum* DSM23693 se aisló usando el kit Purelink Genomic DNA mini kit de Invitrogen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Los brazos de homología flanqueadores 5' (SEQ ID 3) y 3' (SEQ ID 4) se amplificaron por PCR con los oligonucleótidos de la tabla 1 usando el ADN genómico de *Clostridium autoethanogenum* DSM23693 como molde, ADN polimerasa de alta fidelidad iProof High (Bio-Rad Laboratories) y el siguiente programa: desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 segundos, seguido de 25 ciclos de desnaturalización (98°C durante 10 segundos), reasociación (60°C durante 15 segundos) y elongación (72°C durante 30 segundos), antes de una etapa de extensión final (72°C durante 7 minutos).

Tabla 1: Oligonucleótidos para la clonación

Diana	Nombre del oligonucleótido	Secuencia de ADN (de 5' a 3')	SEQ ID NO:
Brazo de homología 5'	Og09f	attcatcctg cagg TTTCTTCACAGGAAAATATACTTCAG	5
Brazo de homología 5'	Og10r	gactg cggccgc ATTACATTCACCTCTATGTCATTATAAC	6
Brazo de homología 3'	Og11f	attg ctagc ACTAGACAGTGCTAATAACAATGTCTAG	7
Brazo de homología 3' Plásmido	Og12r	atatg gcgccc TCATAAACCTGGATAACATAAGC	8
	M13f	GTAAAACGACGGCCAG	10
Plásmido	M13r	CAGGAAACAGCTATGACC	11

25 El brazo de homología flanqueador 5' de 964 pb amplificado (5'HA) del gen budA se cortó con las enzimas de restricción Sbj1 y Not1 y se clonó en el vector transportador de *E. coli*-*Clostridium* pMTL 85141 (SEQ ID 9; FJ797651.1; Nigel Minton, University of Nottingham; Heap et al., 2009) usando los sitios de restricción Sbj1 y Not1 y la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan (Stratagene). El plásmido creado pMTL85141-budA-5'HA y el producto de la PCR de 977 pb del brazo de homología 3' del gen budA se cortaron ambos con NheI y Ascl. Una unión de estos fragmentos de ADN digeridos se transformó en *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan (Stratagene) dando como resultado el plásmido pMTL85141-budA-ko. El inserto en el plásmido resultante pMTL85141-budA-ko (SEQ_ID No 12) se secuenció completamente usando los oligonucleótidos dados en la tabla 1, y los resultados de secuenciación confirmaron que tanto el brazo de homología 5' como el 3' estaban exentos de mutaciones.

Metilación del ADN:

35 Se diseñó un gen de metiltransferasa híbrido condensado con un promotor lac inducible (SEQ ID NO: 31) por alineamiento de los genes de metiltransferasa de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* y *C. ragsdalei*, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 13/049.263. La expresión de la metiltransferasa produce una proteína

que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 32). El gen de metiltransferasa híbrido se sintetizó químicamente y se clonó en el vector pGS20 (ATG:biosynthetics GmbH, Merzhausen, Alemania- SEQ ID NO: 33) usando EcoRI. El plásmido de metilación resultante pGS20-metiltransferasa se transformó doblemente con el plásmido pMTL85141-budA-ko en XL1-Blue MRF⁺ Kan E. coli de restricción negativa (Stratagene). La metilación in vivo se indujo por adición de IPTG 1 mM y los plásmidos metilados se aislaron usando el kit Zymo mini prep Kit (Zymo). La composición de plásmidos metilados resultante se usó para la transformación de *C. autoethanogenum* DSM23693.

Transformación:

Durante el experimento de transformación completo, *C. autoethanogenum* DSM23693 se cultivó en medio YTF (tabla 2) en presencia de agentes de reducción y con 2,11 kg/cm² (30 psi) de gas residual de acería (recogido de la acería de Nueva Zelanda en Glenbrook, NZ; composición: 44% de CO, 32% de N₂, 22% de CO₂, 2% de H₂) a 37 °C usando técnicas anaerobias estándar descritas por Hungate (1969) y Wolfe (1971).

Tabla 2: Medio YTF

Componente del medio	por litro de solución madre
Extracto de levadura	10 g
Triptona	16 g
Cloruro sódico	0,2 g
Fructosa	10 g
Agua destilada	hasta 1 litro
solución madre de agente reductor	por 100 ml de solución madre
NaOH	0,9 g
Cisteína.HCl	4 g
Na ₂ S	4 g
Agua destilada	Hasta 100 ml

Para hacer cultivos competentes, se subcultivaron 50 ml de cultivo de *C. autoethanogenum* DSM23693 en medio YTF de nueva aportación durante 5 días consecutivos. Estas células se usaron para inocular 50 ml de medio YTF que contenía DL-treonina 40 mM con una DO_{600nm} de 0,05. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0,5, las células se incubaron sobre hielo durante 30 min y después se transfirieron a una cámara anaerobia y se recogieron a 4.700 x g y 4°C. El cultivo se lavó dos veces con tampón de electroporación enfriado con hielo (sacarosa 270 mM, MgCl₂ 1 mM, fosfato sódico 7 mM, pH 7,4) y finalmente se suspendió en un volumen de 600 µl de tampón de electroporación de nueva aportación. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación previamente enfriada con una separación de los electrodos de 0,4 cm, que contenía 2 µg de la mezcla de plásmidos metilados y 1 µl de inhibidor de restricción de tipo 1 (Epicentre Biotechnologies) y se aplicaron pulsos inmediatamente usando un sistema de electroporación Gene pulser Xcell (Bio-Rad) con los siguientes ajustes: 2,5 kV, 600 Ω y 25 µF. Se lograron constantes de tiempo de 3,7-4,0 ms. El cultivo se transfirió a 5 ml de medio YTF de nueva aportación. La regeneración de las células se controló a una longitud de onda de 600 nm usando un espectrofotómetro Spectronic Helios Epsilon (Thermo) equipado con un tubo de objetivo. Después de una disminución inicial en la biomasa, las células empezaron a crecer de nuevo. Una vez que la biomasa era el doble desde ese punto, aproximadamente 200 µl de cultivo se extendieron sobre placas de YTF-agar y placas de agar-PETC que contenían fructosa 5 g/l (Tabla 3) (ambas contenían agar Bacto™ al 1,2 % (BD) y tianfenicol 15 µg/ml). Después de 3-4 días de incubación con 2,11 kg/cm² (30 psig) de gas de acería a 37°C, se veían claramente 500 colonias por placa.

ES 2 583 203 T3

Tabla 3: Medio PETC (medio ATCC 1754; atcc.org/Attachments/2940.pdf)

Componente del medio	Concentración por 1,0 litro de medio
NH ₄ Cl	1 g
KCl	0,1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
CaCl ₂	0,02 g
Solución de metales traza	10 ml
Solución de vitaminas de Wolfe	10 ml
Extracto de levadura	1 g
Resazurina (2 g/l de cultivo madre)	0,5 ml
MES	2 g
Agente reductor	0,006-0,008 % (v/v)
Agua destilada	Hasta 1 litro, pH 5,5 (ajustada con HCl)
Solución de vitaminas de Wolfe	por litro de solución madre
Biotina	2 mg
Ácido fólico	2 mg
Hidrocloruro de piridoxina	10 mg
Tiamina.HCl	5 mg
Riboflavina	5 mg
Ácido nicotínico	5 mg
D-(+)-Pantotenato de calcio	5 mg
Vitamina B ₁₂	0,1 mg
Ácido p-aminobenzoico	5 mg
Ácido tióctico	5 mg
Agua destilada	hasta 1 litro

Solución de metales traza	por litro de solución madre
Ácido nitrilotriacético	2 g
MnSO ₄ .H ₂ O	1 g
Fe (SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ .6H ₂ O	0,8 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,02 g
Na ₂ SeO ₃	0,02 g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02 g
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	0,02 g
Agua destilada	hasta 1 litro
Solución madre de agente reductor	por 100 ml de solución madre
NaOH	0,9 g
Cisteína.HCl	4 g
Na ₂ S	4 g
Agua destilada	Hasta 100 ml

5 Las colonias se aplicaron en estriado sobre placas de agar-PETC de nueva aportación que también contenían fructosa 5 g/l y tianfenicol 15 µg/ml. Después de 2 días de incubación con 2,11 kg/cm² (30 psig) de gas de aceria a 37°C, se volvieron a aplicar en estriado colonias individuales de estas placas sobre placas de agar-PETC no selectivo de nueva aportación que contenían solo fructosa 5 g/l. La aplicación en estriado sobre placas de agar-PETC con fructosa 5 g/l se repitió una vez más y las placas se incubaron con 2,11 kg/cm² (30 psig) de gas de aceria a 37°C. Después de 3 días, en 6 colonias individuales que crecían en medio no selectivo, se inocularon 2 ml de medio líquido PETC que contenía fructosa 5 g/l. Cuando se produjo el crecimiento, se aumentó secuencialmente la escala del cultivo a 5 ml, 25 ml y después a 50 ml de medio PETC que contenía fructosa 5 g/l y 2,11 kg/cm² (30 psig) de gas de aceria como fuente de carbono.

10 Conformación de la transformación satisfactoria:

15 C. autoethanogenum: Para verificar la identidad de las seis colonias y la transferencia de ADN, se aisló ADN genómico de las 6 colonias/clon en medio líquido PETC usando el kit Purelink™ Genomic DNA mini kit (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos ADN genómicos junto con los de C. autoethanogenum DSM23693 de tipo natural se usaron como molde en la PCR. La PCR se llevó a cabo con la ADN polimerasa de alta fidelidad iproof (Bio-Rad Laboratories), los cebadores citados en la tabla 4 y el siguiente programa: desnaturalización inicial a 98 °C durante 2 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturalización (98°C durante 10 segundos), reasociación (61°C durante 15 segundos) y elongación (72°C durante 90 segundos), antes de una etapa de extensión final (72°C durante 7 minutos). El ADN genómico de C. autoethanogenum DSM23693 de tipo natural se usó como molde en la PCR de control.

20

Tabla 4: Oligonucleótidos para la confirmación por PCR del plásmido y especie

Región diana	Nombre del oligonucleótido	Secuencia de ADN (de 5' a 3')	SEQ ID NO:
gen de ARNr 16s	fD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	27
gen de ARNr 16s	rP2	CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT	28
Brazo de homología	Og09f	attcatcctgcagg TTTCTTCACAGGAAAATATACTTCAG	5
Brazo de homología	Og12r	at atggcgcgcc TCATAAACCTGGATAACATAAGC	8
gen budA	Og44f	TTGCTGTAGTCACTGAACTGGAAAA	29
gen budA	Og45r	AATCAGGACACCTAAATCCAACCAC	30

5 Para confirmar la identidad de los 6 clones, la PCR se llevó a cabo contra el gen de ARNr 16s, usando los cebadores fD1 (SEQ ID 27) y rP2 (SEQ ID 28) y usando las condiciones de PCR descritas antes. Los productos de la PCR se purificaron usando el kit Zymo Clean and Concentrator™ y se secuenciaron usando el kit rP2 (SEQ ID 28). Las secuencias de los 6 clones (SEQ ID 13-19) mostraron al menos 90% de identidad contra el gen de ARNr 16S de *C. autoethanogenum* (SEQ ID 15; Y18178, GI:7271109).

10 La PCR de 6 clones analizados, con cebadores específicos para la región diana de budA usando los cebadores Og09f (SEQ ID 5) y Og12r (SEQ ID 8) dieron lugar a la amplificación del fragmento de ADN de 2,2 kb a partir de 5 de los 6 clones. El producto de la PCR de 2,7 kb se amplificó con el ADN genómico de *C. autoethanogenum* DSM23693 de tipo natural. La identidad de los productos de la PCR de 2,2 kb a partir de potenciales clones con inactivación de budA se confirmó por secuenciación (SEQ ID 20-26) con cebadores citados en la tabla 5 y no se detectó en estos fragmentos la secuencia del gen budA. El fragmento de ADN de lacZ tenía sustituido el gen budA.

15 La ausencia del gen budA en estos 6 clones se confirmó de nuevo por PCR, con los cebadores Og44f (SEQ ID 29) y Og45r (SEQ ID 30) específico de la región interna de 275 pb del gen de budA de *C. autoethanogenum* DSM23693 que se amplificó solo a partir de *C. autoethanogenum* DSM23693 de tipo natural.

Ausencia de producción de 2,3-butanodiol y aumento del rendimiento de etanol:

20 Para demostrar la falta de acetoína y posteriormente de producción de 2,3-butanodiol, se llevaron a cabo experimentos en botella de suero con el clon 1 por triplicado con gas residual de aceria (composición, 44% de CO₂, 32% de N₂, 22% de CO₂ y 2% de H₂; recogido de una aceria en Glenbrook, New Zealand) y medio PETC como se ha descrito antes. La cepa de tipo natural no modificada de *C. autoethanogenum* DSM23693 se cultivó en las mismas condiciones que el control.

25 El análisis de metabolitos se llevó a cabo por HPLC usando un sistema de HPLC Agilent 1100 Series con un RID operado a 35°C (detector de índice de refracción) y una columna de ácido orgánico Alltech IOA-2000 (150 x 6,5 mm, tamaño de partículas 5 µm) mantenida a 32°C. Se usó agua ligeramente acidificada (H₂SO₄ 0,005 M) como fase móvil, con un caudal de 0,25 ml/min. Para separar las proteínas y otros residuos celulares, se mezclaron muestras de 400 µl con 100 µl de un ácido 5-sulfosalicílico al 2% (p/v) y se centrifugó a 14.000 x g durante 3 min para separar los restos precipitados. Después se inyectaron 10 µl del líquido sobrenadante en el HPLC para el análisis.

30 Los resultados de los experimentos de la botella de suero con el clon 1 de ΔbudA de *C. autoethanogenum* DSM23693 y *C. autoethanogenum* DSM23693 de tipo natural no modificado, se muestran en la tabla 5. La biomasa máxima de la cepa de *C. autoethanogenum* DSM23693 ΔbudA era con una DO_{600nm} de 0,32 relativamente menor que la de tipo natural no modificada, que creció con una DO_{600nm} de 0,58. Comparado con el tipo natural, no se detectó 2,3-butanodiol en el cultivo del clon 1 de *C. autoethanogenum* DSM23693 ΔbudA, y el rendimiento del etanol era significativamente mayor en el clon 1 de *C. autoethanogenum* DSM23693 ΔbudA que en *C. autoethanogenum* DSM23693 de tipo natural no modificado (Tabla 5).

35

Tabla 5: Metabolitos producidos por el clon 1 de *C. autoethanogenum* DSM23693 Δ budA y *C. autoethanogenum* DSM23693 de tipo natural no modificado, respecto a la biomasa

Metabolito (g/l)	Medio	Tipo natural	Clon 1 de Δ budA
Etanol	1,395	2,500	
Ácido acético	2,296	0,180	
2,3-Butanodiol	0,085	0,000	
Ácido láctico	0,020	0,197	
Ácido fórmico	0,002	1,647	
Ácido succínico	0,002	0,344	

Producción de otros metabolitos - lactato, formiato, succinato, 2-oxoglutarato, valina, leucina, isoleucina:

- 5 Al mismo tiempo, es interesante que mientras que *C. autoethanogenum* DSM23693 no modificado producía solo 0,02 g/l de ácido láctico como subproducto, *C. autoethanogenum* DSM23693 Δ budA producía una cantidad significativamente mayor de ácido láctico 0,07g/l (0,197 g/l normalizado respecto a la biomasa) así como 0,53 g/l (1,647 g/l normalizado respecto a la biomasa) de ácido fórmico 0,13 g/l (0,344 g/l normalizado respecto a la biomasa) de ácido succínico (tabla 5). Este aumento probablemente es por la acumulación de piruvato, precursor temprano del 2,3-butanodiol (figura 1) debido a la inactivación del gen budA que había bloqueado la producción de 2,3-butanodiol.

15 La producción de succinato y lactato por *C. autoethanogenum* DSM23693 Δ budA también se confirmó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Para esto, aproximadamente 2,5 ml de cultivo de clon 1 de *C. autoethanogenum* DSM23693 Δ budA cultivado en gas residual de acería (composición, 44% de CO, 32% de N₂, 22% de CO₂ y 2% de H₂; recogido de una acería en Glenbrook, Nueva Zelanda) con una densidad óptica de 0,32, se centrifugaron y el líquido sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 μ M (Smart KF, Aggio RB, Van Houtte JR, Villas-Bôas SG, "Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry", *Nat Protoc.* 2010 Sep;5(10):1709-29. 2010). Se procesaron de forma similar aproximadamente 0,65 ml de cultivo de *C. autoethanogenum* DSM23693 de tipo natural y 2,5 ml de blanco de medio. Las muestras se liofilizaron y se analizaron por GC-MS por triplicado en la Universidad de Auckland. Como se ve en la tabla 6, la intensidad de los picos de la señal de succinato y lactato era más fuerte en el clon 1 de *C. autoethanogenum* DSM23693 Δ budA comparado con *C. autoethanogenum* DSM23693 no modificado y el blanco de medio de control. Los resultados de GC-MS para el succinato y el lactato estaban de acuerdo con los resultados por HPLC.

25 Los resultados del análisis por GC-MS (tabla 6) no solo confirmaron la producción de lactato y succinato con el clon 1 de *C. autoethanogenum* DSM23693 Δ budA, sino que también muestran la producción de 2-oxoglutarato, el otro producto final del ciclo de TCA incompleto además del succinato, y de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina, isoleucina, que son producidos a partir de piruvato y acetolactato, los precursores del 2,3-butanodiol que es probable que estén presentes en niveles elevados en la cepa de *C. autoethanogenum* Δ budA. Los productos intermedios del ciclo de TCA tales como malato, fumarato, citrato, cis-aconitato, iso-citrato no se han analizado, pero es probable que sean elevados, puesto que se ha encontrado que se han producido los productos finales succinato y 2-oxoglutarato (figura 1b).

ES 2 583 203 T3

Tabla 6: Análisis de metabolitos del clon 1 de *C. autoethanogenum* DSM23693 Δ budA (Δ budA) y de *C. autoethanogenum* DSM23693 de tipo natural (Tipo natural) por GC-MS. Se incluyó el medio en el análisis como control. Los valores dados en la tabla corresponden a la intensidad de los picos normalizada obtenida para cada repetición (R). ND = no detectado.

Metabolito	Medio			Promedio			
Lactato	0,547053273	0,474988	0,431645	0,48			
Succinato	1,036264929	0,960478	1,243932	1,08			
2-Oxoglutarato	ND	ND	ND	0,00			
Valina	5,970408365	5,446962	5,937764	5,79			
Leucina	3,418425725	3,154261	3,237803	3,27			
Isoleucina	ND	ND	0,607184	0,20			
Metabolito	Tipo natural			Promedio			
Lactato	0,801302932	0,691344	0,853559	0,78			
Succinato	0,547053273	0,474988	0,431645	0,48			
2-Oxoglutarato	ND	0,003092	0,0028	0,00			
Valina	0,018545724	0,011764	0,014182	0,01			
Leucina	0,0307755	0,024291	0,023099	0,03			
Isoleucina	0,008136206	0,005305	0,00643	0,01			
Metabolito	Clon 1 de Δ budA (Muestra 1)			Clon 2 de Δ budA (Muestra 2)			Promedio
Lactato	5,017350825	5,672474	5,237064	5,987887	5,138095	4,39521	5,24
Succinato	2,535447097	2,984226	2,516218	5,017351	5,672474	5,237064	3,99
2-Oxoglutarato	0,522265764	0,462277	ND	1,22281	0,021205	ND	0,37
Valina	11,13216958	9,419048	7,824351	10,08887	10,66202	9,192138	9,72
Leucina	10,92981831	5,478571	4,497006	4,70419	11,36585	4,441235	6,90
Isoleucina	6,087638048	9,397619	0,895459	10,59162	2,912456	9,976735	6,64

La producción de acetoina y 2,3-butanodiol normalmente está asociada con la desacidificación de ácido pirúvico fuerte (Xiao, Z., y P. Xu. 2007. "Acetoin metabolism in bacteria". *Crit. Rev. Biochem. Microbiol.* 33:127-140), lo que supone una amenaza grave para la célula destruyendo el gradiente de pH y protones interno necesario para la conservación de energía. Tanto la acetoina como el 2,3-butanodiol son compuestos de pH neutro. La producción de 2,3-butanodiol también sirve como sumidero de electrones para descargar equivalentes de reducción sobrantes producidos durante el proceso de fermentación.

5 Sin querer estar limitados por ninguna teoría particular, los autores de la invención creen que mediante la inactivación génica de la producción de acetoina y 2,3-butanodiol, la célula necesita encontrar otros caminos para desacidificar el ácido pirúvico (pKa = 2,50) y descargar equivalentes reductores y por lo tanto cambia su metabolismo a la producción de otros productos (nuevos) tales como los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina o isoleucina, succinato (pKa1 = 4,20, pKa2 = 5,60), ácido láctico (pKa = 3,86), y ácido fórmico (pKa = 3,77). La producción de ácido succínico también da la oportunidad de descargar 4 equivalentes de reducción, mientras que se pueden descargar 2 equivalentes de reducción por la producción de ácido láctico.

Ejemplo 2: Ruta del succinato

10 La ruta para la producción del succinato se describe en la figura 1b. Se identificaron los respectivos genes en *Clostridium autoethanogenum* y se demostró la actividad enzimática.

15 En una primera etapa, el piruvato se convierte en malato, directamente catalizado por una enzima málica o por oxaloacetato catalizado por una malato deshidrogenasa. El oxaloacetato (OAA) se puede producir a partir del piruvato por acción de una piruvato carboxilasa, o por el fosfoenolpiruvato (PEP) en una conversión en dos etapas catalizada por la piruvatofosfato diquinasa (PPDK) y PEP carboxiquinasa (PCK). Posteriormente el malato se convierte en succinato en un proceso de dos etapas catalizado por la fumarato hidratasa y la fumarato reductasa. Se identificaron los respectivos genes en *C. autoethanogenum* y genes homólogos presentes en otros acetógenos carboxidotróficos como *C. ljungdahlii* y *C. ragsdalei* (tabla 7).

Tabla 7: Genes y enzimas identificados que están implicados en la producción de succinato

	<i>C. autoethanogenum</i>	<i>C. ljungdahlii</i>	<i>C. ragsdalei</i>
Enzima málica 1	SEQ ID 38-39	CP001666.1 ADK13498.1	CLJU_c04160; SEQ ID 60-61
Enzima málica 2	SEQ ID 40-41	CP001666.1 ADK16871.1	CLJU_c38460;
Malato deshidrogenasa	SEQ ID 42-43	CP001666.1 ADK13674.1	CLJU_c05920; SEQ ID 62-63
Piruvato fosfato diquinasa (PPDK)	SEQ ID 44-45	CP001666.1 ADK13882.1	CLJU_c08140; SEQ ID 64-65
Piruvato carboxilasa (PYC)	SEQ ID 46-47	CP001666.1 ADK16765.1	CLJU_c37390; SEQ ID 66-67
PEP carboxiquinasa (PCK)	SEQ ID 48-49	CP001666.1 ADK13703.1	CLJU_c06210; SEQ ID 68-69
Fumarato hidratasa subunidad A	SEQ ID 50-51	CP001666.1 ADK17084.1	CLJU_c40600; SEQ ID 70-71
Fumarato hidratasa subunidad B	SEQ ID 52-53	CP001666.1 ADK17083.1	CLJU_c40590; SEQ ID 72-73
Fumarato reductasa 1, flavoproteína	SEQ ID 54-55	CP001666.1 ADK15338.1	CLJU_c22800; SEQ ID 74-75
Fumarato reductasa 2, flavoproteína	SEQ ID 56-57	CP001666.1 ADK16073.1	CLJU_c30250; -
Fumarato reductasa 3, flavoproteína	SEQ ID 58-59	CP001666.1 ADK13935.1	CLJU_c08670; SEQ ID 76-77

20 Ensayo de actividades enzimáticas:
Se recogieron células (*Clostridium autoethanogenum*) en la fase exponencial de crecimiento anaerobio. Se

5 cultivaron ($A_{600} \sim 0,45$), y se sedimentaron a $8000 \times g$, 4°C durante 10 min. El líquido sobrenadante se descartó, y el sedimento se lavó dos veces en tampón de lavado (Tris-HCl 0,1 M, ditioneitol 10 mM (DTT), pH 6,5, 4°C). Finalmente, el sedimento se volvió a suspender en tampón de lavado que contenía inhibidor de proteasa y se mezcló con 1,44 g de perlas de zirconia (Ambion RiboPure Bacteria Kit). Los tubos se enfriaron sobre hielo durante 5 min antes de rotura en una mezcladora vorticial con un adaptador de vórtice (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Inc.) a lo largo de 5 ciclos de 1 min golpeando a 3200 rpm seguido de 1 min sobre hielo entre ciclos. Después de lisis, la muestra se centrifugó ($13.000 \times g$, 4°C durante 10 min), y el líquido sobrenadante se dividió en partes alicuotas y se almacenó a -80°C hasta el análisis.

10 Todos los análisis se basaron en la oxidación del NADH a NAD ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en condiciones aerobias en una cubeta con una longitud de paso de 1 cm. Las actividades enzimáticas se obtuvieron a partir de tres repeticiones de al menos dos extracciones celulares independientes. El contenido de proteína de los extractos se determinó usando un kit comercial (Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible, Thermo Scientific). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que podría convertir un nanomol de sustrato en producto por minuto por mg de proteína total.

15 La actividad de la malato deshidrogenasa se midió por espectrofotometría después de oxidación de nucleótidos de piridina reducidos con oxaloacetato (OAA) (Sridhar J. et al, 2000, "Elucidation of enzymes in fermentation pathways used by *Clostridium thermosuccinogenes* growing on inulin". *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 246-51). La mezcla de reacción contenía lo siguiente: Tris-Cl 0,1 M a pH 6,5, DTT 10 mM, NADH 0,15 mM, fumarato 5 mM, NADH 0,3 mM y extracto exento de células. La reacción se inició por la adición de OAA y se controló a temperatura ambiente. La actividad específica de esta enzima en extractos exentos de células de *Clostridium autoethanogenum* se midió a $160 \pm 17 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$. Esta actividad era comparable con la malato deshidrogenasa encontrada en *Clostridium thermosuccinogenes* medido a 37°C (Sridhar J. et al, 2000, "Elucidation of enzymes in fermentation pathways used by *Clostridium thermosuccinogenes* growing on inulin". *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 246-51).

20 La actividad de la fumarato reductasa se midió basándose en la conversión de fumarato en succinato (Sridhar J. et al, 2000, "Elucidation of enzymes in fermentation pathways used by *Clostridium thermosuccinogenes* growing on inulin". *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 246-51). La mezcla de reacción contenía lo siguiente: Tris-Cl 0,1M a pH 6,5, DTT 10 mM, NADH 0,15 mM, fumarato 5 mM y extracto exento de células. La reacción se inició por la adición de fumarato y se controló a temperatura ambiente. La actividad específica de esta enzima en extractos exentos de células de *Clostridium autoethanogenum* se midió a $17,3 \pm 1,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

25 Los ensayos confirmaron que *Clostridium autoethanogenum* tiene actividad de malato deshidrogenasa, fumarato reductasa/succinato deshidrogenasa

30 Como se describe en la presente memoria, la invención proporciona microorganismo y métodos que permiten la mayor producción de etanol por fermentación microbiana de sustratos que comprenden monóxido de carbono. También proporciona la producción de succinato. No ha habido publicaciones previas sobre la producción de succinato por acetógenos, sin hablar de acetógenos carboxidotróficos. El potencial para producir succinato por fermentación microbiana puede tener una serie de ventajas frente a los métodos de producción petroquímicos actuales. Los microorganismos también producen formiato y aminoácidos de cadena ramificada que se han descrito previamente como productos de fermentación por microorganismos acetógenos.

35 El succinato se usa como una plataforma química en masa para la producción de una serie de compuestos químicos industriales que incluyen el 1,4-butanodiol, tetrahidrofurano, gamma-butirolactona, disuccinato de etilendiamina, succinato de dietilo y ácido adípico. El formiato se usa en la conservación de alimentos animales y en los procedimientos de curtido de cuero, así como una solución blanqueante en la industria de la pasta papelera y el papel. Los aminoácidos de cadena ramificada tienen una serie de usos en biotecnología industrial.

40 Los microorganismos de la invención también producen uno o más de otros productos. El uso de esos productos se ha descrito en otra parte en la presente memoria.

45 Ejemplo 3: Inactivación insercional basada en intrones del grupo II de genes implicados en la biosíntesis de 2,3-BDO en *C. autoethanogenum* DSM23693

Diseño y construcción de construcciones ClosTron que se dirigen a los genes budA y 2,3bdh:

50 Los genes de la acetolactato descarboxilasa (budA) y 2,3-butanodiol deshidrogenasa (2,3-bdh) implicados en la producción de 2,3-butanodiol en *C. autoethanogenum* DSM23693 se inactivaron usando la herramienta de alteración de genes mediada por intrones del grupo II ClosTron (Heap et al., 2010). El algoritmo de Perutka que se encuentra en ClosTron.com se usó para identificar el sitio diana del intrón del grupo II entre las bases 450 / 451 y 468 / 469 en la cadena codificante de los genes budA y 2,3-bdh, respectivamente. Se usó el mismo algoritmo para diseñar las regiones directoras del intrón (SEQ ID 82 y 83) que fue sintetizado comercialmente por DNA2.0 y se suministró en el vector pMTL007C-E5. Los vectores finales, pMTL007C-E5-budA-450!451s y pMTL007C-E5-2,3bdh-468!469s, contienen un marcador ermB activado por retro-transposición (RAM) que confiere resistencia al antibiótico claritromicina tras la inserción en el sitio diana.

Los plásmidos pMTL007C-E5-budA-450!451s y pMTL007C-E5-2,3bdh-468!469s se introdujeron en *C. autoethanogenum* DSM23693 por conjugación con la cepa de *E. coli* donadora CA434 como donador. Brevemente, la cepa donadora se cultivó durante la noche en medio LB complementado con cloranfenicol 25 µg/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Se recogieron células de 1,5 ml de cultivo y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato. El sedimento de células donadoras se volvió a suspender en 200 µl de cultivo del receptor en crecimiento exponencial *C. autoethanogenum* DSM23693. La mezcla se aplicó como manchas puntuales sobre medio de agar-PETC complementado con fructosa y se incubó a 37°C en una jarra de gas presurizado. Después de 24 horas, las células se recortaron y se volvieron a suspender en 500 µl de caldo de PETC y se extendieron sobre medio agar-PETC complementado con tiamfenicol 15 µg/ml (Sigma) y trimetoprim 10 µg/ml (Sigma). Los transconjugados de *C. autoethanogenum* se seleccionaron usando tiamfenicol 15 µg/ml y la cepa de *E. coli* CA434 se contraseleccionó usando trimetoprim 10 µg/ml. Se observaron colonias después de 3 días de incubación a 37°C en jarras de gas presurizadas.

Se aplicaron en estriado secuencialmente colonias individuales primero sobre medio PETC-MES que contenía tiamfenicol 15 µg/ml y trimetoprim 10 µg/ml seguido de sobre placas de agar con medio PETC que contenía claritromicina 5 µg/ml. Se cribaron aleatoriamente 4 colonias por plásmido para la inserción de intrón del grupo II por PCR usando cebadores Og44f (SEQ ID 29) y Og45r (SEQ ID 30), que flanquean el sitio de inserción del intrón del grupo II en el gen budA, y cebadores Og42f (SEQ ID 84) y Og43r (SEQ ID 85), que flanquean el sitio de inserción del intrón del grupo II en el gen 2,3-bdh. Se usó el kit Maxime PCR PreMix Kit para la PCR. También se amplificó por PCR el ADNr 16s usando los cebadores fd1 (SEQ ID 27) y rP2 (SEQ ID.28) y el kit Maxime PCR PreMix Kit.

Confirmación de la alteración de los genes budA y 2,3bdh usando la herramienta de inactivación insercional del grupo II ClosTron:

La amplificación de productos por PCR de 273 y 375 pb con los cebadores Og44f /Og45r y Og42f / Of43r indica los genes budA y 2,3-bdh de tipo natural no modificados, respectivamente. La amplificación de productos por PCR de ~2 kb usando el mismo conjunto de cebadores indica la inserción del intrón del grupo II ClosTron en los genes diana. En el caso de clones que se dirigen al gen budA, los clones 1 y 3 tienen bandas del tamaño esperado. El clon 4 parece que es una mezcla con el gen tanto de tipo natural como alterado (figura 6). Los 4 clones que se dirigieron al gen 2,3-bdh aparecieron positivos para la alteración de genes como se ve por la amplificación del producto de PCR de ~2 kb (Figura 6). Estos resultados confirman la alteración de los genes budA y 2,3-bdh en *C. autoethanogenum* DSM23693.

El producto de la PCR de ADNr 16s de los clones de Δ2,3bdh ClosTron 2 (SEQ ID 86 y 87) y 4 (SEQ ID 88 y 89) y clones de ΔbudA ClosTron 1 (SEQ ID 90 y 91) y 3 (SEQ ID 92 y 93) se confirmó por secuencia que eran de *C. autoethanogenum* DSM23693.

Por lo tanto, los autores de la invención han demostrado la alteración de genes diana en *C. autoethanogenum* DSM23693 acetógeno usando dos procedimientos diferentes - (i) la inactivación génica por recombinación homóloga, y (ii) la alteración génica usando la herramienta de inactivación insercional basada en intrones del grupo II.

Estudio de los mutantes ΔbudA y Δ2,3bdh ClosTron para la producción de 2,3BDO:

Los metabolitos de los mutantes ΔbudA y Δ2,3bdh que se cultivan en botellas de suero, se analizaron por HPLC (como se ha explicado antes). El mutante ΔbudA ClosTron como el mutante por inactivación ΔbudA no producían 2,3-BDO (Tabla 8). La alteración del gen budA por dos métodos diferentes en *C. autoethanogenum* confirma la función del gen budA en la biosíntesis de 2,3-BDO.

Tabla 8: Producción de metabolitos por los mutantes de *C. autoethanogenum* DSM23693 ΔbudA y Δ2,3bdh ClosTron

Metabolitos	ΔbudA		Δ2,3bdh	
	Clon 1	Clon 3	Clon 2	Clon 4
Etanol	0,09	0,08	0,37	0,23
Ácido acético	2,56	2,63	3,78	3,34
2,3-Butanodiol	0,0	0,0	0,01	0,01
Ácido láctico	0,0	0,0	0,0	0,0

El mutante Δ2,3bdh ClosTron todavía producía 2,3-BDO (tabla 8) indicando la participación de un segundo gen en la

conversión de la acetoína en 2,3-BDO.

Yan et al. han mostrado que una alcohol secundario deshidrogenasa de *C. beijerinckii* y otros tres organismos también pueden convertir la acetoína en 2,3-BDO (Yan, Lee y Liao, 2009). Un gen de alcohol secundario deshidrogenasa (SecAdh) similar se encuentra en *C. autoethanogenum* DSM23693 (SEQ ID 34 y 35), *C. ljungdahlii* (SEQ ID 36) y *C. ragsdalei* (SEQ ID 37).

En ausencia del gen 2,3-bdh en *C. autoethanogenum* DSM23693, la SecAdh convertiría lo más probablemente la acetoína en 2,3-BDO.

Función de una segunda deshidrogenasa en la conversión de acetoína en 2,3-BDO:

Para ensayar la función de un segundo gen en la conversión de acetoína en 2,3-BDO, *C. autoethanogenum* DSM23693 de tipo natural y el mutante $\Delta 2,3bdh$ ClosTron se alimentaron con acetoína 10 g/l en experimentos de fermentación.

Fermentación con el tipo natural y el mutante $\Delta 2,3bdh$ ClosTron:

Las fermentaciones se llevaron a cabo en biorreactores de 1,5 litros a 37°C y gas de aceria que contenía CO como única fuente de energía y carbono como se describe a continuación. Se usó un medio definido que contenía, por litro: MgCl₂, CaCl₂ (0,5 mM), KCl (2 mM), H₃PO₄ (5 mM), Fe (100 µM), Ni, Zn (5 µM), Mn, B, W, Mo, Se (2 µM) para el cultivo. El medio se transfirió al biorreactor y se trató en autoclave a 121°C durante 45 minutos. Después del tratamiento en autoclave, el medio se complementó con tiamina, pantotenato (0,05 mg), biotina (0,02 mg) y se redujo con cisteína-HCl 3 mM. Para lograr las condiciones anaerobias el recipiente de reacción se lavó con nitrógeno a través de un filtro de 0,2 µm. Antes de la inoculación, el gas se cambió a gas residual de aceria que contiene CO, con alimentación continua al reactor. La composición del gas de alimentación era 2% de H₂, 42% de CO, 20% de CO₂, 36% de N₂. El pH del cultivo se mantuvo entre 5 y 5,2. El flujo se ajustó inicialmente a 80 ml/min, aumentando a 200 ml/min durante la mitad de la fase exponencial, mientras que la agitación se aumentó de 200 rpm a 350. Se administró Na₂S al reactor a 0,25 ml/h. Una vez alcanzada la DO₆₀₀ de 0,5, el biorreactor se cambió a modo continuo a una velocidad de 1,0 ml/min (Velocidad de dilución 0,96 d⁻¹). Cuando el crecimiento era estable, el reactor se enriqueció con 10 g/l de mezcla racémica de acetoína. Se tomaron muestras de medio para medir la biomasa y los metabolitos por HPLC.

Los metabolitos se analizaron por HPLC regularmente hasta la desaparición de la acetoína. El *C. autoethanogenum* DSM23693 de tipo natural convirtió toda la acetoína en meso-BDO y 2,3-BDO en menos de 1 h (figura 7). La velocidad de conversión de la acetoína en meso-BDO y 2,3-BDO era relativamente lenta en el mutante $\Delta 2,3bdh$ ClosTron. El mutante $\Delta 2,3bdh$ ClosTron reducía 10 g/l de acetoína en más de 2 h. Estos resultados indican la función de una segunda deshidrogenasa para complementar la alteración del gen 2,3bdh, aunque a una velocidad más lenta.

Ejemplo 4: Cepa de *C. autoethanogenum* DSM23693 modificada que produce solo acetoína

La separación industrial de la acetoína del etanol es técnicamente más factible comparado con su producto corriente abajo el 2,3-BDO. Por lo tanto, es conveniente tener una cepa de *C. autoethanogenum* que produzca acetoína y no su forma reducida, el 2,3-BDO. Puesto que el mutante $\Delta 2,3bdh$ ClosTron todavía produce 2,3-BDO, es conveniente tener una cepa de *C. autoethanogenum* DSM23693 en la que estén alterados tanto los genes 2,3bdh como SecAdh. Esto se puede lograr de dos formas (a) recombinación homóloga, y (b) alteración de genes sin marcador usando la herramienta ClosTron como se explica en el ejemplo 1 y ejemplo 3.

(α) Doble inactivación génica $\Delta 2,3bdh \Delta SecAdh$ en la cepa *C. autoethanogenum* DSM23693 por recombinación homóloga:

Los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 94) y 3' (SEQ ID 95) de los genes 2,3bdh se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. autoethanogenum* DSM23693. Los cebadores Og13f (SEQ ID 96) / Og14r (SEQ ID 97) y Og15f (SEQ ID 98) / Og16r (SEQ ID 99) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios Sbf1/ Not1 y Nhe1/Asc1 para obtener pMTL85151-2,3bdh-KO. Este plásmido se introduce en *C. autoethanogenum* DSM23693 por conjugación o electroporación como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de 2,3bdh usando los cebadores Og33f (SEQ ID.100) y Og34r (SEQ ID.101) que flanquean los brazos de homología de 2,3bdh para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Se construye de forma similar el plásmido para la inactivación génica de SecAdh. Los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 102) y 3' (SEQ ID 103) de los genes SecAdh se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. autoethanogenum* DSM23693. Los cebadores Sec5f (SEQ ID 104) / Sec5r (SEQ ID 105) y Sec3f (SEQ ID 106) / Sec3r (SEQ ID 107) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios Sbf1/ Not1 y Nhe1/Asc1 para obtener pMTL85151-SecAdh-KO. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de

SecAdh usando los cebadores SecOf (SEQ ID.108) y SecOr (SEQ ID.109) que flanquean los brazos de homología del gen SecAdh para la PCR.

Una vez lograda la inactivación de los genes 2,3bdh o SecAdh en *C. autoethanogenum* DSM23693, el segundo gen en estos mutantes individuales se localiza usando los plásmidos pMTL85151-2,3bdh-KO o pMTL85151-SecAdh-KO. El plásmido se introduce en el mutante con una sola inactivación génica por electroporación o por conjugación como ya se ha descrito en el ejemplo 1 y 3. Se criban los transformantes con inactivación del segundo gen usando los cebadores que flanquean los brazos de homología de los genes correspondientes.

(b) Alteración génica doble Δ 2,3bdh Δ SecAdh usando ClosTron:

El casete de ermB RAM en la construcción de intrón del grupo II ClosTron está flanqueado por sitios de recombinación de flipasas (Frt). Mediante la introducción de flipasa recombinasa en el mutante Δ 2,3bdh ClosTron por conjugación o por electroporación, el marcador ermB RAM de ~1,3 kb se elimina del genoma del mutante y por lo tanto se recicla el marcador ermB. Se dejará un fragmento de ~0,8 kb del intrón del grupo II en el genoma. Esto se confirma por (i) ensayo de su susceptibilidad a la claritromicina, y (ii) por PCR con los cebadores que flanquean el sitio de inserción del intrón del grupo II, con los cebadores Og42f (SEQ ID 84) y Og43r (SEQ ID 85) y secuenciación del producto por PCR. Una vez que se ha obtenido el mutante Δ 2,3bdh ClosTron sin el marcador ermB RAM (Δ 2,3bdh-ermB ClosTron), se localiza el gen SecAdh en el mutante de una forma similar usando la herramienta de inactivación insercional del intrón del grupo II ClosTron. El sitio de inserción del intrón entre las bases 399 y 400 en la cadena codificante se identifica en el gen SecAdh usando el algoritmo Perutka que se encuentra en ClosTron.com y se ha diseñado el casete que dirige el intrón (SEQ ID 110). El casete que dirige el intrón es sintetizado comercialmente por DNA2.0 y se suministra en el vector pMTL007C-E2 como pMTL007C-E5-SecAdh-399!400s que se introduce en el mutante Δ 2,3bdh-ermB ClosTron por conjugación o electroporación. Los transformantes se seleccionan secuencialmente en placas de agar con tianfenicol y claritromicina y se criban por PCR con cebadores SecCTf (SEQ ID 111) y SecCTr (SEQ ID 112) como se ha explicado antes en el ejemplo 3.

El mutante con doble gen alterado Δ 2,3bdh Δ SecAdh de *C. autoethanogenum* DSM23693 se crea usando técnica de recombinación homóloga o por la herramienta de inactivación insercional de intrones del grupo II ClosTron, como se ha explicado en los párrafos anteriores.

La alteración de los genes 2,3bdh y SecAdh y la producción de acetoina, otros metabolitos y 2,3-BDO se confirma llevando a cabo ensayos de actividad enzimática para la conversión de acetoina en 2,3-BDO y también analizando los productos producidos por el mutante por HPLC, como se ha descrito previamente.

Ejemplo 5: Cepa de *C. autoethanogenum* DSM23693 modificada que produce menos o no produce 2,3-BDO

Como se muestra en la figura 1, el acetolactato es uno de los compuestos intermedios en la biosíntesis de 2,3-BDO y también es el precursor para la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada. La enzima acetolactato sintasa cataliza la reacción que conduce al acetolactato a partir de 2 moléculas de piruvato como sustratos. La enzima acetolactato sintasa se clasifica ampliamente en dos grupos; (i) la acetolactato sintasa anabólica está asociada con los genes implicados en la síntesis de los aminoácidos ramificados valina, isoleucina e leucina, y (ii) la acetolactato sintasa catabólica está asociada con la síntesis de 2,3-BDO (alsS; aminoácido - AEI90719.1 y ácido nucleico - HQ876013.1).

El genoma de *C. autoethanogenum* DSM23693 tiene 3 genes de acetolactato sintasa anabólica putativos, ilvC, ilvI e ilvB. Los ejemplos de secuencia de aminoácidos de *C. autoethanogenum* (AEI90719.1, AEI90730.1, AEI90731.1, AEI90713.1, AEI90714.1), *C. ljungdahlii* (ADK15104.1, ADK15104.1, ADK15105.1, ADK15400.1, ADK15400.1), y *C. ragsdalei* (AEI90734.1, AEI90734.1, AEI90735.1, AEI90727.1, AEI90727.1) y respectivas secuencias de ácidos nucleicos de *C. autoethanogenum* (HQ876013.1, HQ876023.1, HQ876021.1), *C. ljungdahlii* (CP001666.1 - CLJU_c38920, CLJU_c32420, CLJU_c20420-30), y *C. ragsdalei* (HQ876014.1, HQ876024.1, HQ876022.1) se obtienen de GenBank.

La alteración de los 4 genes de la acetolactato sintasa o cualquier combinación de estos 4 genes debería conducir a una disminución en la producción de acetoina y 2,3-BDO. Con el fin de asegurar el crecimiento de estos mutantes, el medio se complementa con tres aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina.

Como se describe en los ejemplos 1, 3 y 4, los mutantes sencillos de *C. autoethanogenum* DSM23693 alsS, ilvC, ilvI e ilvB se pueden crear por recombinación homóloga o usando la herramienta de mutagénesis de intrones del grupo II ClosTron.

Diseño de los casetes de inactivación génica alsS, ilvC, ilvI e ilvB:

Las construcciones de inactivación génica para los genes alsS, ilvC, ilvI e ilvB se diseñan como se ha explicado antes. Los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 113) y 3' (SEQ ID 114) del gen alsS se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. autoethanogenum* DSM23693. Los cebadores alsS5f (SEQ ID 115) / alsS5r (SEQ ID 116) y alsS3f (SEQ ID 117) / alsS3r (SEQ ID 118) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios SbfI/ NotI y

Nhe1/Asc1 para obtener pMTL85151-alsS-KO. Este plásmido se introduce en *C. autoethanogenum* DSM23693 por conjugación o electroporación como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de alsS usando los cebadores alsSO_f (SEQ ID 119) y alsSO_r (SEQ ID 120) que flanquean los brazos de homología de alsS para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Para la inactivación del gen ilvC, los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 121) y 3' (SEQ ID 122) del gen ilvC se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. autoethanogenum* DSM23693. Los cebadores ilvC5_f (SEQ ID 123) / ilvC5_r (SEQ ID 124) y ilvC3_f (SEQ ID 125) / ilvC3_r (SEQ ID 126) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios Sbf1/ Not1 y Nhe1/Asc1 para obtener pMTL85151-ilvC-KO. Este plásmido se introduce en *C. autoethanogenum* DSM23693 por conjugación o electroporación como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación génica de ilvC usando los cebadores ilvCO_f (SEQ ID 127) y ilvCO_r (SEQ ID 128) que flanquean los brazos de homología del gen ilvC, para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Para la inactivación del gen ilvI, los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 129) y 3' (SEQ ID 130) del gen ilvI se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. autoethanogenum* DSM23693. Los cebadores ilvI5_f (SEQ ID 131) / ilvI5_r (SEQ ID 132) y ilvI3_f (SEQ ID 133) / ilvI3_r (SEQ ID 134) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios Sbf1/ Not1 y Nhe1/Asc1 para obtener pMTL85151-ilvI-KO. Este plásmido se introduce en *C. autoethanogenum* DSM23693 por conjugación o electroporación como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se pueden cribar los transformantes con inactivación génica de ilvI usando los cebadores ilvIO_f (SEQ ID.135) y ilvIO_r (SEQ ID 136) que flanquean los brazos de homología del gen ilvI, para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Para la inactivación del gen ilvB, los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 137) y 3' (SEQ ID 138) del gen ilvB se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. autoethanogenum* DSM23693. Los cebadores ilvB5_f (SEQ ID 139) / ilvB5_r (SEQ ID 140) y ilvB3_f (SEQ ID 141) / ilvB3_r (SEQ ID 142) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios Sbf1/ Not1 y Nhe1/Asc1 para obtener pMTL85151-ilvB-KO. Este plásmido se introduce en *C. autoethanogenum* DSM23693 por conjugación o electroporación como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de ilvB usando los cebadores ilvBO_f (SEQ ID 143) y ilvBO_r (SEQ ID 144) que flanquean los brazos de homología del gen ilvB para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Una vez que se obtienen los mutantes con una sola inactivación génica, se localizan los otros 3 genes de acetolactato sintasa secuencialmente para crear un mutante que tenga los 4 genes de acetolactato sintasa eliminados. El crecimiento de estos mutantes puede ser auxótrofo para aminoácidos de cadena ramificada. La producción o falta de producción de acetoína, 2,3-BDO y otros metabolitos en estos mutantes, se puede analizar por HPLC, como se ha descrito para los ejemplos previos. Los ensayos de actividad enzimática con piruvato como sustrato y tiamina difosfato y dinucleótido de flavina y adenina como cofactores, se pueden llevar a cabo para confirmar la pérdida de actividad de acetolactato sintasa en estos mutantes (Tittmann, Vyazmensky, Hubner, Barak y Chipman, 2005; Vinogradov et al, 2006).

Diseño de casetes directores de intrones del grupo II ClosTron para los genes alsS, ilvC, ilvI e ilvB:

Los genes de *C. autoethanogenum* DSM23693 alsS, ilvC, ilvI e ilvB también se pueden alterar o inactivar usando la herramienta de alteración de genes mediada por intrones del grupo II ClosTron (Heap et al., 2010). Se usa el algoritmo Perutka que se encuentra en ClosTron.com para identificar el sitio diana de intrones del grupo II entre las bases 303/ 304, 228 / 229, 975 / 976 y 157 / 158 en la cadena codificante de alsS, ilvC, ilvI y en la cadena de sentido contrario de genes ilvB, respectivamente. También se pueden localizar otros sitios identificados por el algoritmo. Se ha usado el mismo algoritmo para diseñar las regiones que se dirigen intrones (alsS - SEQ ID 145; ilvC - SEQ ID 146; ilvI - SEQ ID 147 y ilvB - SEQ ID 148) que pueden ser sintetizadas comercialmente por DNA2.0 y suministradas en el vector pMTL007C-E2. Los vectores finales, pMTL007C-E2-alsS-303!304s, pMTL007C-E2-ilvC-228!229s, pMTL007C-E2-ilvI-975!976s y pMTL007C-E2-ilvB-157! 158a, contienen un marcador armB activado por retrotransposición (RAM) que confiere resistencia a la claritromicina tras inserción en el sitio diana. Estos plásmidos se introducen en *C. autoethanogenum* DSM23693 por conjugación o electroporación. Los transformantes se seleccionan secuencialmente en placas de agar con tianfenicol y claritromicina y se criban por PCR con cebadores alsSCT_f (SEQ ID 149) y alsSCT_r (SEQ ID 150), ilvCCT_f (SEQ ID 151) y ilvCCT_r (SEQ ID 152), ilvICT_f (SEQ ID 153) y ilvICT_r (SEQ ID 154) y ilvBCT_f (SEQ ID 155) y ilvBCT_r (SEQ ID 156) para la inactivación de los genes alsS, ilvC, ilvI e ilvB, respectivamente.

Una vez que se han obtenido los mutantes ClosTron con un solo gen alterado, se elimina el casete de ermB RAM del genoma de estos mutantes usando plásmidos pMTL que llevan un gen de flipasa que se introduce en el mutante por electroporación o por conjugación. Se criban los transformantes resultantes con pérdida del casete ermB ensayando su susceptibilidad a la claritromicina, y (ii) por PCR con los cebadores que flanquean el sitio de inserción

del intrón del grupo II con alsSCTf (SEQ ID 149) y alsSCTr (SEQ ID 150), ilvCCTf (SEQ ID 151) y ilvCCTr (SEQ ID 152), ilvICTf (SEQ ID 153) y ilvICTr (SEQ ID 154) y ilvBCTf (SEQ ID 155) y ilvBCTr (SEQ ID 156) en genes alsS, ilvC, ilvB1 y ilvB2, respectivamente, y por secuenciación adicional de este producto de la PCR.

5 Después de confirmar la pérdida del casete de ermB, los mutantes ClosTron como los mutantes por inactivación génica, se localizan secuencialmente para la inactivación de otros genes de acetolactato sintasa. En una descripción, estos mutantes ClosTron se cultivan en presencia de aminoácidos de cadena ramificada. La producción o falta de producción de acetoína, 2,3-BDO y otros metabolitos en estos mutantes, se puede analizar por HPLC, como se ha descrito en ejemplos previos. Se pueden llevar a cabo ensayos de actividad enzimática con piruvato como sustrato y difosfato de tiamina y dinucleótido de flavina y adenina como cofactores, par confirmar la pérdida de actividad de la acetolactato sintasa en estos mutantes (Tittman et al, 2005; Vinogradov et al, 2006).

Ejemplo 6: Alteración de genes de la ruta del 2,3-BDO en *C. ljungdhalii* y *C. ragsdalei*

15 La ruta para la producción del 2,3-BDO se conserva a través de los acetógenos que incluyen *C. autoethanogenum*, *C. ljungdhalii* y *C. ragsdalei*. Los genes alsS, ilvC, ilvB1, ilvB2, budA, 2,3bdh y SecAdh en los tres acetógenos comparten un alto grado de homología de la secuencia. Por lo tanto, estos genes se pueden modificar genéticamente para aumentar o disminuir la producción de 2,3-BDO en los tres acetógenos. El método para modificar genéticamente *C. ljungdhalii* por electroporación se ha descrito (Köpke et al., 2010) (PCT/NZ2011/000203). Los métodos de electroporación y conjugación que se han descrito antes para *C. autoethanogenum*, los puede aplicar cualquier experto en la técnica a *C. ragsdalei*.

20 Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos para los genes alsS, ilvC, ilvB1, ilvB2, budA y 2,3bdh de *C. ljungdhalii* y *C. ragsdalei* se pueden obtener de GenBank. Se proporcionan las secuencias de nucleótidos de *C. ljungdhalii* (SEQ ID 36) y *C. ragsdalei* (SEQ ID 37) SecAdh.

25 Los plásmidos de inactivación génica y ClosTron que se usaron para alterar los genes alsS, ilvC, ilvB1, ilvB2, budA, 2,3bdh y SecAdh por recombinación homóloga y la inactivación insercional basada en intrones del grupo II ClosTron en *C. autoethanogenum*, también se pueden usar para alterar los mismos genes en *C. ljungdhalii* y *C. ragsdalei*. Por ejemplo, se pueden introducir pMTL85141-budA-ko, pMTL007C-E5-budA-450!451s y pMTL007C-E5-2,3bdh-468!469s en *C. ljungdhalii* (explicado más adelante en el ejemplo 6a) y *C. ragsdalei* (explicado más adelante en el ejemplo 6b) por electroporación o conjugación, como se ha descrito antes para *C. autoethanogenum* en los ejemplos 1 y 3. Se pueden aplicar métodos de cribado de mutantes y caracterización similares en *C. ljungdhalii* y *C. ragsdalei*.

30 Ejemplo 6a: Alteración de los genes budA y 2,3bdh en *C. ljungdhalii* por recombinación homóloga y la herramienta de inactivación insercional basada en intrones del grupo II para la no producción o producción reducida de 2,3-BDO

Se introducen plásmidos pMTL85141-budA-ko en *C. ljungdhalii* por electroporación (Koepeke et al 2010). Los transformantes se seleccionan en placas de agar-PETC que contienen tianfenicol 15 µg/ml y se criban los que tienen inactivación de budA usando los cebadores Og44f (SEQ ID 29) y Og45r (SEQ ID 30)

35 Para las alteraciones de los genes budA y 2,3bdh en *C. ljungdhalii* usando la herramienta de inactivación insercional basada en intrones del grupo II ClosTron, se introducen los plásmidos pMTL007C-E5-budA-450!451s y pMTL007C-E5-2,3bdh-468!469s en *C. ljungdhalii* por conjugación. Se aplican en estriado secuencialmente colonias individuales después de conjugación, primero sobre medio agar-PETC que contenía tianfenicol 15 µg/ml y trimetoprim 10 µg/ml seguido de sobre placas de agar con medio PETC que contenía claritromicina 5 µg/ml. Se criban aleatoriamente colonias por plásmido para la inserción de intrón del grupo II por PCR usando cebadores Og44f (SEQ ID 29) y Og45r (SEQ ID 30), que flanquean el sitio de inserción del intrón del grupo II en el gen budA, y cebadores Og42f (SEQ ID 84) y Og43r (SEQ ID 85), que flanquean el sitio de inserción del intrón del grupo II en el gen 2,3-bdh.

Se analiza en los mutantes con inactivación génica y ClosTron de budA y 2,3bdh en *C. ljungdhalii* generados antes, la producción de 2,3-BDO y acetoína por HPLC y fermentación en biorreactores como se explica en los ejemplos 1 y 3.

45 Ejemplo 6b: Alteración de los genes budA y 2,3bdh en *C. ragsdalei* por recombinación homóloga y la herramienta de inactivación insercional basada en intrones del grupo II para la no producción o producción reducida de 2,3-BDO

50 Se introducen plásmidos pMTL85141-budA-ko en *C. ragsdalei* por electroporación como se ha descrito antes para *C. autoethanogenum* o *C. ljungdhalii*, por electroporación o conjugación. Los transformantes se seleccionan en placas de agar-PETC que contienen tianfenicol 15 µg/ml y se criban los que tienen inactivación de budA usando los cebadores Og44f (SEQ ID 29) y Og45r (SEQ ID 30)

55 Para las alteraciones de los genes budA y 2,3bdh en *C. ragsdalei* usando la herramienta de inactivación insercional basada en intrones del grupo II ClosTron, se introducen los plásmidos pMTL007C-E5-budA-450!451s y pMTL007C-E5-2,3bdh-468!469s en *C. ragsdalei* por conjugación. Se aplican en estriado secuencialmente colonias individuales después de conjugación, primero en medio agar-PETC que contenía tianfenicol 15 µg/ml y trimetoprim 10 µg/ml seguido de en placas de agar con medio PETC que contenía claritromicina 5 µg/ml. Se criban aleatoriamente colonias por plásmido para la inserción de intrón del grupo II por PCR usando cebadores Og44f (SEQ ID 29) y Og45r

(SEQ ID 30), que flanquean el sitio de inserción del intrón del grupo II en el gen budA, y cebadores Og42f (SEQ ID 84) y Og43r (SEQ ID 85), que flanquean el sitio de inserción del intrón del grupo II en el gen 2,3-bdh.

Se analiza en los mutantes con inactivación génica y ClosTron de budA y 2,3bdh en *C. ragsdalei* generados antes, la producción de 2,3-BDO y acetoína por HPLC y fermentación en biorreactores como se explica en los ejemplos 1 y 3.

5 Ejemplo 7: *C. ljungdahlii* modificado que produce solo acetoína

Como se ha explicado antes, la separación de la acetoína del etanol es técnicamente más factible comparado con el 2,3-BDO. Por lo tanto, es conveniente tener una cepa de *C. ljungdahlii* que produzca acetoína y no 2,3-BDO. Esto se logrará eliminando o alterando tanto los genes 2,3bdh como SecAdh de dos formas, como se explica en el ejemplo 6a: (a) recombinación homóloga, y (b) alteración de genes sin marcador usando la herramienta ClosTron.

10 (a) Doble inactivación génica de $\Delta 2,3bdh \Delta SecAdh$ en la cepa de *C. ljungdahlii* por recombinación homóloga:

Los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 94) y 3' (SEQ ID 95) de los genes 2,3bdh se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ljungdahlii*. Los cebadores Og13f (SEQ ID 96) / Og14r (SEQ ID 97) y Og15f (SEQ ID 98) / Og16r (SEQ ID 99) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios Sbf1/ Not1 y Nhe1/Asc1 para obtener pMTL85151-2,3bdh-KO. Este plásmido se introduce en *C. ljungdahlii* por conjugación o por electroporación como se describe en el ejemplo 6a anterior. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de 2,3bdh usando los cebadores Og33f (SEQ ID.100) y Og34r (SEQ ID.101) que flanquean los brazos de homología de 2,3bdh para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Se construye de forma similar el plásmido para la inactivación génica de SecAdh. Los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 102) y 3' (SEQ ID 103) de los genes SecAdh se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ljungdahlii*. Los cebadores Sec5f (SEQ ID 104) / Sec5r (SEQ ID 105) y Sec3f (SEQ ID 106) / Sec3r (SEQ ID 107) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios Sbf1/ Not1 y Nhe1/Asc1 para obtener pMTL85151-SecAdh-KO. Después de selección en placas de tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de SecAdh usando los cebadores SecOf (SEQ ID.108) y SecOr (SEQ ID.109) que flanquean los brazos de homología del gen SecAdh para la PCR.

Una vez lograda la inactivación de los genes 2,3bdh o SecAdh en *C. ljungdahlii*, el segundo gen en estos mutantes individuales se localiza usando los plásmidos pMTL85151-2,3bdh-KO o pMTL85151-SecAdh-KO. El plásmido se introduce en el mutante con una sola inactivación génica por electroporación o por conjugación como ya se ha descrito en el ejemplo 6a. Se criban los transformantes con inactivación del segundo gen usando los cebadores que flanquean los brazos de homología de los genes correspondientes.

(b) Alteración génica doble de $\Delta 2,3bdh \Delta SecAdh$ usando ClosTron en *C. ljungdahlii*:

El casete de ermB RAM en la construcción de intrones del grupo II ClosTron está flanqueado por sitios de recombinación de flipasas (Frt). Mediante la introducción de flipasa recombinasa en el mutante $\Delta 2,3bdh$ ClosTron por conjugación o por electroporación, el marcador ermB RAM de ~1,3 kb se elimina del genoma del mutante y por lo tanto se puede reciclar el marcador ermB. Se dejará un fragmento de ~0,8 kb del intrón del grupo II en el genoma. Esto se confirma por (i) ensayo de su susceptibilidad a la claritromicina, y (ii) por PCR con cebadores que flanquean el sitio de inserción del intrón del grupo II, con los cebadores Og42f (SEQ ID 84) y Og43r (SEQ ID 85) y secuenciación del producto por PCR. Una vez que se ha obtenido el mutante $\Delta 2,3bdh$ ClosTron sin el marcador ermB RAM ($\Delta 2,3bdh$ -ermB ClosTron), se localiza el gen SecAdh en el mutante de una forma similar usando la herramienta de inactivación insercional de intrones del grupo II ClosTron. El sitio de inserción del intrón entre las bases 399 y 400 en la cadena codificante se identifica en el gen SecAdh usando el algoritmo Perutka que se encuentra en ClosTron.com y se diseña el casete que dirige el intrón (SEQ ID 110). El casete que dirige el intrón es sintetizado comercialmente por DNA2.0 y se suministra en el vector pMTL007C-E2 como pMTL007C-E5-SecAdh-399!400s que se introduce en el mutante $\Delta 2,3bdh$ -ermB ClosTron por conjugación o electroporación. Los transformantes se seleccionan secuencialmente en placas de agar con tianfenicol y claritromicina y se criban por PCR con cebadores SecCTf (SEQ ID 111) y SecCTr (SEQ ID 112) como se ha explicado antes en el ejemplo 6a.

El mutante con doble alteración génica $\Delta 2,3bdh \Delta SecAdh$ de *C. ljungdahlii* se crea usando técnica de recombinación homóloga o por la herramienta de inactivación insercional de intrones del grupo II ClosTron, como se ha explicado en los párrafos anteriores.

50 La alteración de los genes 2,3bdh y SecAdh y la producción de metabolitos y 2,3-BDO se confirma llevando a cabo ensayos de actividad enzimática para la conversión de acetoína en 2,3-BDO y también analizando los productos producidos por el mutante por HPLC, como se ha descrito previamente.

Ejemplo 8: Cepa de *C. ljungdahlii* modificada que no produce o produce menos 2,3-BDO

Como se muestra en la figura 1, el acetolactato es uno de los compuestos intermedios en la biosíntesis de 2,3-BDO y también es el precursor para la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada. La enzima acetolactato sintasa cataliza la reacción que conduce al acetolactato a partir de 2 moléculas de piruvato como sustratos. La enzima acetolactato sintasa se clasifica ampliamente en dos grupos; (i) la acetolactato sintasa anabólica está asociada con los genes implicados en la síntesis de los aminoácidos ramificados valina, isoleucina e leucina, y (ii) la acetolactato sintasa catabólica está asociada con la síntesis de 2,3-BDO.

El genoma de *C. ljungdahlii* tiene 3 genes de acetolactato sintasa anabólica putativos, *ilvC*, *ilvI* e *ilvB* y 1 acetolactato sintasa catabólica, *alsS*. La secuencia de aminoácidos de ejemplo de *C. ljungdahlii* (ADK15104.1, ADK15104.1, ADK15105.1, ADK15400.1, ADK15400.1) y las respectivas secuencias de ácidos nucleicos de *C. ljungdahlii* (CP001666.1, CLJU_c38920, CLJU_c32420, CLJU_c20420-30) se obtienen de GenBank.

La alteración de los 4 genes de la acetolactato sintasa o cualquier combinación de estos 4 genes debería conducir a una disminución en la producción de acetoína y 2,3-BDO. Con el fin de asegurar el crecimiento de estos mutantes, el medio se complementa con tres aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina.

Como se describe en los ejemplos 6a y 7, los mutantes sencillos de *C. ljungdahlii* *alsS*, *ilvC*, *ilvI* e *ilvB* se pueden crear por recombinación homóloga o usando la herramienta de mutagénesis de intrones del grupo II CiosTron.

Diseño de los casetes de inactivación génica *alsS*, *ilvC*, *ilvI* e *ilvB*:

Las construcciones de inactivación génica para los genes *alsS*, *ilvC*, *ilvI* e *ilvB* se diseñan como se ha explicado antes.

Los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 113) y 3' (SEQ ID 114) del gen *alsS* se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ljungdahlii*. Los cebadores *alsS5f* (SEQ ID 115) / *alsSr* (SEQ ID 116) y *alsS3f* (SEQ ID 117) / *alsS3r* (SEQ ID 118) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios *Sbf1*/ *Not1* y *Nhe1*/*Asc1* para obtener pMTL85151-*alsS*-KO. Este plásmido se introduce en *C. ljungdahlii* por conjugación o por electroporación como se describe en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de *alsS* usando los cebadores *alsSO5f* (SEQ ID 119) y *alsSO3r* (SEQ ID 120) que flanquean los brazos de homología de *alsS* para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Para la inactivación del gen *ilvC*, los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 121) y 3' (SEQ ID 122) del gen *ilvC* se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ljungdahlii*. Los cebadores *ilvC5f* (SEQ ID 123) / *ilvC5r* (SEQ ID 124) y *ilvC3f* (SEQ ID 125) / *ilvC3r* (SEQ ID 126) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios *Sbf1*/ *Not1* y *Nhe1*/*Asc1* para obtener pMTL85151-*ilvC*-KO. Este plásmido se introduce en *C. ljungdahlii* por conjugación o por electroporación como se describe en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación génica de *ilvC* usando los cebadores *ilvCO5f* (SEQ ID 127) y *ilvCO3r* (SEQ ID 128) que flanquean los brazos de homología del gen *ilvC*, para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Para la inactivación del gen *ilvI*, los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 129) y 3' (SEQ ID 130) del gen *ilvI* se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ljungdahlii*. Los cebadores *ilvI5f* (SEQ ID 131) / *ilvI5r* (SEQ ID 132) y *ilvI3f* (SEQ ID 133) / *ilvI3r* (SEQ ID 134) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios *Sbf1*/ *Not1* y *Nhe1*/*Asc1* para obtener pMTL85151-*ilvI*-KO. Este plásmido se introduce en *C. ljungdahlii* por conjugación o por electroporación como se describe en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación génica de *ilvI* usando los cebadores *ilvIO5f* (SEQ ID.135) y *ilvIO3r* (SEQ ID 136) que flanquean los brazos de homología del gen *ilvI*, para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Para la inactivación del gen *ilvB*, los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 137) y 3' (SEQ ID 138) del gen *ilvB* se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ljungdahlii*. Los cebadores *ilvB5f* (SEQ ID 139) / *ilvB5r* (SEQ ID 140) y *ilvB3f* (SEQ ID 141) / *ilvB3r* (SEQ ID 142) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios *Sbf1*/ *Not1* y *Nhe1*/*Asc1* para obtener pMTL85151-*ilvB*-KO. Este plásmido se introduce en *C. ljungdahlii* por conjugación o por electroporación como se describe en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de *ilvB* usando los cebadores *ilvBO5f* (SEQ ID 143) y *ilvBO3r* (SEQ ID 144) que flanquean los brazos de homología del gen *ilvB* para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Una vez que se obtienen los mutantes con una sola inactivación génica, se localizan los otros 3 genes de acetolactato sintasa secuencialmente para crear un mutante que tenga los 4 genes de acetolactato sintasa eliminados. El crecimiento de estos mutantes puede ser auxótrofo para aminoácidos de cadena ramificada. La producción o falta de producción de acetoína, 2,3-BDO y otros metabolitos en estos mutantes, se puede analizar por HPLC, como se ha descrito para los ejemplos previos. Los ensayos de actividad enzimática con piruvato como

sustrato y tiamina difosfato y dinucleótido de flavina y adenina como cofactores, se pueden llevar a cabo para confirmar la pérdida de actividad de acetolactato sintasa en estos mutantes (Tittmann, Vyazmensky, Hübner, Barak y Chipman, 2005; Vinogradov et al, 2006).

Diseño de casetes directores de intrones del grupo II ClosTron para los genes *alsS*, *ilvC*, *ilvI* e *ilvB*:

5 Los genes de *C. ljungdahlii* *alsS*, *ilvC*, *ilvI* e *ilvB* también se pueden alterar o inactivar usando la herramienta de alteración de genes mediada por intrones del grupo II ClosTron (Heap et al., 2010). Se usa el algoritmo Perutka que se encuentra en ClosTron.com para identificar el sitio diana de intrones del grupo II entre las bases 303/ 304, 228 / 229, 975 / 976 y 157 / 158 en la cadena codificante de *alsS*, *ilvC*, *ilvI* y en la cadena de sentido contrario de genes *ilvB*, respectivamente. También pueden localizar otros sitios identificados por el algoritmo. Se ha usado el mismo algoritmo para diseñar las regiones que dirigen los intrones (*alsS* - SEQ ID 145; *ilvC* - SEQ ID 146; *ilvI* - SEQ ID 147 y *ilvB* - SEQ ID 148) que pueden ser sintetizadas comercialmente por DNA2.0 y suministradas en el vector pMTL007C-E2. Los vectores finales, pMTL007C-E2-*alsS*-303!304s, pMTL007C-E2-*ilvC*-228!229s, pMTL007C-E2-*ilvI*-975!976s y pMTL007C-E2-*ilvB*-157!158a, contienen un marcador *ermB* activado por retrotransposición (RAM) que confiere resistencia al antibiótico claritromicina tras la inserción en el sitio diana. Estos plásmidos se introducen en *C. ljungdahlii* por conjugación o por electroporación. Los transformantes se seleccionan secuencialmente en placas de agar con tianfenicol y claritromicina y se criban por PCR con cebadores *alsSCTf* (SEQ ID 149) y *alsSCTr* (SEQ ID 150), *ilvCCTf* (SEQ ID 151) y *ilvCCTr* (SEQ ID 152), *ilvICTf* (SEQ ID 153) y *ilvICTr* (SEQ ID 154) y *ilvBCTf* (SEQ ID 155) y *ilvBCTr* (SEQ ID 156) los que tienen inactivación de los genes *alsS*, *ilvC*, *ilvI* y *ilvB*, respectivamente.

20 Una vez que se han obtenido los mutantes ClosTron con un solo gen alterado, se elimina el casete de *ermB* RAM del genoma de estos mutantes usando plásmidos pMTL que llevan un gen de flipasa que se introduce en el mutante por electroporación o por conjugación. Se criban los transformantes resultantes con pérdida del casete *ermB* ensayando su susceptibilidad a la claritromicina, y (ii) por PCR con los cebadores que flanquean el sitio de inserción del intrón del grupo II con *alsSCTf* (SEQ ID 149) y *alsSCTr* (SEQ ID 150), *ilvCCTf* (SEQ ID 151) y *ilvCCTr* (SEQ ID 152), *ilvICTf* (SEQ ID 153) y *ilvICTr* (SEQ ID 154) y *ilvBCTf* (SEQ ID 155) y *ilvBCTr* (SEQ ID 156) en genes *alsS*, *ilvC*, *ilvB1* y *ilvB2*, respectivamente, y por secuenciación adicional de este producto de la PCR.

30 Después de confirmar la pérdida del casete de *ermB*, los mutantes ClosTron como los mutantes de inactivación génica, se localizan secuencialmente para la inactivación de otros genes de acetolactato sintasa. En una descripción, estos mutantes ClosTron se cultivan en presencia de aminoácidos de cadena ramificada. La producción o falta de producción de acetoína, 2,3-BDO y otros metabolitos en estos mutantes, se analiza por HPLC como se ha descrito en ejemplos previos y se estudia llevando a cabo ensayos de actividad enzimática con piruvato como sustrato y difosfato de tiamina y dinucleótido de flavina y adenina como cofactores, para confirmar la pérdida de actividad de acetolactato sintasa en estos mutantes (Tittmann et al., 2005; Vinogradov et al, 2006).

Ejemplo 9: *C. ragsdalei* modificado que produce solo acetoína

35 Como se ha explicado antes, la separación de la acetoína del etanol es técnicamente más factible comparado con el 2,3-BDO. Por lo tanto, es conveniente tener una cepa de *C. ragsdalei* que produzca acetoína y no 2,3-BDO. Esto se logrará eliminando o alterando tanto los genes *2,3bdh* como *SecAdh* de dos formas, como se explica en el ejemplo 6b: (a) recombinación homóloga, y (b) alteración de genes sin marcador usando la herramienta ClosTron.

(a) Cepa de *C. ragsdalei* con doble inactivación génica $\Delta 2,3bdh \Delta SecAdh$ por recombinación homóloga:

40 Los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 94) y 3' (SEQ ID 95) de los genes *2,3bdh* se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ragsdalei*. Los cebadores *Og13f* (SEQ ID 96) / *Og14r* (SEQ ID 97) y *Og15f* (SEQ ID 98) / *Og16r* (SEQ ID 99) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios *Sbf1*/ *Not1* y *Nhe1*/*Asc1* para obtener pMTL85151-2,3bdh-KO. Este plásmido se introduce en *C. ragsdalei* por conjugación o por electroporación como se describe en el ejemplo 6b anterior. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de *2,3bdh* usando los cebadores *Og33f* (SEQ ID.100) y *Og34r* (SEQ ID.101) que flanquean los brazos de homología de *2,3bdh* para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

50 Se construye de forma similar el plásmido para la inactivación génica de *SecAdh*. Los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 102) y 3' (SEQ ID 103) de los genes *SecAdh* se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ragsdalei*. Los cebadores *Sec5f* (SEQ ID 104) / *Sec5r* (SEQ ID 105) y *Sec3f* (SEQ ID 106) / *Sec3r* (SEQ ID 107) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios *Sbf1*/ *Not1* y *Nhe1*/*Asc1* para obtener pMTL85151-*SecAdh*-KO. Después de selección en placas de tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de *SecAdh* usando los cebadores *SecOf* (SEQ ID.108) y *SecOr* (SEQ ID.109) que flanquean los brazos de homología del gen *SecAdh* para la PCR.

55 Una vez lograda la inactivación de los genes *2,3bdh* o *SecAdh* en *C. ragsdalei*, el segundo gen en estos mutantes individuales se localiza usando los plásmidos pMTL85151-2,3bdh-KO o pMTL85151-*SecAdh*-KO. El plásmido se introduce en el mutante con una inactivación génica por electroporación o por conjugación como ya se ha descrito en el ejemplo 6b. Se criban los transformantes con inactivación del segundo gen usando los cebadores que flanquean los brazos de homología de los genes correspondientes.

(b) Alteración génica doble de $\Delta 2,3bdh \Delta SecAdh$ usando ClosTron en *C. ragsdalei*:

El casete de ermB RAM en la construcción de intrones del grupo II ClosTron está flanqueado por sitios de recombinación de flipasas (Frt). Mediante la introducción de flipasa recombinasa en el mutante $\Delta 2,3bdh$ ClosTron por conjugación o por electroporación, el marcador ermB RAM de ~1,3 kb se elimina del genoma del mutante y por lo tanto se puede reciclar el marcador ermB. Se dejará un fragmento de ~0,8 kb del intrón del grupo II en el genoma. Esto se confirma por (i) ensayo de su susceptibilidad a la claritromicina, y (ii) por PCR con cebadores que flanquean el sitio de inserción del intrón del grupo II, con los cebadores Og42f (SEQ ID 84) y Og43r (SEQ ID 85) y secuenciación del producto por PCR. Una vez que se ha obtenido el mutante $\Delta 2,3bdh$ ClosTron sin el marcador ermB RAM ($\Delta 2,3bdh$ -ermB ClosTron), se localiza el gen SecAdh en el mutante de una forma similar usando la herramienta de inactivación insercional del intrón del grupo II ClosTron. El sitio de inserción del intrón entre las bases 399 y 400 en la cadena codificante se identifica en el gen SecAdh usando el algoritmo Perutka que se encuentra en ClosTron.com y se ha diseñado el casete que dirige el intrón (SEQ ID 110). El casete que dirige el intrón es sintetizado comercialmente por DNA2.0 y se suministra en el vector pMTL007C-E2 como pMTL007C-E5-SecAdh-399!400s que se introduce en el mutante $\Delta 2,3bdh$ -ermB ClosTron por conjugación o electroporación. Los transformantes se pueden seleccionar secuencialmente en placas de agar con tianfenicol y claritromicina y se criban por PCR con cebadores SecCTf (SEQ ID 111) y SecCTr (SEQ ID 112) como se ha explicado antes en el ejemplo 6b.

El mutante con doble alteración génica $\Delta 2,3bdh \Delta SecAdh$ de *C. ragsdalei* se crea usando técnica de recombinación homóloga o por la herramienta de inactivación insercional de intrones del grupo II ClosTron, como se ha explicado en los párrafos anteriores.

La alteración de los genes 2,3bdh y SecAdh se confirma llevando a cabo ensayos de actividad enzimática para la conversión de acetoina en 2,3-BDO y también analizando por HPLC los metabolitos y el 2,3-BDO producidos por el mutante, como se ha descrito antes.

Ejemplo 10: Cepa de *C. ragsdalei* modificada que no produce o produce menos 2,3-BDO

Como se muestra en la figura 1, el acetolactato es uno de los compuestos intermedios en la biosíntesis de 2,3-BDO y también es el precursor para la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada. La enzima acetolactato sintasa cataliza la reacción que conduce al acetolactato a partir de 2 moléculas de piruvato como sustratos. La enzima acetolactato sintasa se clasifica ampliamente en dos grupos; (i) la acetolactato sintasa anabólica está asociada con los genes implicados en la síntesis de los aminoácidos ramificados valina, isoleucina e leucina, y (ii) la acetolactato sintasa catabólica está asociada con la síntesis de 2,3-BDO.

El genoma de *C. ragsdalei* tiene 3 genes de acetolactato sintasa anabólica putativos, ilvC, ilvI e ilvB y 1 acetolactato sintasa catabólica, alsS. La secuencia de aminoácidos de ejemplo de *C. ragsdalei* (AE190734.1, AE190734.1, AE190735.1, AE190727.1, AE190727.1) y las respectivas secuencias de ácidos nucleicos (HQ876014.1, HQ876024.1, HQ876022.1) se obtienen de GenBank.

La alteración de los 4 genes de la acetolactato sintasa o cualquier combinación de estos 4 genes debería conducir a una disminución en la producción de acetoina y 2,3-BDO. Con el fin de asegurar el crecimiento de estos mutantes, el medio se complementa con tres aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina.

Como se describe en los ejemplos 6b y 9, los mutantes sencillos de *C. ragsdalei* alsS, ilvC, ilvI e ilvB se pueden crear por recombinación homóloga o usando la herramienta de mutagénesis de intrones del grupo II ClosTron.

Diseño de los casetes de inactivación génica de alsS, ilvC, ilvI e ilvB:

Las construcciones de inactivación génica para los genes alsS, ilvC, ilvI e ilvB se diseñan como se ha explicado antes.

Los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 113) y 3' (SEQ ID 114) del gen alsS se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ragsdalei*. Los cebadores alsS5f (SEQ ID 115) / alsSr (SEQ ID 116) y alsS3f (SEQ ID 117) / alsS3r (SEQ ID 118) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios Sbf1/ Not1 y Nhe1/Asc1 para obtener pMTL85151-alsS-KO. Este plásmido se introduce en *C. ragsdalei* por conjugación o por electroporación como se describe en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de alsS usando los cebadores alsSO_f (SEQ ID 119) y alsSO_r (SEQ ID 120) que flanquean los brazos de homología de alsS para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Para la inactivación del gen ilvC, los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 121) y 3' (SEQ ID 122) del gen ilvC se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ragsdalei*. Los cebadores ilvC5f (SEQ ID 123) / ilvC5r (SEQ ID 124) y ilvC3f (SEQ ID 125) / ilvC3r (SEQ ID 126) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios Sbf1/ Not1 y Nhe1/Asc1 para obtener pMTL85151-ilvC-KO. Este plásmido se introduce en *C. ragsdalei* por conjugación o por electroporación como se describe en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación génica de ilvC usando los cebadores ilvCO_f (SEQ ID 127) y ilvCO_r (SEQ

ID 128) que flanquean los brazos de homología del gen *ilvC*, para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Para la inactivación del gen *ilvI*, los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 129) y 3' (SEQ ID 130) del gen *ilvI* se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ragsdalei*. Los cebadores *ilvI5f* (SEQ ID 131) / *ilvI5r* (SEQ ID 132) y *ilvI3f* (SEQ ID 133) / *ilvI3r* (SEQ ID 134) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios *SbfI*/ *NotI* y *NheI*/*AscI* para obtener pMTL85151-*ilvI*-KO. Este plásmido se introduce en *C. ragsdalei* por conjugación o por electroporación como se describe en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación génica de *ilvI* usando los cebadores *ilvIOf* (SEQ ID 135) y *ilvIOr* (SEQ ID 136) que flanquean los brazos de homología del gen *ilvI*, para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Para la inactivación del gen *ilvB*, los brazos de homología de ~1 kb 5' (SEQ ID 137) y 3' (SEQ ID 138) del gen *ilvB* se amplifican por PCR usando el ADN genómico de *C. ragsdalei*. Los cebadores *ilvB5f* (SEQ ID 139) / *ilvB5r* (SEQ ID 140) y *ilvB3f* (SEQ ID 141) / *ilvB3r* (SEQ ID 142) se usan para amplificar los brazos de homología 5' y 3', respectivamente. Los dos productos de la PCR se clonan en plásmidos pMTL85151 entre los sitios *SbfI*/ *NotI* y *NheI*/*AscI* para obtener pMTL85151-*ilvB*-KO. Este plásmido se introduce en *C. ragsdalei* por conjugación o por electroporación como se describe en los ejemplos anteriores. Después de selección en placas con tianfenicol, se criban los transformantes con inactivación de *ilvB* usando los cebadores *ilvBOf* (SEQ ID 143) y *ilvBOr* (SEQ ID 144) que flanquean los brazos de homología del gen *ilvB* para la PCR y secuenciación de este producto de la PCR.

Una vez que se obtienen los mutantes con una sola inactivación génica, se localizan los otros 3 genes de acetolactato sintasa secuencialmente para crear un mutante que tenga los 4 genes de acetolactato sintasa eliminados. El crecimiento de estos mutantes puede ser auxótrofo para aminoácidos de cadena ramificada. La producción o falta de producción de acetoína, 2,3-BDO y otros metabolitos en estos mutantes, se puede analizar por HPLC, como se ha descrito para los ejemplos previos. Los ensayos de actividad enzimática con piruvato como sustrato y tiamina difosfato y dinucleótido de flavina y adenina como cofactores, se pueden llevar a cabo para confirmar la pérdida de actividad de acetolactato sintasa en estos mutantes (Tittmann, Vyazmensky, Hübner, Barak y Chipman, 2005; Vinogradov et al, 2006).

Diseño de casetes directores de intrones del grupo II ClosTron para los genes *alsS*, *ilvC*, *ilvI* e *ilvB*:

Los genes de *C. ragsdalei* *alsS*, *ilvC*, *ilvI* e *ilvB* también se pueden alterar o inactivar usando la herramienta de alteración de genes mediada por intrones del grupo II ClosTron (Heap et al., 2010). Se usa el algoritmo Perutka que se encuentra en ClosTron.com para identificar el sitio diana de intrones del grupo II entre las bases 303/ 304, 228 / 229, 975 / 976 y 157 / 158 en la cadena codificante de *alsS*, *ilvC*, *ilvI* y en la cadena de sentido contrario de genes *ilvB*, respectivamente. También se localizar otros sitios identificados por el algoritmo. Se ha usado el mismo algoritmo para diseñar las regiones que dirigen los intrones (*alsS* - SEQ ID 145; *ilvC* - SEQ ID 146; *ilvI* - SEQ ID 147 y *ilvB* - SEQ ID 148) que pueden ser sintetizadas comercialmente por DNA2.0 y suministradas en el vector pMTL007C-E2. Los vectores finales, pMTL007C-E2-*ilvC*-228!229s, pMTL007C-E2-*ilvI*-975!976s y pMTL007C-E2-*ilvB*-157! 158a, contienen un marcador *armB* activado por retrotransposición (RAM) que confiere resistencia al antibiótico claritromicina tras inserción en el sitio diana. Estos plásmidos se introducen en *C. ragsdalei* por conjugación o por electroporación. Los transformantes se seleccionan secuencialmente en placas de agar con tianfenicol y claritromicina y se criban por PCR con cebadores *alsSCTf* (SEQ ID 149) y *alsSCTr* (SEQ ID 150), *ilvCCTf* (SEQ ID 151) y *ilvCCTr* (SEQ ID 152), *ilvICTf* (SEQ ID 153) y *ilvICTr* (SEQ ID 154) y *ilvBCTf* (SEQ ID 155) y *ilvBCTr* (SEQ ID 156) para la inactivación de los genes *alsS*, *ilvC*, *ilvI* e *ilvB*, respectivamente.

Una vez que se han obtenido los mutantes ClosTron con un solo gen alterado, se elimina el casete de *ermB* RAM del genoma de estos mutantes usando plásmidos pMTL que llevan un gen de flipasa que se introduce en el mutante por electroporación o por conjugación. Se criban los transformantes resultantes con pérdida del casete *ermB* ensayando su susceptibilidad a la claritromicina, y (ii) por PCR con los cebadores que flanquean el sitio de inserción del intrón del grupo II con *alsSCTf* (SEQ ID 149) y *alsSCTr* (SEQ ID 150), *ilvCCTf* (SEQ ID 151) y *ilvCCTr* (SEQ ID 152), *ilvICTf* (SEQ ID 153) y *ilvICTr* (SEQ ID 154) y *ilvBCTf* (SEQ ID 155) y *ilvBCTr* (SEQ ID 156) en genes *alsS*, *ilvC*, *ilvI* y *ilvB*, respectivamente, y por secuenciación adicional de este producto de la PCR.

Después de confirmar la pérdida del casete de *ermB*, los mutantes ClosTron como los mutantes de inactivación génica, se localizan secuencialmente para la inactivación de otros genes de acetolactato sintasa. En una descripción, estos mutantes ClosTron se cultivan en presencia de aminoácidos de cadena ramificada. La producción o falta de producción de acetoína, 2,3-BDO y otros metabolitos en estos mutantes, se analiza por HPLC como se ha descrito en ejemplos previos y se estudia llevando a cabo ensayos de actividad enzimática con piruvato como sustrato y difosfato de tiamina y dinucleótido de flavina y adenina como cofactores, para confirmar la pérdida de actividad de acetolactato sintasa en estos mutantes (Tittmann et al., 2005; Vinogradov et al, 2006).

La invención se ha descrito en la presente memoria con referencia a determinadas realizaciones preferidas, con el fin de permitir que el lector lleve a la práctica la invención sin excesiva experimentación. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá fácilmente que se pueden variar o modificar muchos de los componentes y parámetros en cierta medida o sustituirlos por equivalentes conocidos sin salirse del alcance de la invención. Los títulos,

encabezamientos o similares se proporcionan para aumentar la comprensión del lector de este documento, y no deben leerse como limitantes del alcance de la presente invención.

La referencia a cualesquiera solicitudes, patentes y publicaciones en esta memoria descriptiva no es, y no debe considerarse, como una aceptación o cualquier forma de sugerencia de que constituyen técnica anterior válida o forman parte del conocimiento general común en cualquier país del mundo.

A lo largo de esta memoria descriptiva y cualquiera de las siguientes reivindicaciones, salvo que el contexto requiera otra cosa, las palabras "comprende", "que comprende" y similares, deben considerarse en un sentido inclusivo en contraposición a un sentido exclusivo, es decir, en el sentido de "que incluye, pero no limitado a".

Referencias

- 10 Abrini, J, Naveau, H. & Nyns, E.J., 1994. Clostridium autoethanogenum, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Archives of microbiology, 161(4), pp.345-351. Disponible en: <http://www.springerlink.com/index/v143151w30423660.pdf> [Accessed September 4, 2011].
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., et al. (1994). The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations. International journal of systematic bacteriology, 44(4), 812-26. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7981107>
- 15 Drake, H. L., Küsel, K., Matthies, C., Wood, H. G., & Ljungdahl, L. G. (2006). Acetogenic Prokaryotes. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), The Prokaryotes (3ª Edición, pág. 354-420). New York, NY: Springer. doi:10.1007/0-387-30742-7
- 20 Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F., Tizard, J. H., Ali, M. S., Conolly, J. J., Al-Sinawi, B., et al. (2011). 2,3-Butanediol Production By Acetogenic Bacteria, an Alternative Route To Chemical Synthesis, Using Industrial Waste Gas. Applied and environmental microbiology, 77(15),5467-75. doi:10.1128/AEM.00355-11
- Perez, J. M., Richter, H., Loftus, S. E., & Angenent, L. T. (2012). Biocatalytic reduction of short-chain carboxylic acids into their corresponding alcohols with syngas fermentation. Biotechnology and bioengineering, 1-30. doi:10.1002/bit.24786
- 25 Smart KF, Aggio RB, Van Houtte JR, Villas-Boas SG, Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Nat Protoc.* 2010 Sep;5(10):1709-29. 2010
- Tanner, R. S., Miller, L. M., y Yang, D. (1993). Clostridium ljungdahlii sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. International journal of systematic bacteriology, 43(2), 232. Recuperado de: <http://ijs.sgmjournals.org/content/43/2/232.short>
- 30 Heap, J. T., Kuehne, S. a, Ehsaan, M., Cartman, S. T., Cooksley, C. M., Scott, J. C., & Minton, N. P. (2010). The Clostron: Mutagenesis in Clostridium refined and streamlined. *Journal of microbiological methods*, 80(1), 49-55. doi:10.1016/j.mimet.2009.10.018. Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., et al. (2010). Clostridium ljungdahlii represents a microbial production platform based on syngas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(29), 13087-92. doi:10.1073/pnas.1004716107
- 35 Tittmann, K., Vyazmensky, M., Hübner, G., Barak, Z., & Chipman, D. M. (2005). The carboligation reaction of acetohydroxyacid synthase II: steady-state intermediate distributions in wild type and mutants by NMR. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(3), 553-8. doi: 10. 1073/pnas.04082 10 101
- 40 Vinogradov, V., Vyazmensky, M., Engel, S., Belenky, I., Kaplun, A., Kryukov, O., Barak, Z., et al. (2006). Acetohydroxyacid synthase isozyme I from Escherichia coli has unique catalytic and regulatory properties. *Biochimica et biophysica acta*, 1760(3), 356-63. doi:10.1016/j.bbagen.2005.10.008
- 45 Yan, Y., Lee, C.-C., y Liao, J. C. (2009). Enantioselective synthesis of pure (R,R)-2,3-butanediol in Escherichia coli with stereospecific secondary alcohol dehydrogenases. *Organic & biomolecular chemistry*, 7(19), 3914-7. doi:10.1039/b913501d

Lista de secuencias

<110> Lanzatech New zealand Limited Koepke, Michael chen, wendy Y Nagaraju, Shilpa

5 <120> Microorganismos recombinantes y métodos de uso de los mismos

<130> LT74PCT

<150> US 61/593269

10 <151> 2012-01-31

<160> 156

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 719

<212> ADN

<213> Clostridia autoethanogenum

20 <400> 1

```

atggatgatg aggtgaaagt cccaaacct atatatcaaa tgtctacaat aaatgcactt      60
gtttcggggc tgtatgatgg ctgtgtttca ttatctaaac ttcttaaaaa aggaaacttt      120
ggtataghta cttttaaagg tctagatggt gaactaactc ttttaaattgg aactttttat      180
aggactaaac ctgatggcag cgtatacgta tgttccaaaa acgtatccgt tccttttgct      240
gtagtactg aactggaaaa ttataatact tataatattc aaaatcgtac ttcttatgaa      300
gatataagaa aagaattgga cagctttata gaaagcaaaa atatatatta tgctttctat      360
atggaaghta aatttaatta tgtaaaaaca cgtactggtg taaaacagaa tatgccttat      420
aagcctatgg ctgaagttgt taaagatcag cctatgtttg aatataacgg tgttgatgga      480
tatgtggttg gatttaggtg tcctgattat gttgaaggcc ttaatgtccc tggatatcat      540
tttcatttca taaataaaga taagaaatth ggtggacata taagtgaatt ttccattgaa      600
aatgcgaagg tttatgtaca gaactgttct tgcttttagga tggaaacttc taaaagaaa      660
gtttttataa tatggaagta caagatagaa acgatgagat aacaagtgtt gaaaaataa      719
    
```

25 <210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> clostridium autoethanogenum

30 <400> 2

```

Met Asp Asp Glu Val Lys Val Pro Asn His Ile Tyr Gln Met Ser Thr
1           5           10
Ile Asn Ala Leu Val Ser Gly Leu Tyr Asp Gly Cys Val Ser Leu Ser
                20           25           30
Lys Leu Leu Lys Lys Gly Asn Phe Gly Ile Gly Thr Phe Lys Gly Leu
          35           40           45
    
```

ES 2 583 203 T3

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

<210> 3
 <211> 964
 5 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 3

tttcttcaca ggaaaatata cttcagtaac aagatcttta ggaatggtga cttggtggg	60
gtcagttaca tatacttcat atggtgggtt tgtaagttta tacccttcat tttctaccca	120
ttccctcaac ttagcatata cagagatggt aattctgaat atgagcccct taaaacagac	180
ttcgcacaaa ggactccagg caagtatctt gttcccttta caatctcctt taccggaatg	240
gcaagttctg tatcattgcc agaaggattg tattcagcgc tgtgataaat agttattggc	300
ttaccaagaa agtcaattac aaaaatatat ataaagaaag caaagctaca tatattaaag	360
10 catttaaggt aaaactaaaa atattataaa aatgaaatta ttttttctca tagctaaagt	420

ES 2 583 203 T3

tacataatac gaggaggatt tataatgaaa aaagtaatag gaattataag tattgtacta 480
 tttgtactcg tagcacttca atcctgtgct gcaggagtag gaaatgcatt aagtaataac 540
 aaagaagcta gtggatctgc tggattatth ttatctgtat gtatgcttat tgctggaata 600
 atagcaataa tatcaaaaata tagtaaagggt atgactataa cagctatagt atthttatthg 660
 tttagctththg ttgtagggat tgctaathgt gggcaththth cagaththgca aaththggca 720
 atcathhaact tgathththg tggactathg athththcath tgctthaaaa taagcaatha 780
 tataathgca gtgggaaaaa gtagaathcat athththgath tathththhaath tatgththgca 840
 aaththgaaath tggctactgaa acacctctaa atgthththaaa tacaththgth taathththgth 900
 gacagaththct aaththgthgaa agththgaaath tgctaththgth thaththgacata gaggthgathg 960
 thath 964

<210> 4

<211> 977

5 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 4

actagacagth gcthaathaca atgthctagthg cththththct thgthcaathth ththcaththgag 60
 ththcaththhaag thagthccacc thgthccathth thctgthctagc thththththcca gthgaththctth 120
 thctggathhaag agathctthcaa gaagthgcath atcagathgaa gcagctthcca ththctaththth 180
 cthththcagath athgathththth ctgathgththc aaththacctca thctathththgth caaactccath 240
 thgththctgca thagthgaaath thtagagthctth thctththththgca aactthathgth thgththththgca 300
 thgththththth thtagagctth ththththctct thgaththththth gcagththththgth gaaathathgga 360
 athgththctct gthathththgag thgathththththc gththctctca aaghaathhaath ththththcaac 420
 thgthththgca aggaagthacc thgthcatgaga thacagctath acagctctct caaathctgth 480
 aathathathct thctagthgthg thagthgththct thaththccagath thcaththgthgth gthctgthccag 540
 caaathgthaca thtaggthgath thcathcagthath thththgathgath thathathctth thctgththctcc 600
 thctgathhaagth ththccaaggg gathgthcaththg aactgathggth thcaathhaathhaath aathththcaag 660
 thacagcagath gcactthathth ththcaccgca thgathgththgac gcathaththctg athgthcccagc 720
 thathgaththca aththaccctth cgtthcathathc cathathcagath aththccctgag aathgaththctcc 780
 thathctththct gththcaccath thathctathgth gccgctgthcc ggcagaththth ththgathhaath 840
 aathaththcath agathgthgath thaccactthcc aththgththcca athathathcath thctgthcath 900
 aththgaththgth ththathagthgath aaththththhaath thaththgthctth thcaccathhaath thththgththth 960
 gththaththccagth thththgath 977

10

<210> 5

<211> 40

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

20 <400> 5

aththcathctg cagththctth cacagghaaaa thathctthcag 40

25 <210> 6

<211> 40

<212> ADN

ES 2 583 203 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 5 <400> 6
 gactgcgcc gcattacatt cacctctatg tcattataac 40
 10 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 7
 20 atttgctagc actagacagt gctaataaca atgtctag 38
 <210> 8
 <211> 35
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 30 <400> 8
 atatggcgcg cctcataaac ctggataaca taagc 35
 <210> 9
 35 <211> 2963
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 9
 40 cctgcaggat aaaaaaattg tagataaatt ttataaaata gttttatcta caatTTTTTT 60
 atcaggaaac agctatgacc gcgccgctg tatccatag accatgatta cgaattcgag 120
 ctcggtaccg ggggatcctc tagagtcgac gtcacgcgtc catggagatc tcgaggcctg 180
 cagacatgca agcttggcac tggccgctgt ttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg 240
 cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga 300
 agaggcccg accgatcgcc cttccaaca gttgcgagc ctgaatggcg aatggcgcta 360
 gcataaaat aagaagcctg ctttgcagg cttcttattt ttatggcgcg ccgcattcac 420
 ttcttttcta tataaatatg agcgaagcga ataagcgctg gaaaagcagc aaaaagtctc 480
 ctttttgctg ttggagcatg ggggttcagg ggggtgcagta tctgacgtca atgccgagcg 540
 aaagcgagcc gaagggtagc atttacgta gataaccccc tgatagctc cgacgcttta 600

ES 2 583 203 T3

tatagaaaag aagattcaac taggtaaaat cttaatatag gttgagatga taaggtttat 660
aaggaatttg tttgttctaa tttttcactc attttgttct aatttctttt aacaaatggt 720
cttttttttt tagaacagtt atgatatagt tagaatagtt taaaataagg agtgagaaaa 780
agatgaaaga aagatatgga acagtctata aaggctctca gaggctcata gacgaagaaa 840
gtggagaagt catagaggta gacaagttat accgtaaaca aacgtctggt aacttcgtaa 900
aggcatatat agtgcaatta ataagtatgt tagatatgat tggcggaaaa aaacttaaaa 960
tcgttaacta taccctagat aatgtccact taagtaaca tacaatgata gctacaacaa 1020
gagaaatagc aaaagctaca ggaacaagtc tacaacagc aataacaaca cttaaaatct 1080
tagaagaagg aaatattata aaaagaaaaa ctggagtatt aatgttaaac cctgaactac 1140
taatgagagg cgacgaccaa aaacaaaaat acctcttact cgaatttggg aactttgagc 1200
aagaggcaaa tgaatatagat tgacctcca ataacaccac gtagttattg ggaggtaaat 1260
ctatgaaatg cgattaaggg ccggccagtg ggcaagtga aaaattcaca aaaatgtggt 1320
ataatatctt tgttcattag agcgataaac ttgaatttga gagggaaactt agatggtatt 1380
tgaaaaaatt gataaaaata gttggaacag aaaagagtat tttgaccact actttgcaag 1440
tgtacctgtt acctacagca tgaccgttaa agtggatata acacaaataa aggaaaaggg 1500
aatgaaacta taccctgcaa tgctttatta tattgcaatg attgtaaacc gccattcaga 1560
gtttaggagc gcaatcaatc aagatggtga attggggata tatgatgaga tgataccaag 1620
ctatacaata tttcaaatg atactgaaac attttccagc ctttggactg agtgtaagtc 1680
tgactttaaa tcatTTTTtag cagattatga aagtgatacg caacggtatg gaaacaatca 1740
tagaatggaa ggaaagccaa atgctccgga aaacattttt aatgtatcta tgataccgtg 1800
gtcaaccttc gatggcttta atctgaattt gcagaaagga tatgattatt tgattcctat 1860
ttttactatg gggaaatatt ataaagaaga taacaaaatt atacttcctt tggcaattca 1920
agttcatcac gcagtatgtg acggatttca catttgccgt tttgtaaacg aattgcagga 1980
attgataaat agttaacttc aggtttgtct gtaactaaaa acaagtattt aagcaaaaac 2040
atcgtagaaa tacggtgttt tttgttacc taagttaaa ctcctttttg ataactcat 2100
gacaaaaatc ctttaacgtg agttttcggt cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat 2160
caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa 2220
accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa 2280
ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactggt cttctagtgt agccgtagtt 2340
aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctggt 2400
accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata 2460
gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt 2520
ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcc 2580
gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga 2640

gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg 2700
ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa 2760
aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcaca 2820
gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc 2880
tgataccgct cgccgagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgg 2940
agagcggcca atacgcaggg ccc 2963

ES 2 583 203 T3

<211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 10
 10 gtaaacgac gccag 16
 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 20 <400> 11
 caggaaacag ctatgacc 18
 <210> 12
 25 <211> 4819
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> plásmido con inactivación del gen budA pMTL85141-budA-ko
 <400> 12
 cctgcaggtt tcttcacagg aaaatatact tcagtaaca gatctttagg aatggtgact 60
 tgggtgggggt cagttacata tacttcatat ggtgggtttg taagtttata tccttcattt 120
 tctaccatt ccctcaactt agcatatata gagatgttaa ttctgaatat gagcccctta 180
 aaacagactt cgcacaaagg actccaggca agtatcttgt tccctttaca atctccttta 240
 tcggaatggc aagttctgta tcattgccag aaggattgta ttcagcgctg tgataaatag 300
 ttattggctt accaagaaag tcaattacaa aaatataat aaagaaagca aagctacata 360
 tattaaagca ttttaagtaa aactaaaaat attataaaaa tgaattatt ttttctcata 420
 gctaaagtta cataatacga ggaggattta taatgaaaa agtaatagga attataagta 480
 ttgtactatt tgtactcgta gcacttcaat cctgtgctgc aggagtagga aatgcattaa 540
 gtaataaca agaagctagt ggatctgctg gattatTTTT atctgtatgt atgcttattg 600
 ctggaataat agcaataata tcaaatata gtaaaggat gactataaca gctatagtat 660
 35

ES 2 583 203 T3

tttatttggt agcttttggt gtagggattg ctaatgttgg gcatttttca gatttgcaaa 720
 tttggtcaat cattaacttg atatttgctg gactattgat atttcatttg cttaaaaata 780
 agcaattata taatagcagt gggaaaaagt agaatcatat attgtaatta tttttaatta 840
 tgttggcaaa attgaaattg tcaactgaaac acctctaaat gttttaaata catatgttta 900
 attattgtga cagattctaa tagtagaaaag tagaaatttg ctatgttata atgacataga 960
 ggtgaaatga atgcccgc tgtatccata tgaccatgat tacgaattcg agctcggtag 1020
 ccgggatcc tctagagtcg acgtcacgcg tccatggaga tctcaggcc tgcagacatg 1080
 caagcttggc actggccgctc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc 1140
 aacttaactg ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc 1200
 gcaccgatcg cccttccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcg tagcagtatt 1260
 gatagaaaa aacactagac agtgctaata acaatgtcta gtgcttttta tcttgctcaa 1320
 tttttcatt gaggctcatt aagtaagtcc acctgtccat cttttcgtct agctctttt 1380
 ccagtgaatt cttttcggat aagagatctt caagaagtgc ataatcagat gaagcagctt 1440
 ccatttctat tttctttca gatatagatt tttctagatg ttcaattacc tcatctattt 1500
 tgtcaaacct catttgttct gcataggtaa attttagagg cttttctttt tgcaacttat 1560
 agttgtttt agctgtattt ttcttagagc ttattttttc ctctgatatt tttgcagttt 1620
 tgtgaaaata ggaatagttt cctgtatatt gagtgattt accgtttcct tcaaaagaaa 1680
 atattttatc aactgttttg tcaaggaagt acctgtcatg agatacagct ataacagctc 1740
 cttcaaaatc gtaataataa tcttctagga ttgtaagtgt ttctatatcc agatcatttg 1800
 ttggttcgct cagcaaaagt acattaggtt aattcatcag tttttttaga agatataatc 1860
 ttcttcgttc tctcctgaa agttttcca ggggagcca ttgaaactgaa ggttcaata 1920
 aaaaatttc aagtacagca gaagcactta ttttttacc cgatgaagtt gacgcatatt 1980
 ctgatgtccc acgtatgtat tcaattacc tttcgttcat atccatatca gaaattccct 2040
 gagaatagta tcctatcttt actgtttcac ctatatctat agtgccgctg tccggcagaa 2100
 tttttgaaac taaaatattc ataagagtgg atttaccact tccattaggt ccaataatac 2160
 ctattctgtc attatttagt atgttataag tgaaatttt aattaatgtc ttttaccaa 2220
 aacttttgct tatgttatcc aggtttatga ctttttacc ggcgcgccc attcacttct 2280
 tttctatata aatatgagcg aagcgaataa gcgtcggaaa agcagcaaaa agtttccttt 2340
 ttgctgttg agcatggggg ttcagggggt gcagtatctg acgtcaatgc cgagcgaag 2400
 cgagccgaag ggtagcattt acgttagata accccctgat atgctccgac gctttatata 2460
 gaaaagaaga ttcaactagg taaaatctta atataggttg agatgataag gtttataagg 2520
 aattgtttg ttctaatttt tcaactcatt tgttctaatt tcttttaaca aatgttcttt 2580
 tttttttaga acagttatga tatagttaga atagtttaa ataaggagt agaaaaagat 2640
 gaaagaaga tatggaacag tctataaagg ctctcagagg ctcatagacg aagaaagtgg 2700

ES 2 583 203 T3

agaagtcata gaggtagaca agttataccg taaacaaacg tctgtaact tcgtaaaggc 2760
 atatatagtg caattaataa gtatgtaga tatgattggc ggaaaaaac ttaaaatcgt 2820
 taactatatc ctagataatg tccacttaag taacaataca atgatagcta caacaagaga 2880
 aatagcaaaa gctacaggaa caagtctaca aacagtaata acaacactta aaatcttaga 2940
 agaaggaaat attataaaaa gaaaaactgg agtattaatg ttaaaccctg aactactaat 3000
 gagaggcgac gacccaaaaac aaaaatacct cttactcgaa tttgggaact ttgagcaaga 3060
 ggcaaatgaa atagattgac ctccaataa caccacgtag ttattgggag gtcaatctat 3120
 gaaatgcgat taagggccgg ccagtgggca agttgaaaaa ttcacaaaaa tgtggtataa 3180
 tatctttgtt cattagagcg ataaacttga atttgagagg gaacttagat ggtattttaa 3240
 aaaattgata aaaatagttg gaacagaaaa gagtatTTTT accactactt tgcaagtgtg 3300
 ccttgtagct acagcatgac cgtaaagtg gatatcacac aaataaagga aaagggaaatg 3360
 aaactatatc ctgcaatgct ttattatatt gcaatgattg taaaccgcca ttcagagttt 3420
 aggacggcaa tcaatcaaga tgggtaattg gggatataatg atgagatgat accaagctat 3480
 acaatatttc acaatgatac tgaacattt tccagccttt ggactgagtg taagtctgac 3540
 tttaaatcat ttttagcaga ttatgaaagt gatacgcaac ggtatggaaa caatcataga 3600
 atggaaggaa agccaaatgc tccggaaaac atttttaatg tatctatgat accgtggtca 3660
 accttcgatg gctttaatct gaatttgcag aaaggatatg attatttgat tcctattttt 3720
 actatgggga aatattataa agaagataac aaaattatac ttcctttggc aattcaagtt 3780
 catcacgcag tatgtgacgg atttcacatt tgccgTTTT taaacgaatt gcaggaattg 3840
 ataaatagtt aacttcaggt ttgtctgtaa ctaaaaaca gtatttaagc aaaaacatcg 3900
 tagaaatagc gtgtttttt ttaccctaag tttaaactcc tttttgataa tctcatgacc 3960
 aaaatccctt aacgtgagtt ttcggtccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa 4020
 ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca 4080
 ccgctaccag cgggtggttt tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta 4140
 actggcttca gcagagcgca gataccaat actgttcttc tagttagacc gtagttaggc 4200
 caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaact cctgttacca 4260
 gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta 4320
 ccgataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag 4380
 cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt 4440
 cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc 4500
 acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac 4560
 ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac 4620
 gccagcaacg cggccttttt acggttctcg gccttttgct ggccttttgct tcacatgttc 4680
 tttcctgctg tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcttttga gtgagctgat 4740
 accgctcgc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagttag tgagcgagga agcggagag 4800
 cgccaatac gcagggccc 4819

<210> 13
 <211> 1460
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 13

5

10

ES 2 583 203 T3

ggctcaggac gaacgctggc ggcgtgctta acacatgcaa gtcgagcgat gaagctcctt 60
 cgggagtgga ttagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg taacctacct caaagagggg 120
 gatagcctcc gaaaggggag attaataaccg cataataatc agttttcaca tggagactga 180
 tttaaaggag taatccgctt tgagatggac ccgcggcgca ttagctagtt ggtagggtaa 240
 cggcctacca aggcgacgat gcgtagccga cctgagaggg tgatcggcca cattggaact 300
 gagagacggt ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattgcaca atgggcgaaa 360
 gcctgatgca gcaacgccgc gtgagtgaag aaggttttcg gattgtaaag ctctgtcttt 420
 ggggacgata atgacggtac ccaaggagga agccacggct aactacgtgc cagcagccgc 480
 ggtaatacgt aggtggcgag cgttgtccgg aattactggg cgtaaagagt gcgtaggcgg 540
 atatttaagt gagatgtgaa ataccgggc ttaaccggg cactgcattt caaactggat 600
 atctagagtg cgggagagga gaatggaatt cctagtgtag cggtgaaatg cgtagagatt 660
 aggaagaaca ccagtggcga aggcgattct ctggaccgta actgacgctg aggcacgaaa 720
 gcgtgggtag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgagtacta 780
 ggtgtaggag gtatcgacct ctctgtgcc gcagtaaaca caataagtac tccgcctggg 840
 aagtacgac gcaagattaa aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcagcggag 900
 catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga acctacctg gacttgacat accctgaata 960
 tcttagagat aagagaagcc cttcggggca gggatacagg tggatgatgg ttgtcgtcag 1020
 ctctgtcgt gagatgttag gtttaagtctt gcaacgagcg caaccctgt tgttagttgc 1080
 taacatttag ttgagcactc tagcaagact gccgcggtta acgcggagga aggtggggat 1140
 gacgtcaaat catcatgccc cttatgtcca gggcaacaca cgtgctacaa tgggcagtac 1200
 agagagaagc aagaccgcaa ggtggagcaa acctcaaaaa ctgccccag ttcggattgc 1260
 aggctgaaac tcgcctacat gaagttggag ttgctagtaa tcgcgaatca gaatgtcgcg 1320
 gtgaatacgt tcccggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccatgagagc tggcaacacc 1380
 cgaagtccgt agtctaactt aggaggacgc gcccgaaggt ggggttagta attgggggtga 1440
 agtcgtaaca aggtagccgt 1460

<210> 14

<211> 677

5 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 14

aagaacmttg saaaktccst racsatggwg asycstwmgc kkgkrrmyy mgcrrysgac 60
 gggtagtma cacgtgggta acctaccyr rrgaggggga tagcctcccs aaaggagat 120
 taataccgca taataatcag tttcacatg gagaytgwt taaaggagta atccgcttg 180
 agatggacct gcggcgatt agctagttgg taggtaacg gcctaccaag gcgackatgc 240
 gtagccgacc tgagagggtg atcggccaca ttggaactga sagacggtcc asactcctac 300
 gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgaaagc ctgatgcagc aacgccgct 360
 gagtgaagaa ggttttcgga ttgtaaagct ctgtctttgg ggacgataat gacggtacct 420
 aaggaggaag ccacggstaa ctacgkcca scakccgcg taatacgtas gtggcgagcg 480
 ttgtccgga ttactggcg taaakastgc gtakcggat atttaaktga satgtgaaat 540
 asccggcctt aaccygggyw ctgywtttca mactggatat ctakagtgcg ggagaggasa 600
 atgkaattcy taktgtascg gtgaartgcs takasattak gaasaacacc mktggcgaak 660
 gcgattckct ggaccgt 677

10

ES 2 583 203 T3

<210> 15
 <211> 720
 <212> ADN
 5 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 15

trarakkgak cyysgrtccc kkgmswcst ggyarggtaa csgymwrcyw rgrysacgak	60
gcgtmgycra cctgaraggg tgatcgcca cmttggaact gagagacggt ccaractcct	120
acgggaggca gcagtgggga atattgcaca atgggcgaaa gcctgatgca gcaacgccgc	180
gtgagtgaag aaggttttcg gattgtaaag ctctgtcttt ggggacgata atgacggmtc	240
ccaaggagga agccacggct aactacgtgc cascagccgc ggtaatacgt aggtggcrag	300
cgttgtccgg aattactggg cgtaaagagt gcgtaggcgg atatttaagt gagatgtgaa	360
ataccgggc ttaaccggg cactgcwttt caaactggat atctakagt cgggagagga	420
gaatgkaatt cctagtgtag cggtgaaatg cgtakagatt aggaagaaca ccmgtggcga	480
akgcgattct ctggaccgta actgayrctg akgcacgaag cgtggggtak cawacakgat	540
tagatacyct ggtrstccac rccgtaaacg atgagtayta kgtgtakgag kwtsacccc	600
cttctgtgcc ssmmtaraca ymyaaktac tcccgcckcr aagtmsawcg cmagatkaa	660
amtrwmgsa rtkrwggggg ggcsgmcta acatcgsast wrkwkkttsr attawarcaa	720

10

<210> 16
 <211> 960
 <212> ADN
 15 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 16

taaaggagta atccgytttg agatggacc gcggcgcatt agctwgttgg tagggtaacg	60
gcctaccmwg gcgackatgc gtagccgacc tgagaggggtg atcgccaca ttggaactga	120
gagacggtcc aractcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgaaagc	180
ctgatgcagc aacgccgct gagtgaagaa ggttttcgga ttgtaaagct ctgtctttgg	240
ggacgataat gacggtaccc aaggaggaag ccacggstaa ctactgcca scagccgcgg	300
taatacgtag gtggcgagcg ttgtccgga ttactgggcg taaagagtgc gtaggcggat	360
athtaagtga gatgtgaaat acccgggctt aaccgggyw ctgcatttca aactggatat	420
ctagagtgcg ggagaggaga atggaattcc tagttagcgc gtgaartgcg takagattak	480
gaagaacacc agtggcgaag gcgattctct ggaccgtrac tgacgctgag gcacgaaagc	540
gtgggtagca aacaggatta gataccctgg tagtccacrc cgtaaacgat gagtactakg	600
tgtaggaggt atcgaccct tctgtgccgc agtaaacaca ataagtacty ckctgggaa	660
gtacgatcgc aagattaaaa ctcaasgaak tgacagsgc cgcacwagc akcgasyatg	720
tggtttattc gaagcacgcg aagaacctta cctggacttg acataccctg mwatctwtas	780
ataagagagc scttcgggtc aggatrcagt cgtgcatggt gtcgctwgct cgtgtcrtga	840
gatgtagtar tctgcaacs kcyacyctg tgyyagtgct acatgmtsag cmtctagcag	900
actcgmgtgta sccgsagagy ggggatgacg tcgakcatca tgyccyagt cmcgyctacr	960

20

<210> 17
 <211> 676
 <212> ADN
 25 <213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 583 203 T3

<400> 17

atthkgsar aktccgkag caagtgasc cgtargcttg gatccyggga akksryrgsw 60
 grgtamcysk kgkstwrswt mcccsgraga rggggawags ctcccgaag ggagattamt 120
 accgcataat aatcagtttt cacatggaga ctgatttaaa ggagtaatcc gctttgagat 180
 ggacccgcgg cgcattagct agttggtagg gtaacggcct accaaggcga ckatgcgtag 240
 ccgacctgag agggtagatg gccacwttgg aactgagaga cgggccasac tcctacggga 300
 ggcagcagtg gggaaatattg cacaatgggc gaaagcctga tgcagcaacg ccgctgagtg 360
 gaagaaggtt ttcggattgt aaagctctgt ctttggggac gataatgacg gtacccmasg 420
 aggargccmc ggsyaactac gkgccwscmk ccgcgtaat acrtaggtgg cragcgttgt 480
 ccggaattac tgggcgtaaa kagtgcgtak gcggatattt aaktgagatg tgaaryascc 540
 gggcttaacc cgggcwctgy atttcwmayt ggatatctmk agtgcgggrg aggagaaatgg 600
 awgtyctakk gtamcsgtga artgcstaka satwmkgmas aacaycwstg gcgwarrcgr 660
 ytcgswggac cgtawc 676

5

<210> 18
 <211> 1040
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

10

<400> 18

tagaaaaktc ytakrcaatg gtarycstwa gcttgkatrm krmwmgrsgg acgggtgagt 60
 aacmckkggg taamctacyt crragarggg gatagcctcc csaaaggaggag attaataaccg 120
 cataataatc agttttcaca tggagactga tttaaaggag taatccgctt tgagatggac 180
 ccgcgcgca ttagctagtt ggtagggtaa cggcctacca aggcgackat gcgtagccga 240
 cctgagaggg tgatcgcca cattggaact gagagacggg ccagactcct acgggaggca 300
 gcagtgggga atattgcaca atgggcgaaa gcctgatgca gcaacgccgc gtgagtgaag 360
 aaggttttcg gattgtaaag ctctgtcttt ggggacgata atgacggtag ccaaggagga 420
 rgccacggst aactacgkgc cascmkccgc ggtaatacgt asgtggcgag cgttgtccgg 480
 aattactggg cgtaaagagt gcgtakgcgg atatttaagt gagatgtgaa atasccggsc 540
 ttaaccggg cactgcattt camactggat atctakagt cgggagagga saatgkratt 600
 cctakkgtas cggtgaaatg cstatasatt akgaasaaca ccmktgkca akcgawtck 660
 ctggacrtr rctgacrctk akgcaygywa gcstsgstwk cwwrcmksat yatatacccy 720
 ggkrgtcmcr wcrymwmcat sagtactakg tgmkkaggt atckmcmct yctytgcssc 780
 mkwaraamaa yawkmwcytc cscysssgr rkwaawcr mwakatkaat agwmatggsa 840
 kkkamgssg gccscswma catcysmkct rwtrktkwat ttcaykcamk ymmsmaamka 900
 acctgkmytg rsmtasccyg cycysswttw awctaagmam agcmtcscs tamgrgwkmr 960
 gwsrysstk ygytsrtggc tmtcgtcayy tmgsrymgar aratratwst awacsmwsms 1020
 aamccmykyc ywycctkstk 1040

15

<210> 19
 <211> 674
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

20

<400> 19

ES 2 583 203 T3

ggggrtakcc tccsaawgg garaytaatw ccgcataata atcagttttc acatggagac 60
 tgatttaaag gagtaatccg ctttgagatg gacccgcggc gcattagcta gttggtaggg 120
 taacggccta ccaaggcgac gatgcgtagc cgacctgaga gggatgatcgg scacattgga 180
 actgagagac ggtccaract cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgc acaatgggcg 240
 aaagcctgat gcagcaacgc cgcgtagtg aagaaggttt tcggattgta aagctctgtc 300
 tttggggacg atratgacgg taccacaagga ggaagccacg gstaactacg tgccascakc 360
 cgcgtaata cgtaggtggc gagcgttgtc cggaattact gggcgtaaak agtgcgtarg 420
 cggatattta agtgagatgt gaaatasccg gscttaaccg gggcwctgca tttcwaactg 480
 gatattctaka gtgctgggaga ggagwathta wttcctagtg trscggtgaa atgsgkasam 540
 atyakmaga acmccagtgc cgaaggcgay tckstggacc ryractgamg ctsawgcwgc 600
 maagcwgwss tagcaasat gattagatay mcyggtagwc mcamcrmmaa csatgagkac 660
 trkgtgtmsk asgt 674

<210> 20
 <211> 1226
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

5

<400> 20

crgrwycyttt mggatkgkwg acttgskggg ggtcagtwmc awatactkcm wawggwgggt 60
 ttgtargttt atatccttca ttttctaccc attccctcra mtwakywwat wcaragatgt 120
 taayyckraa tatgarcccc ttaaaacrga sttscmacaa aggactccwg gyaakywtct 180
 kgttcccttt acawtctcct twaysrraat ggmaakttct gyatcmttgc casawggatt 240
 gwwttcascg ctkygwtaaa tagttattgg cttaccwmka aagtcmwta caaaaatata 300
 tataaagaaa gcaaagctac wkatwtyaaa ksattwaagg taaarmtaaa aatatwataa 360
 aawwgaamt attttttctc wtakstaawg ttacwtaata cgaggaggat ttataatgaa 420
 aaaagtaata ggawttataa ryattgwmct atttgkactm ktagcacttc aatcctgtgc 480
 kgcmkgakwa ggaartgymt yaagwaatra cmwswawksw mgwgratctg cwggatwatt 540
 tttatytkka tgkatgctka ttgctggaat aatakmmatr awaycawamy wwwktamagg 600
 tatgacyata acagctatag katttwattht gttakctttt gttgyagggg twgctaaygw 660
 tgggcatttt wcagatttgc awatttgrtc aaycwtaac twgatatttg ctggactatw 720
 gatatttcat ttrctkaama wtaagmaatt atatwatak agtggraaaa agwakaatca 780
 tatrttghaa ttatttttaa ttatgkrrc aamwytgawa ttgwcacwga waacayctct 840
 aaatgtttwr aatacatatg tttmaktakt gtgacakatw ctaatastak aaagwagaar 900
 wtygctatrw watratgaca tagwggtgaa tgtaatgcsj mckctgwryc catatsacca 960
 tgatrcgaat tmsagctsgg tacscsggrk atcctctrga stcwgwgtya ckcgctcatg 1020
 kagatmwca gcctggmgac atgcagctta gcwckggctg tcatkttacw cgctcgsact 1080
 rsgtaaaacc atgacgtmcc rctgtcgcac gcwgcacrtc yccrtatcgt cagctrcgta 1140
 wcgcgacyag ccgategatc gcctgccwgc atgccrctg atgcatgcct gmcakacggc 1200
 aywacaagtc taggcattac tggcca 1226

10

<210> 21
 <211> 1236
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

15

ES 2 583 203 T3

<400> 21

twttwwacm ttactaaata atgacagaat aggtattatt ggacctaag gaagtggtaa	60
atccactctt atgaatattt tarttcaaaa aattctgccg gacagcggca ctatagatat	120
aggrgaaaca gtaaagatag gatactattc tcaggggaatt tctgatatgg atatgaacga	180
aagggtaatt gaatacatac gtgggacatc rraatatgcg tcaacttcat cgggtgaaaa	240
aakaaktgct tctgctgtac ttgaaaattt tttatttgaa ctttcagttc aatggactcc	300
ccttgaaaaa ctktcaggag gagaacgaar aagattatat cttctaaaaa tactgatgaa	360
ttaccctaata gtacttttgc tggacgaacc aacaaatgat ctggatatag aacacttac	420
aatcctagaa gattatatta acgattttga aggagctggt atagctgtat ctcacgacag	480
gtacttcctt gacaaaacag ttgataaaat attttctttt gaaggaaacg gtaaaatcac	540
tcaatataca ggaaactatt cctattttca caaaactgca aaaatatcag aggaaaaaat	600
aagctctaag aaaaatacag ctaaaaacaa ctatragttg caaaaagaaa agcctctaaa	660
atttacctat gcagaacaaa tggagtttga caaaatagat gaggtaattg aacatctaga	720
aaaatctata tctgaaaaga aaatagaaat ggaagctgct tcatctgatt atgcacttct	780
tgaagatctc ttatccgaaa agaattcact ggaaaaagag ctagacgaaa agatggacag	840
gtggacttac ttaatgaact caatgaaaaa attgagcaag ataaaagcac tagacattgt	900
tattagcact gtctagtgtc agcgccattc gccattcatg ctgcgcaact gtgggaagg	960
cgatcgggtc ggcctcttcg ctaytacgcc agctggcgaa gggatgtgct gcaagscgat	1020
aagttggtac gccaggtttc cagtcacgac gtagwaaacg acgtcagtgct tagctgcatg	1080
tctgcagctc gagattctca tggascgtka cgtcgacytr asgatcctgg tactrrctcg	1140
attcgtatcm tggwcawtgg atmccggcgc atamctcccc tatgcattaa catgcaattc	1200
5 acgtctacta tagagtctgt tccaaaatra acgcgt	1236

<210> 22

<211> 1224

<212> ADN

10 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 22

ES 2 583 203 T3

gawtttttcm acttttataa cataactaaat aatgacagaa taggtattat tggacctaat 60
 ggaagtggta aatccactct tatgaatatt ttarttcaaa aaattctgcc ggacagcggc 120
 actatagata taggtgaaac agtaaagata ggatactatt ctcaggaat ttctgatatg 180
 gatatgaacg aaagggtaat tgaatacata cgtgggacat caraatatgc gtcaacttca 240
 tcgggtgaaa aaataagtgc ttctgctgta cttgaaaatt ttttatttga accttcagtt 300
 caatggactc cccttgaaa actttcagga ggagaacgaa raagattata tcttctaaaa 360
 atactgatga attaccctaa tgtacttttg ctggacgaac caacaaatga tctggatata 420
 gaaacactta caatcctaga agattatatt aacgattttg aaggagctgt tatagctgta 480
 tctcatgaca ggtacttctt tgacaaaaca gttgataaaa tattttcttt tgaaggaaac 540
 ggtaaatca ctcaatatac aggaaactat tcctattttc acaaaaactgc aaaaatatca 600
 gaggaaaaaa taagctctaa gaaaaataca gctaaaaaca actataagtt gcaaaaagaa 660
 aagcctctaa aatttaccta tgcagaacaa atggagtttg acaaaataga tgaggtaatt 720
 gaacatctag aaaaatctat atctgaaaag aaaatagaaa tggagctgc ttcattctgat 780
 tatgcacttc ttgaagatct cttatccgaa aagaattcac tggaaaaaga gctagacgaa 840
 aagatggaca ggtggactta cttaaataaa ctcaatgaaa aaattgagca agataaaagc 900
 actagacatt gttattagca ctgtctagtg ctagcgcctat tcgccattca ggctgmgcaa 960
 ctgtgggagg cgatcgggtgc gggcctyttc gctattacgc cagctgcgaa aggggatgtg 1020
 ctgcaagcga ttagttgggt aacscaggc tttcccagtc mcgacgtgta aacgacgcag 1080
 tgcagctgca tgtctgcagc tcgagatctc atgacgckac gtcgactcta rgatccctgt 1140
 wcgagctcga ttcgaatcat gcawtggatc msggccgatc tgmccctakg cataacatgc 1200
 aattcmcttt ctcattagaa aytg 1224

- <210> 23
- 5 <211> 1120
- <212> ADN
- <213> Clostridium autoethanogenum
- <400> 23
- 10

ES 2 583 203 T3

grramttkw aawttaaraa attkcactta tracatacta aataatgaca gartaggkat 60
 tattggacct aatggaagtg gtaaattccac tcttatgaat atttarttc aaaaaattct 120
 gccsgacagc ggcaactmtwk atataggtga aacagtaaag ataggatact attctcaggg 180
 aatttctgat atggatatga acgaaaggk aattgaatac atacktgga catcrraata 240
 tgcgtcaact tcrtcgggtg aaaaaakaag tgcttctgct gtacttgaaa attttttatt 300
 tgaaccttca gttcaatgga ctycccttg aaaamktca ggaggagaac raaraagatt 360
 atatcttcta aaaatactga tgaattacc taatgtactt ttgctggacg aaccaacaaa 420
 tgatctggat atagaaacac ttacmatcct agaagattat attwacgatt ttgaaggagc 480
 tgttatagct gtrtctcatg acaggtactt ccwtgacaar acagttgatr aaatattttc 540
 ttttgaagga aacggtaaaa tcaactcaata tacasgaaac tattcctatt ttcacrraac 600
 tgcawaaata tcagaggaaa aaatwagctc taagaaaaat acagctaaaa caactatrag 660
 ttgcaaaaag aawagcctct aaatttacct atgcagaaca aatggagttt gacaaaatag 720
 atgaggtaay tgaacatcta gaaaatctat atctgaaaga aaatagaatg gaagctgctt 780
 catctgatta tgcacttctt garatctctt atccgaaaas rattcmctgg aaaagagcta 840
 gacgaaagat ggwcagkkgc ctactwaat gactcatgaa aatgakcara tawagcmcta 900
 gamttgttat tagcactgtc trkgstagcg ccatcgatt cagctgmga actgtgggac 960
 ggcgatcgk cggctcytcg ctattacgcc agctggcaag ggaktgcctg caggcatagt 1020
 gttacswgc ttccagtccm srtkaamgac gcakgccagc tgcattgtygc agcctggatc 1080
 catggacgka gctcaacyta agaattccggt ccgrcactgt 1120

<210> 24

<211> 1210

5 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 24

traaaawttk tcactkkata acatactaaa taatgmcaga rtaggtatta ttggacctaa 60
 tggaaagtgg aawtccactc ttatgaatat ttarttcaa aaaattctgc cggacagcgg 120
 cacymtagat ataggtgaaa cagyaaagat aggatactat tctcaggaa tttctgatat 180
 ggatatgaac saaagggkaa ttgaatacat mcktgggaca tcrraakatg cstcaacttc 240
 rtcgggtgaa aaaakaaktg cttctgctgt acttgaaaat tttttatttg aaccttcagt 300

10

ES 2 583 203 T3

tcaatggact ccccttgaa aactktcarg aggagaacga araarattat atcttctaaa 360
aatactgatg aattacccta atgtactttt gctggacgaa ccaacaaatg atctggatat 420
agaaacactt acaatcctag aagattatat taacgatttt gaaggagctg ttatagctgt 480
rtctcatgac aggtacttcc ttgacaarac agttgataaa atattttctt ttgaaggaaa 540
cggtaaratc actcaatata caggaaacta ttcctatttt cacaaaactg cawaaatatac 600
agaggaaaaa ataagctcta agaaaaatac agctaaaaac aackatragt tgcaaaaaga 660
aaagcctcta aratttacct atgcagaaca aatggagttt gacaaaatag atgaggtaat 720
tgaacatcta gaaaaatcta tatctgaaaa gaaaatagaa atggaagctg ctctcatctga 780
ttatgcactt cttgaagatc tcttatccga aaagaattca ctggaaaaag agctagacka 840
aaagatggac aggtggactt acttaaatga actcaatgaa raaattgagc aagataaaaag 900
cactagacat tgttattagc actgtctagt gctagcgcca ttcgccattm agctgmgcac 960
tgtgggaagg cgatcgggtgc gggctctcgc tatacgcagc tggcgaaggg gatgtgctgc 1020
agcgatagtg gtacgcakgt ttccagtcac gacgwgaaaa cgacgtcagt gcwagctgca 1080
kkctgcagct cgratctcat ggacgctkac gtcgayctra cgatcccwgt wckrctcgat 1140
cgtatcctgt cawtgatacc gggcgcatat atgccctagt cagttaacat gcaagtckac 1200
cttctcagtg 1210

<210> 25
<211> 1206
5 <212> ADN
<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 25

aamywaatwr ggwggggttt sycaakkttta tatesttcat kttctacca ytcctcrac 60
twagcwwatw cararatggt arttckraat atgagccctt taaaacrgac ttcscacaaa 120
ggactccwgg yaakywyctk gwtcccctta cawtctcctt waycgraakg gmaakktctg 180
yatcyttgcc agaaggattg wwttcagcgc tgygwtaaat agttattggc ttrccwmkaa 240
agtcaattac aaaaatata ataaagaaag caaagctacw tatwtyamwk srttwaaggt 300
aaarmtaaaa atattataaa awtgaamtww ttttttctcw takctaaagt tacwtaatac 360
gaggaggatt wataatgaaa aaagtaatwg gaattataar yattgwmcw tttgtactmk 420
tagcacttca atcytgtgck gcakgakwwg gaartgymty awgwaatrac mwwsawkswa 480
gwgratctgc wggatwattt ttatytgkat gkatgctkat tgctggaata atagcaatra 540
waycawamyw wwktamaggt atswctataa cagctatagk atwtwatttg ttakcttttg 600
ttgyagggat wgctaaygwt gggcattttw cagattwgcw wmtttgrtca aycwttrmct 660
tgatatttgc tggactatwg atattkmatt trctkaamaw yaagcaatta tatwatakca 720
gwggraaaaa gtagaatcat atrttgtaat tatttttaat tatgttgrca amtytgawmy 780
trwcacwgaw acmctmtaa atgttttram tacatrtggt waaktwtkgt gacakatwct 840
10 aatagtakra agwagaarwt ygctatgtwa tratgacata gwggatgaatg taatgcggms 900

ES 2 583 203 T3

	gctgwrcca tatsaccatg atrcgamtyc gagctcggta csssgrgat sctctrgast	960
	ckacgtcack cgtccatgka gatcwcgagg ctgcmgwcwg cagmtrcwct ggtmcgctga	1020
	tktaywcgct gtgactrsga aaaccatgac gtmctrctay ggcattgcwg artcyccgwt	1080
	tckcagstag gtawagcgac akcgatcsm aygcccttgc cacrttgcca tctgaatgyg	1140
	akgcctgaca kmcgkccmta cagctagcat gactgaatct catgackcyt agaagacmct	1200
	gtgaca	1206
	<210> 26	
	<211> 1232	
5	<212> ADN	
	<213> Clostridium autoethanogenum	
	<400> 26	
	accymwaaat aattgmcaga ataggtatta ttggacctaa tggaagtgg aaatccactc	60
	ttatgaatat tttarttcaa aaaattctgc cggacagcgg cactmtagat ataggtgaaa	120
	cagtaaagat aggatactat tctcagggaa tttctgatat ggatatgaac gaaagggtaa	180
	ttgaatacat acktgggaca tcrraakatg cstcaacttc atcgggtgaa aaaataaktg	240
	cttctgctgt acttgaaaat tttttatttg aaccttcagt tcaatggact ccccttgaa	300
	aactktcarg aggagaacra araarattat atcttctaaa aatactgatg aattacccta	360
	atgtactttt gctggacgaa ccaacaaatg atctggatat agaaacactt acaatcctag	420
	aagattatat taacgatttt gaaggagctg ttatagctgt atctcatgac aggtacttcc	480
	ttgacaaaac asttgataaa atatcttctt ttgaaggaaa cggtwaaatc actcaatata	540
	caggaaacta ttcctatctt cacaaaactg caaaaatatac agaggaaaaa ataagctcta	600
	agaaaaatac agctaaaaac aactatragt tgcwaaaaga aaagcctcta aaatttacct	660
	atgcagaaca aatggagttt gacaaartag atgaggtaat tgaacatcta gaaaaatcta	720
	tatctgaaaa gaaaaataga atggaagctg ctctcatctga ttatgcactt cttgaagatc	780
	tcttatccga aaasaattca ctggaaaaag agctagacga aaagatggac aggtggactt	840
	acttawatga actcatgaaa aatwgagca gataaaagca ctagacattg ttattagcac	900
	tgtstagtgc tagcgccatt cgmcatcag ctgmgcacwg ytggaaggcg cgatmgygck	960
	ggctctctcg ctwytagcyc akctggcraa ggggatgtgc wgcaagmca tagttgggta	1020
	acgcaggwtw tcccagtcac kacgtagtam aygacgtcmg trctagctgc atgtctgcag	1080
	cytsrgatct catgtacgct gacgtcgacy trrmgatcc cwggatcyga gctcgattcg	1140
	tatcatgayr atggatgmgc ggcgcataac tcccttatgc mtaacrttc aattsacgtc	1200
10	ttcwtataga tckctcatag ttgarcmcgg gg	1232
	<210> 27	
	<211> 37	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
20	<400> 27	
	ccgaattcgt cgacaacaga gttgatcct ggctcag 37	
	<210> 28	
25	<211> 37	
	<212> ADN	

ES 2 583 203 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 5 <400> 28
 cccgggatcc aagcttacgg ctacctgtt acgactt 37
 10 <210> 29
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 29
 20 ttgctgtagt cactgaactg gaaaa 25
 <210> 30
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30 <400> 30
 aatcaggaca cctaaatcca accac 25
 <210> 31
 35 <211> 1940
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> nuevo gen de metiltransferasa condensado con un promotor lac inducible
 <400> 31
 gcgccgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca 60
 ctttatgctt cgggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 120
 aaacacatat gttccgtgc aatgcctata tcgaatatgg tgataaaaat atgaacagct 180
 ttatcgaaga tgtggaacag atctacaact tcattaataa gaacattgat gtggaagaaa 240
 agatgcattt cattgaaacc tataaacaga aaagcaacat gaagaaagag attagcttta 300
 gcgaagaata ctataaacag aagattatga acggcaaaaa tggcgttgtg tacacccgc 360
 cggaaatggc ggcctttatg gttaaaaatc tgatcaacgt taacgatgtt attggcaatc 420
 cgtttattaa aatcattgac ccgagctgcg gtagcggcaa tctgatttgc aatggtttc 480
 45

ES 2 583 203 T3

tgtatctgaa tcgcatcttt attaagaaca ttgaggtgat taacagcaaa aataacctga 540
atctgaaact ggaagacatc agctaccaca tcgttcgcaa caatctgttt ggcttcgata 600
ttgacgaaac cgcgatcaaa gtgctgaaaa ttgactgtt tctgatcagc aaccaattta 660
gcgagaaaaa tttccagggt aaagactttc tggtgaaaaa tattgatcgc aaatatgacg 720
tgttcattgg taatccgccg tatatcggtc acaaaagcgt ggacagcagc tacagctacg 780
tgctgcgcaa aatctacggc agcatctacc gcgacaaagg cgatatcagc tattgtttct 840
ttcagaagag cctgaaatgt ctgaaggaag gtggcaaac ggtgtttgtg accagccgct 900
acttctgcga gagctgcagc ggtaaagaac tgcgtaaat cctgatcgaa aacacgagca 960
tttacaagat cattgatttt tacggcatcc gcccgttcaa acgcgtgggt atcgatccga 1020
tgattatfff tctggttcgt acgaagaact ggaacaataa cattgaaatt attcgcccga 1080
acaagattga aaagaacgaa aagaacaaat tcctggatag cctgttcctg gacaaaagcg 1140
aaaagtgtaa aaagtttagc attagccaga aaagcattaa taacgatggc tgggttttcg 1200
tggacgaagt ggagaaaaac attatcgaca aatcaaaga gaaaagcaag ttcattctga 1260
aagatatttg ccatagctgt caaggcatta tcaccggttg tgatcgcgcc tttattgtgg 1320
accgtgatat catcaatagc cgtaagatcg aactgctct gattaaaccg tggattaaaa 1380
gcagccatat ccgtaagaat gaagttatta agggcgaaaa attcatcatc tatagcaacc 1440
tgattgagaa tgaaaccgag tgtccgaatg cgattaaata tatcgaacag tacaagaaac 1500
gtctgatgga gcgccgcaa tgcaaaaagg gcacgcgtaa gtggtatgaa ctgcaatggg 1560
gccgtaaac ggaaatcttc gaagaaaaga aaattgtttt cccgtataaa agctgtgaca 1620
atcgttttgc actggataag ggtagctatt ttagcgcaga catttatagc ctggttctga 1680
agaaaaatgt gccgttcacc tatgagatcc tgctgaatat cctgaatagc ccgctgtacg 1740
agttttactt taagaccttc gcgaaaaagc tgggcgagaa tctgtacgag tactatccga 1800
acaacctgat gaagctgtgc atcccagca tcgatttcgg cggtgagaac aatattgaga 1860
aaaagctgta tgatttcttt ggtctgacgg ataaagaaat tgagattgtg gagaagatca 1920
aagataactg ctaagaattc 1940

<210> 32

<211> 601

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 32

Met Phe Pro Cys Asn Ala Tyr Ile Glu Tyr Gly Asp Lys Asn Met Asn
1 5 10 15

Ser Phe Ile Glu Asp Val Glu Gln Ile Tyr Asn Phe Ile Lys Lys Asn
20 25 30

10 Ile Asp Val Glu Glu Lys Met His Phe Ile Glu Thr Tyr Lys Gln Lys
35 40 45

ES 2 583 203 T3

Ser Asn Met Lys Lys Glu Ile Ser Phe Ser Glu Glu Tyr Tyr Lys Gln
50 55 60

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

Ala Ala Phe Met Val Lys Asn Leu Ile Asn Val Asn Asp Val Ile Gly
85 90 95

Asn Pro Phe Ile Lys Ile Ile Asp Pro Ser Cys Gly Ser Gly Asn Leu
100 105 110

Ile Cys Lys Cys Phe Leu Tyr Leu Asn Arg Ile Phe Ile Lys Asn Ile
115 120 125

Glu Val Ile Asn Ser Lys Asn Asn Leu Asn Leu Lys Leu Glu Asp Ile
130 135 140

Ser Tyr His Ile Val Arg Asn Asn Leu Phe Gly Phe Asp Ile Asp Glu
145 150 155 160

Thr Ala Ile Lys Val Leu Lys Ile Asp Leu Phe Leu Ile Ser Asn Gln
165 170 175

Phe Ser Glu Lys Asn Phe Gln Val Lys Asp Phe Leu Val Glu Asn Ile
180 185 190

Asp Arg Lys Tyr Asp Val Phe Ile Gly Asn Pro Pro Tyr Ile Gly His
195 200 205

Lys Ser Val Asp Ser Ser Tyr Ser Tyr Val Leu Arg Lys Ile Tyr Gly
210 215 220

Ser Ile Tyr Arg Asp Lys Gly Asp Ile Ser Tyr Cys Phe Phe Gln Lys
225 230 235 240

Ser Leu Lys Cys Leu Lys Glu Gly Gly Lys Leu Val Phe Val Thr Ser
245 250 255

Arg Tyr Phe Cys Glu Ser Cys Ser Gly Lys Glu Leu Arg Lys Phe Leu
260 265 270

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

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

Thr Lys Asn Trp Asn Asn Asn Ile Glu Ile Ile Arg Pro Asn Lys Ile
305 310 315 320

ES 2 583 203 T3

Glu Lys Asn Glu Lys Asn Lys Phe Leu Asp Ser Leu Phe Leu Asp Lys
 325 330 335

Ser Glu Lys Cys Lys Lys Phe Ser Ile Ser Gln Lys Ser Ile Asn Asn
 340 345 350

Asp Gly Trp Val Phe Val Asp Glu Val Glu Lys Asn Ile Ile Asp Lys
 355 360 365

Ile Lys Glu Lys Ser Lys Phe Ile Leu Lys Asp Ile Cys His Ser Cys
 370 375 380

Gln Gly Ile Ile Thr Gly Cys Asp Arg Ala Phe Ile Val Asp Arg Asp
 385 390 395 400

Ile Ile Asn Ser Arg Lys Ile Glu Leu Arg Leu Ile Lys Pro Trp Ile
 405 410 415

Lys Ser Ser His Ile Arg Lys Asn Glu Val Ile Lys Gly Glu Lys Phe
 420 425 430

Ile Ile Tyr Ser Asn Leu Ile Glu Asn Glu Thr Glu Cys Pro Asn Ala
 435 440 445

Ile Lys Tyr Ile Glu Gln Tyr Lys Lys Arg Leu Met Glu Arg Arg Glu
 450 455 460

Cys Lys Lys Gly Thr Arg Lys Trp Tyr Glu Leu Gln Trp Gly Arg Lys
 465 470 475 480

Pro Glu Ile Phe Glu Glu Lys Lys Ile Val Phe Pro Tyr Lys Ser Cys
 485 490 495

Asp Asn Arg Phe Ala Leu Asp Lys Gly Ser Tyr Phe Ser Ala Asp Ile
 500 505 510

Tyr Ser Leu Val Leu Lys Lys Asn Val Pro Phe Thr Tyr Glu Ile Leu
 515 520 525

Leu Asn Ile Leu Asn Ser Pro Leu Tyr Glu Phe Tyr Phe Lys Thr Phe
 530 535 540

Ala Lys Lys Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Glu Tyr Tyr Pro Asn Asn Leu
 545 550 555 560

Met Lys Leu Cys Ile Pro Ser Ile Asp Phe Gly Gly Glu Asn Asn Ile
 565 570 575

Glu Lys Lys Leu Tyr Asp Phe Phe Gly Leu Thr Asp Lys Glu Ile Glu
 580 585 590

Ile Val Glu Lys Ile Lys Asp Asn Cys
 595 600

5 <210> 33
 <211> 2781
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Plásmido sintético

<400> 33

ES 2 583 203 T3

tttgccacct gacgtctaag aaaaggaata ttcagcaatt tgcccgtgcc gaagaaaggc	60
ccaccctgta aggtgagcca gtgagttgat tgctacgtaa ttagttagtt agcccttagt	120
gactcgtaat acgactcact atagggctcg agtctagaga attcgatata acccgggaac	180
tagtctgcag ccctttagtg agggttaatt ggagtacta agggtagtt agttagatta	240
gcagaaagtc aaaagcctcc gaccggaggc ttttgactaa aacttcctt ggggttatca	300
ttggggctca ctcaaaggcg gtaatcagat aaaaaaatc cttagctttc gctaaggatg	360
atctctgcta gagatggaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg	420
cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg	480
tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc	540
tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt	600
gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt	660
gatttaaac ttcatTTTTA atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc	720
atgacaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagacct cttataaga	780
tgatcttctt gagatcgttt tggctctgcg gtaatctctt gctctgaaaa cgaaaaacc	840
gccttgcagg gcggtttttc gaaggttctc tgagctacca actctttgaa ccgaggtaac	900
tggcttggag gagcgcagtc accaaaactt gtcctttcag tttagcctta accggcgc	960
gacttcaaga ctaactcctc taaatcaatt accagtggct gctgccagtg gtgcttttgc	1020
atgtctttcc gggttggact caagacgata gttaccgat aaggcgcagc ggtcggactg	1080
aacggggggt tcgtgcatac agtccagctt ggagcgaact gcctaccgg aactgagtgt	1140
caggcgtgga atgagacaaa cgggccata acagcggat gacaccgga aaccgaaagg	1200
caggaacagg agagcgcacg agggagccgc caggggaaac gcctggtatc tttatagtcc	1260
tgctcgggtt cgccaccact gatttgagcg tcagatttcg tgatgcttgt caggggggcg	1320
gagcctatgg aaaaacggct ttgccgcggc cctctcactt ccctgttaag tatcttctg	1380
gcatcttcca ggaaatctcc gccccgttcg taagccattt ccgctcggc cagtcgaacg	1440
accgagcgtg gcgagtcagt gagcaggaa gcggaatata tcctgtatca catattctgc	1500
tgacgcaccg gtgcagcctt ttttctctg ccacatgaag cacttactg acaccctcat	1560
cagtccaac atagtaagcc agtatacact ccgctagcgc tgaggtctgc ctcgtgaaga	1620

ES 2 583 203 T3

agggtgtgct gactcatacc aggcctgaat cgccccatca tccagccaga aagtgagggg 1680
gccacgggtg atgagagcct tgttgtaggt ggaccagttg gtgattttga acttttgctt 1740
tgccacggaa cggctcgcgt tgtcgggaag atgcgtgatc tgatccttca actcagcaaa 1800
agttcgattt attcaacaaa gccacgttgt gtctcaaaaat ctctgatggt acattgcaca 1860
agataaaaat atatcatcat gaacaataaa actgtctgct tacataaaca gtaatacaag 1920
gggtgtttac tagaggttga tcgggcacgt aagaggttcc aactttcacc ataataaaat 1980
aagatcacta ccgggcgtat tttttgagtt atcgagattt tcaggagcta aggaagctaa 2040
aatggagaaa aaaatcacgg gatataccac cgttgatata tcccaatggc atcgtaaaga 2100
acattttgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat aaccagaccg ttcagctgga 2160
tattacggcc tttttaaaga ccgtaaagaa aaataagcac aagttttatc cggcctttat 2220
tcacattctt gcccgcctga tgaacgctca cccggagttt cgtatggcca tgaaagacgg 2280
tgagctgggt atctgggata gtgttcacc ttgttacacc gttttccatg agcaaaactga 2340
aacgttttcg tccctctgga gtgaatacca cgacgatttc cggcagtttc tccacatata 2400
ttcgcaagat gtggcgtggt acgggtgaaa cctggcctat tccctaag ggtttattga 2460
gaatatgttt tttgtctcag ccaatccctg ggtgagtttc accagttttg atttaaacgt 2520
ggccaatatg gacaacttct tcgccccgt tttcacgatg ggcaaatatt atacgcaagg 2580
cgacaagggt ctgatgccgc tggcgatcca ggttcatcat gccgtttgtg atggcttcca 2640
tgtcggccgc atgcttaatg aattacaaca gtactgtgat gagtggcagg gcggggcgta 2700
ataatactag ctccggcaaa aaaacgggca aggtgtcacc accctgccct ttttctttaa 2760
aaccgaaaag attacttcgc g 2781

<210> 34

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 34

Met Lys Gly Phe Ala Met Leu Gly Ile Asn Lys Leu Gly Trp Ile Glu
1 5 10 15

Lys Lys Asn Pro Val Pro Gly Pro Tyr Asp Ala Ile Val His Pro Leu
20 25 30

Ala Val Ser Pro Cys Thr Ser Asp Ile His Thr Val Phe Glu Gly Ala
35 40 45

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

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

ES 2 583 203 T3

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

Ala Gly Phe Gln Gln His Ser Asn Gly Met Leu Ala Gly Trp Lys Phe
100 105 110

Ser Asn Phe Lys Asp Gly Val Phe Ala Asp Tyr Phe His Val Asn Asp
115 120 125

Ala Asp Met Asn Leu Ala Ile Leu Pro Asp Glu Ile Pro Leu Glu Ser
130 135 140

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

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

Ala Val Gly Leu Met Gly Ile Ala Gly Ser Lys Leu Arg Gly Ala Gly
180 185 190

Arg Ile Ile Gly Val Gly Ser Arg Pro Val Cys Val Glu Thr Ala Lys
195 200 205

Phe Tyr Gly Ala Thr Asp Ile Val Asn Tyr Lys Asn Gly Asp Ile Val
210 215 220

Glu Gln Ile Met Asp Leu Thr His Gly Lys Gly Val Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Met Ala Gly Gly Gly Ala Glu Thr Leu Ala Gln Ala Val Thr Met Val
245 250 255

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

Thr Leu Pro Ile Pro Arg Val Gln Trp Gly Cys Gly Met Ala His Lys
275 280 285

Thr Ile Arg Gly Gly Leu Cys Pro Gly Gly Arg Leu Arg Met Glu Met
290 295 300

Leu Arg Asp Leu Val Leu Tyr Lys Arg Val Asp Leu Ser Lys Leu Val
305 310 315 320

Thr His Val Phe Asp Gly Ala Glu Asn Ile Glu Lys Ala Leu Leu Leu
325 330 335

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

<210> 35

<211> 1056

<212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 35

5

ES 2 583 203 T3

atgaaagggt ttgcaatggt aggtattaac aaattaggat ggattgaaaa gaaaaaccca 60
 gtgccaggtc cttatgatgc gattgtacat cctctagctg tatcccatg tacatcagat 120
 atacatacgg tttttgaagg agcacttggg aatagggaaa atatgatttt aggccatgaa 180
 gctgtagggt aaatagccga agttggcagc gaagttaaag attttaaagt tggcgataga 240
 gttatcgtac catgcacaac acctgactgg agatctttag aagtccaagc tggttttcag 300
 cagcattcaa acggtatgct tgcaggatgg aagttttcca attttaaaga cgggtgtattt 360
 gcagattact ttcattgaaa cgatgcagat atgaatcttg ccatactccc agatgaaata 420
 cctttagaaa gtgcagttat gatgacagac atgatgacta ctggttttca tggagcagaa 480
 cttgcagaca taaaaatggg ctccagcgtt gtagtaattg gtataggagc tgttggatta 540
 atgggaatag cgggttccaa acttcgagga gcaggcagaa ttatcgggtg tggaaacaga 600
 cctgtttgtg ttgaaacagc taaattttat ggagcaactg atattgtaaa ttataaaaat 660
 ggtgatatag ttgaacaaat catggactta actcatggta aagggtgtaga ccgtgtaatc 720
 atggcaggcg gtggtgctga aacactagca caagcagtaa ctatggttaa acctggcggc 780
 gtaatttcta acatcaacta ccatggaagc ggtgatactt taccaatacc tcgtgttcaa 840
 tggggctgcg gcatggctca caaaactata agaggaggat tatgccccgg cggacgtctt 900
 agaatggaaa tgctaagaga tcttgttcta tataaacgtg ttgatttgag taaacttggt 960
 actcatgtat ttgatggtgc agaaaatatt gaaaaggccc ttttgcttat gaaaaataag 1020
 ccaaaagatt taattaaatc agtagttaca ttctaa 1056

<210> 36

<211> 1056

5 <212> ADN

<213> Clostridium ljungdahlii

<400> 36

atgaaagggt ttgcaatggt aggtattaac aaattaggat ggattgaaaa gaaaaaccca 60
 gtgccaggtc cttatgatgc gattgtacat cctctagctg tatcccatg tacatcagat 120
 atacatacgg tttttgaagg agcacttggg aatagggaaa atatgatttt aggccatgaa 180
 gctgtagggt aaatagccga agttggcagc gaagttaaag attttaaagt tggcgataga 240
 gttatcgtac catgcacaac acctgactgg agatctttag aagtccaagc tggttttcag 300
 cagcattcaa acggtatgct tgcaggatgg aagttttcca attttaaaga tgggtgtattt 360
 gcagattact ttcattgaaa cgatgcagat atgaatcttg ccatactccc agatgaaata 420
 cctttagaaa gtgcagttat gatgacagac atgatgacta ctggttttca tggagcagaa 480
 10 cttgcagaca taaaaatggg ctccagcgtt gtagtaattg gtataggagc tgttggatta 540
 atgggaatag cgggttccaa acttcgagga gcaggcagaa ttatcgggtg tggaaacaga 600
 cctgtttgtg ttgaaacagc taaattttat ggagcaactg atattgtaaa ttataaaaat 660
 ggtgatatag ttgaacaaat catggactta actcatggta aagggtgtaga ccgtgtaatc 720
 atggcaggcg gtggtgctga aacactagca caagcagtaa ctatggttaa acctggcggc 780
 gtaatttcta acatcaacta ccatggaagc ggtgatactt taccaatacc tcgtgttcaa 840
 tggggctgcg gcatggctca caaaactata agaggaggat tatgccccgg cggacgtctt 900
 agaatggaaa tgctaagaga tcttgttcta tataaacgtg ttgatttgag taaacttggt 960
 actcatgtat ttgatggtgc agaaaatatt gaaaaggccc ttttgcttat gaaaaataag 1020
 ccaaaagatt taattaaatc agtagttaca ttctaa 1056

ES 2 583 203 T3

<210> 37
 <211> 1056
 <212> ADN
 <213> Clostridium ragsdalei

5

<400> 37

```

atgaaagggt ttgcaatggt aggtattaac aagttaggat ggattgaaaa gaaaaaccca      60
gtaccagggtc cttatgatgc gattgtacat cctctagctg tatccccatg tacatcagat      120
atacatacgg tttttgaagg agcacttggt aatagggaaa atatgatttt aggtcacgaa      180
gctgtagggtg aaatagctga agttggcagt gaagttaaag attttaaagt tggcgataga      240
gttatcgtac catgcacaac acctgactgg agatccttag aagtccaagc tggttttcaa      300
cagcattcaa acggtatgct tgcaggatgg aagttttcca attttaaaga cgggtgtattt      360
gcagattact ttcattgaaa cgatgcagat atgaatcttg caatacttcc agatgaaata      420
cctttagaaa gtgcagttat gatgacagac atgatgacta ctggttttca tggggcagaa      480
cttgctgaca taaaaatggg ttccagtgtt gtcgtaattg gtataggagc tgttgatta      540
atgggaatag ccggttccaa acttcgagga gcaggtagaa ttatcgggtg tggaaagcaga      600
cccgtttgtg ttgaaacagc taaattttat ggagcaactg atattgtaa ttataaaaat      660
ggtgatatag ttgaacaaat aatggactta actcatggta aagggtgtaga ccgtgtaatc      720
atggcaggcg gtggtgctga aacactagca caagcagtaa ctatgggtta acctggcggc      780
gtaatttcta acatcaacta ccatggaagc ggtgatactt tgccaatacc tcgtgttcaa      840
tggggctgcg gcatggctca caaaactata agaggagggt tatgtcccgg cggacgtctt      900
agaatggaaa tgctaagaga cttgttcta tataaacgtg ttgatttgag caaacttgtt      960
actcatgtat ttgatgggtc agaaaatatt gaaaaggccc ttttgcttat gaaaaataag     1020
ccaaaagatt taattaaatc agtagttaca ttctaa                                  1056
    
```

10 <210> 38
 <211> 1230
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

15 <400> 38

ES 2 583 203 T3

atgaacaatt taaaggaaga agcattaaag tttcataaag aacatgaagg taaaatagca 60
 cttaaaagta aagtatctgt taaaactaga gaggacctag gcttagcata tactccaggt 120
 gttgctgaac catgtcttga aatcaacagg gactataata cgttatacga ttatacttct 180
 aagggaaatt atgtagcagt agtaactaac ggcagtgcag ttttgggact tggaaatata 240
 ggtgctgcag ctggcctacc tgtaatggaa ggtaaactta ttctatttaa gacttttgca 300
 ggagtagacg cttttcctat ttgtgttgac agcaaagatc ctgacaagat tgtagaaca 360
 gtaaaattaa tagaatccac atttgaggga ataaacctag aagatataaa agcacctgag 420
 tgctttgaaa tagaagataa attaaaaaag gtctgcaata taccagtttt tcatgacgac 480
 cagcacggaa cagcagtagt aacttttagct gctatgataa atgcacttaa aatagtaaac 540
 aaaaaatttg aagacttaaa agtaataata aatggtgcag gagctgcagg tacagcaatt 600
 gcaaaaactgc ttgtaagtag aggagttaaa aacattattg tatgcatag aaaagggtct 660
 atatcaaaag atagagaaaa ttttaagtct gcaaaaaaag acctagcaga agttacaaat 720
 cctagtatga taaaagggtc acttaaaagat gtactaaaag aagctgatgt attcataggt 780
 gtatctgctc ctggagtaat tactcctgaa atgataaaaa caatggctaa agatcccctc 840
 atttttgcta tggccaatcc taagcctgaa atctaccctg atgaagcaaa agctgcaggt 900
 gccagagtag ttggtacggg aagatcagat ttcccaaadc aataaataa tgttcttgca 960
 tttcctggaa tatttagagg agcacttgat gtaagggcat caaaaataaa tgaagaaatg 1020
 aaaatagctg ctgcatgtgc tatagcagac ataataactg aaaaagaact taatgaagat 1080
 tatgttatac cagatgcttt tgactcaaga atagaccaa aggtagctta ttatgtagca 1140
 aaggctgcca tagaaagtgg agttgcaaga agaactgaca tcactcctga aatggtagaa 1200
 gaacatacta aaaagcttgt acaagcataa 1230

<210> 39

<211> 409

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 39

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

Gly Lys Ile Ala Leu Lys Ser Lys Val Ser Val Lys Thr Arg Glu Asp
 20 25 30

Leu Gly Leu Ala Tyr Thr Pro Gly Val Ala Glu Pro Cys Leu Glu Ile
 35 40 45

Asn Arg Asp Tyr Asn Thr Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Lys Gly Asn Tyr
 50 55 60

10 Val Ala Val Val Thr Asn Gly Ser Ala Val Leu Gly Leu Gly Asn Ile
 65 70 75 80

ES 2 583 203 T3

Gly Ala Ala Ala Gly Leu Pro Val Met Glu Gly Lys Ser Ile Leu Phe
85 90 95

Lys Thr Phe Ala Gly Val Asp Ala Phe Pro Ile Cys Val Asp Ser Lys
100 105 110

Asp Pro Asp Lys Ile Val Glu Thr Val Lys Leu Ile Glu Ser Thr Phe
115 120 125

Gly Gly Ile Asn Leu Glu Asp Ile Lys Ala Pro Glu Cys Phe Glu Ile
130 135 140

Glu Asp Lys Leu Lys Lys Val Cys Asn Ile Pro Val Phe His Asp Asp
145 150 155 160

Gln His Gly Thr Ala Val Val Thr Leu Ala Ala Met Ile Asn Ala Leu
165 170 175

Lys Ile Val Asn Lys Lys Phe Glu Asp Leu Lys Val Ile Ile Asn Gly
180 185 190

Ala Gly Ala Ala Gly Thr Ala Ile Ala Lys Leu Leu Val Ser Arg Gly
195 200 205

Val Lys Asn Ile Ile Val Cys Asp Arg Lys Gly Ala Ile Ser Lys Asp
210 215 220

Arg Glu Asn Leu Ser Ala Ala Lys Lys Asp Leu Ala Glu Val Thr Asn
225 230 235 240

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

Val Phe Ile Gly Val Ser Ala Pro Gly Val Ile Thr Pro Glu Met Ile
260 265 270

Lys Thr Met Ala Lys Asp Pro Leu Ile Phe Ala Met Ala Asn Pro Lys
275 280 285

Pro Glu Ile Tyr Pro Asp Glu Ala Lys Ala Ala Gly Ala Arg Val Val
290 295 300

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

Phe Pro Gly Ile Phe Arg Gly Ala Leu Asp Val Arg Ala Ser Lys Ile
325 330 335

Asn Glu Glu Met Lys Ile Ala Ala Ala Cys Ala Ile Ala Asp Ile Ile
340 345 350

Thr Glu Lys Glu Leu Asn Glu Asp Tyr Val Ile Pro Asp Ala Phe Asp
355 360 365

Ser Arg Ile Ala Pro Lys Val Ala Tyr Tyr Val Ala Lys Ala Ala Ile
370 375 380

Glu Ser Gly Val Ala Arg Arg Thr Asp Ile Thr Pro Glu Met Val Glu
385 390 395 400

Glu His Thr Lys Lys Leu Val Gln Ala
405

ES 2 583 203 T3

<210> 40
 <211> 1230
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

5

<400> 40
 atgaatctaa gagaaactgc attaaaattt cacaaagaca acgaaggtaa aattgacta 60
 aaatgcaagg tgccggttaa aaacaaagaa gacctaacgt tagcatatac acctggagtt 120
 gcagaacctt gcttagaaat taataaaaat ccagaatgca tttatgacta tacatcaaaa 180
 gggaaattggg tagctgttgt aacaaatggt acagctgttc ttggccttgg aaatataggt 240
 gcagggtcag gacttcctgt tatggaggga aaatccgttt tatttaaac ttttgctgga 300
 gtagatgcat ttccaatag tctggaaagc aaggatatca atgaaattgt agcagctgta 360
 aaacttatgg aaccaacttt tggaggaata aatctagagg acatcaaagc tccagaatgc 420
 tttgaaattg aatcaaagct taaagaagtt tgtaacatcc ctgtatttca tgacgatcaa 480
 catggaacgg cagttgtttc atcagcctgt cttataaatg cattaaagat agtaaataaa 540
 aaatttgaag acttaaaaat tgttgtaaat ggagcaggag cagcaggaac tgccattaca 600
 aaacttttaa taaagatggg aacaaaaaat gtaatacttt gcgacactaa aggtgctata 660
 tacaagagaa gaccaattgg aatgaataag ttttaaggatg aaatggcaga aataacaat 720
 cctaactctc agaaaggaac tcttgctgat gttttaaaag gtgcagatgt attttagga 780
 gtatctgcag ctaattgtgt aactgaagaa atggtaaagt ccatgaataa agattcaata 840
 attatggcaa tggcaaatcc aaatccagaa atacttcctg atttagctat aaaagctgga 900
 gctaaagtgg tatgtacagg aaggtcggat tttccaaatc aggttaacaa tgtacttgct 960
 tttccaggaa tatttagggg agcttttagat gtaagggcaa gtgaaataaa tgatgagatg 1020
 aaaatagctg cagcatatgc aatagcagaa cttgtaagtg aagaagaatt gaaaccagac 1080
 tatataatac ctaatgcttt tgacttgaga atagcccaa aagtagccgc atacgtagca 1140
 aaagctgcta ttgatacagg tgttgcgagg aaaaaggatg tcaactccaga gatggttgaa 1200
 aaacatacta agactttgct tggaaatctaa 1230

10 <210> 41
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Clostridium autoethanogenum

15 <400> 41

ES 2 583 203 T3

Met Asn Leu Arg Glu Thr Ala Leu Lys Phe His Lys Asp Asn Glu Gly
 1 5 10 15

Lys Ile Ala Leu Lys Cys Lys Val Pro Val Lys Asn Lys Glu Asp Leu
 20 25 30

Thr Leu Ala Tyr Thr Pro Gly Val Ala Glu Pro Cys Leu Glu Ile Asn
 35 40 45

Lys Asn Pro Glu Cys Ile Tyr Asp Tyr Thr Ser Lys Gly Asn Trp Val
 50 55 60

Ala Val Val Thr Asn Gly Thr Ala Val Leu Gly Leu Gly Asn Ile Gly
 65 70 75 80

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

Thr Phe Ala Gly Val Asp Ala Phe Pro Ile Cys Leu Glu Ser Lys Asp
 100 105 110

Ile Asn Glu Ile Val Ala Ala Val Lys Leu Met Glu Pro Thr Phe Gly
 115 120 125

Gly Ile Asn Leu Glu Asp Ile Lys Ala Pro Glu Cys Phe Glu Ile Glu
 130 135 140

Ser Lys Leu Lys Glu Val Cys Asn Ile Pro Val Phe His Asp Asp Gln
 145 150 155 160

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

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

Gly Ala Ala Gly Thr Ala Ile Thr Lys Leu Leu Ile Lys Met Gly Thr
 195 200 205

Lys Asn Val Ile Leu Cys Asp Thr Lys Gly Ala Ile Tyr Lys Arg Arg
 210 215 220

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

Pro Asn Leu Gln Lys Gly Thr Leu Ala Asp Val Leu Lys Gly Ala Asp
 245 250 255

ES 2 583 203 T3

Val Phe Leu Gly Val Ser Ala Ala Asn Cys Val Thr Glu Glu Met Val
 260 265 270
 Lys Ser Met Asn Lys Asp Ser Ile Ile Met Ala Met Ala Asn Pro Asn
 275 280 285
 Pro Glu Ile Leu Pro Asp Leu Ala Ile Lys Ala Gly Ala Lys Val Val
 290 295 300
 Cys Thr Gly Arg Ser Asp Phe Pro Asn Gln Val Asn Asn Val Leu Ala
 305 310 315
 Phe Pro Gly Ile Phe Arg Gly Ala Leu Asp Val Arg Ala Ser Glu Ile
 325 330 335
 Asn Asp Glu Met Lys Ile Ala Ala Ala Tyr Ala Ile Ala Glu Leu Val
 340 345 350
 Ser Glu Glu Glu Leu Lys Pro Asp Tyr Ile Ile Pro Asn Ala Phe Asp
 355 360 365
 Leu Arg Ile Ala Pro Lys Val Ala Ala Tyr Val Ala Lys Ala Ala Ile
 370 375 380
 Asp Thr Gly Val Ala Arg Lys Lys Asp Val Thr Pro Glu Met Val Glu
 385 390 395 400
 Lys His Thr Lys Thr Leu Leu Gly Ile
 405

- <210> 42
- <211> 1098
- 5 <212> ADN
- <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 42

```

atgcataca ccaaagtaa atatgaagat ataaaaaagc tgtgtaattt ggtctttgag      60
aaatttggat tcaaccggga agatagtgaa accataacta gcgttttgct tttatcagat      120
ctatatggaa ttgaatccca tggattcaa aggctggtaa agtactacag tgaataaaaa      180
agtggtctta taaatatcaa ttctaaaata aaaatagtaa aggaaacacc tgtatctgca      240
acaatagatg gcatgggagg tatgggacag ctaattggta aaaaagctat gaatctggca      300
attaaaaaag ctaaaacttc aggaatgagt atggtagtgg ttagaaattc aatcactat      360
ggtattgcag gctactatgc caaatggct gaggaggaag gacttcttgg aattcaatg      420
accaactctc cagctgtaat ggtaccaacc tttggaaaag atgctatgct tggcacaat      480
cctattgcca tatcttttcc agctaaaccc taccatittt taatggatat ggctactagc      540
gtagttacta ggggaaaaat tgaagtttat aacaaaaggc atgaacctct tccccttggt      600
    
```

10

ES 2 583 203 T3

ctagctttaa atagtgatgg tgaagatact acagatccc⁻tagatgtact tcttaatgta 660
 cgaaaaaatt ctggaggagg actgcttcct cttggaggat caaaagaatc aactggagga 720
 cataaagggtt atggatttgc acttgcagtt gaaatgttta cagcaat^{ttt} atctggagga 780
 tttactgcaa ataaagttag cttagatagg gaaaatggat ctggaacatg tcattatttc 840
 tttgcagtgg attatggat atttggggat aaacaatcca ttgaagagaa cttttccagc 900
 tacctaaatg aacttagaaa ttcaaagaaa gcaaaaggcg ccacaagaat atatactcat 960
 ggtgagaaag aagtagaatc ctataaggat aaaatgaaaa atggaattcc agtaaacgac 1020
 actactctta aagaaatata cgacatatgt gactacttta gcataaaagc tagtgactat 1080
 gtaactaaag tagtataa 1098

<210> 43

<211> 365

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 43

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

10

ES 2 583 203 T3

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

<210> 44
 <211> 2640
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 44

atgaatggta agaagtacgt ttatcttttc aatgaaggaa atgctggcat gagaaattta	60
cttggaggca agggagctaa tcttgcagaa atgaccaatc ttggcatacc cgttcccggg	120
ggatttacta tatccacaga ggcattgtacc aaatattatg aagatggtaa atctatatcg	180
cagcaagtta tagatcaaat ttatgatgca cttaaaaatg tggaagagac aacaggaaaa	240
aaatttggaa gcatagaaaa tccattgtta gtttcagtaa gatcaggagc cagagtttct	300
atgccaggaa tgatggatac tatattaaat ttaggattaa atgatgatac tgtaatagga	360

5

10

ES 2 583 203 T3

cttaaaaagt tgacaggaaa tgaagattt gcgtaigatt cttatagaag atttattcaa 420
 atgttttcag atgtagttat gggaaattgaa aagagagaat ttgaagatgt attggatgat 480
 gtaaaaaatg ctaaaggagt aaaatacgat acagatttag atgagtccga tttaaagaat 540
 ataatccaga gatttaagga tatttataaa aaagaagtaa aggaagactt tcctcaagat 600
 cctaaagaac aattaattca gtcagttact gcagtattca gatcttggga aaatcctaga 660
 gcaataatth atagaagggt aaacgacata tcaggtgatt ggggaactgc agtaaatggt 720
 caatcaatgg tatttgaaa tatgggagaa acttcaggaa ctggagttgc atttactaga 780
 aatccatcta caggagaaaa gtccatattt ggtgaatata tcataaatgc tcaaggagag 840
 gatgtagttg caggaataag aacacctcaa cctataacaa agctaaaaga agaccttcca 900
 gaatgttatt ctcaatttat gagtatagca aataagcttg aaaatcatta taaagatatg 960
 caggatatgg agttcactat agaacagggg aaattgtatt tccttcagac aagaaacggt 1020
 aagagaacag ctcaagctgc acttagaata gcagtaaata tggtagatga aggtctcatc 1080
 actaaagaag aggccatact taaagttgag cctaaacagc tcgatacact attgcatcca 1140
 aactttgaca gtgatgaatt gaaacgggca gttgtaatag caaatggact tcctgcatca 1200
 ccaggagcag cttgtggtaa gatataatth acagcagatg atgctaagaa acatcatgat 1260
 caaggtgaaa aggtaatact tgtaaggcta gagacttctc cagaagatat agaaggaatg 1320
 gcagcttctg aaggaatact tacagttaga ggaggcatga catctcatgc agctgttgta 1380
 gcaagaggta tgggaacatg ctgtgtagct ggatgtggtg atcttatcgt aagtgaaaag 1440
 gaaaagctth tcaaaagatt agataaggtt tacaagaag gggattacat atctttagat 1500
 ggaagtactg gaaatgtata tggagagcct ataaagactg tagcaccaga aatatcagga 1560
 gattttggaa tcttcatggg atgggctgac aatataagaa aattgggagt tagaacaat 1620
 gcagatacac caagagatgc aaaccaggct attagctthg gtgccgaagg aataggactt 1680
 tgtagaacag agcatatgth ctttgatgaa gatagaatac cagaaatgag ggaaatgata 1740
 gtttcaaaaa cggaagagca gaggagaaaa gctthtagata aattactacc aagacaaaag 1800
 aaagatttht ttggaatata tgaggcaatg gaaggaaaac ctgtcacaat tagatttht 1860
 gatccaccac ttcataatg cttacctact gaaactgagg atatagatc tttagccaag 1920
 gaaatgggag taagthtca agaactaaaa gatactatag attctctaca tgaatttht 1980
 cctatgatgg ggcatagagg atgcaggctt actgthtcat atccagaaat agctgaaatg 2040
 caaacaaggg ctattataga agcagctata gatgttaaaa agagaaaagg gtatgatata 2100
 gttccagaaa ttatgatacc tctttagga gaaataaaa aattaaaata tghtaaagac 2160
 gtatgttga gggtagcaga tgaaataata caaaaaggag gaatcaatth aaaatatgaa 2220
 gtaggaacta tgatagaat tccaagagca gctattacag ctgatgaaat agctaaagaa 2280
 gctgagtht tctcattgg aactaatgat ttaactcaa tgactthtgg atthtcaaga 2340
 gatgatgcag gtaaattht gaatgattat tatgataaaa aagtatatga gthtgcata 2400
 ttccaaagg tagatcaagt tggagtagga aaactgttag agactgctgt aaaattagg 2460
 aaaaagacta gacctgacat tcatcttgg atatgtggag aacatggagg agatccatct 2520
 tctgtagagt thtccacaa ttaggactt gactatgat cttgttacc atthagggt 2580
 cctgtggcaa gactgtctg agctcaggct cagataaaga atccaagacc aatcaataa 2640

- 5 <210> 45
- <211> 879
- <212> PRT
- <213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 583 203 T3

<400> 45

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

Met Arg Asn Leu Leu Gly Gly Lys Gly Ala Asn Leu Ala Glu Met Thr
 20 25 30

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

Cys Thr Lys Tyr Tyr Glu Asp Gly Lys Ser Ile Ser Gln Gln Val Ile
 50 55 60

Asp Gln Ile Tyr Asp Ala Leu Lys Asn Val Glu Glu Thr Thr Gly Lys
 65 70 75 80

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

Ala Arg Val Ser Met Pro Gly Met Met Asp Thr Ile Leu Asn Leu Gly
 100 105 110

Leu Asn Asp Asp Thr Val Ile Gly Leu Lys Lys Leu Thr Gly Asn Glu
 115 120 125

Arg Phe Ala Tyr Asp Ser Tyr Arg Arg Phe Ile Gln Met Phe Ser Asp
 130 135 140

Val Val Met Gly Ile Glu Lys Arg Glu Phe Glu Asp Val Leu Asp Asp
 145 150 155 160

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

Asp Leu Lys Asn Ile Ile Gln Arg Phe Lys Asp Ile Tyr Lys Lys Glu
 180 185 190

Val Lys Glu Asp Phe Pro Gln Asp Pro Lys Glu Gln Leu Ile Gln Ser
 195 200 205

5

ES 2 583 203 T3

Val Thr Ala Val Phe Arg Ser Trp Glu Asn Pro Arg Ala Ile Ile Tyr
 210 215 220

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

Gln Ser Met Val Phe Gly Asn Met Gly Glu Thr Ser Gly Thr Gly Val
 245 250 255

Ala Phe Thr Arg Asn Pro Ser Thr Gly Glu Lys Ser Ile Phe Gly Glu
 260 265 270

Tyr Leu Ile Asn Ala Gln Gly Glu Asp Val Val Ala Gly Ile Arg Thr
 275 280 285

Pro Gln Pro Ile Thr Lys Leu Lys Glu Asp Leu Pro Glu Cys Tyr Ser
 290 295 300

Gln Phe Met Ser Ile Ala Asn Lys Leu Glu Asn His Tyr Lys Asp Met
 305 310 315 320

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

Thr Arg Asn Gly Lys Arg Thr Ala Gln Ala Ala Leu Arg Ile Ala Val
 340 345 350

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

Val Glu Pro Lys Gln Leu Asp Thr Leu Leu His Pro Asn Phe Asp Ser
 370 375 380

Asp Glu Leu Lys Arg Ala Val Val Ile Ala Asn Gly Leu Pro Ala Ser
 385 390 395 400

Pro Gly Ala Ala Cys Gly Lys Ile Tyr Phe Thr Ala Asp Asp Ala Lys
 405 410 415

Lys His His Asp Gln Gly Glu Lys Val Ile Leu Val Arg Leu Glu Thr
 420 425 430

Ser Pro Glu Asp Ile Glu Gly Met Ala Ala Ser Glu Gly Ile Leu Thr
 435 440 445

Val Arg Gly Gly Met Thr Ser His Ala Ala Val Val Ala Arg Gly Met
 450 455 460

Gly Thr Cys Cys Val Ala Gly Cys Gly Asp Leu Ile Val Ser Glu Lys
 465 470 475 480

ES 2 583 203 T3

Glu Lys Leu Phe Lys Arg Leu Asp Lys Val Tyr Lys Glu Gly Asp Tyr
 485 490 495
 Ile Ser Leu Asp Gly Ser Thr Gly Asn Val Tyr Gly Glu Pro Ile Lys
 500 505 510
 Thr Val Ala Pro Glu Ile Ser Gly Asp Phe Gly Ile Phe Met Gly Trp
 515 520 525
 Ala Asp Asn Ile Arg Lys Leu Gly Val Arg Thr Asn Ala Asp Thr Pro
 530 535 540
 Arg Asp Ala Asn Gln Ala Ile Ser Phe Gly Ala Glu Gly Ile Gly Leu
 545 550 555 560
 Cys Arg Thr Glu His Met Phe Phe Asp Glu Asp Arg Ile Pro Glu Met
 565 570 575
 Arg Glu Met Ile Val Ser Lys Thr Glu Glu Gln Arg Arg Lys Ala Leu
 580 585 590
 Asp Lys Leu Leu Pro Arg Gln Lys Lys Asp Phe Ile Gly Ile Tyr Glu
 595 600 605
 Ala Met Glu Gly Lys Pro Val Thr Ile Arg Phe Leu Asp Pro Pro Leu
 610 615 620
 His Glu Phe Leu Pro Thr Glu Thr Glu Asp Ile Glu Ser Leu Ala Lys
 625 630 635 640
 Glu Met Gly Val Ser Phe Gln Glu Leu Lys Asp Thr Ile Asp Ser Leu
 645 650 655
 His Glu Phe Asn Pro Met Met Gly His Arg Gly Cys Arg Leu Thr Val
 660 665 670
 Ser Tyr Pro Glu Ile Ala Glu Met Gln Thr Arg Ala Ile Ile Glu Ala
 675 680 685
 Ala Ile Asp Val Lys Lys Arg Lys Gly Tyr Asp Ile Val Pro Glu Ile
 690 695 700
 Met Ile Pro Leu Val Gly Glu Ile Lys Glu Leu Lys Tyr Val Lys Asp
 705 710 715 720
 Val Val Val Arg Val Ala Asp Glu Ile Ile Gln Lys Glu Gly Ile Asn
 725 730 735
 Leu Lys Tyr Glu Val Gly Thr Met Ile Glu Ile Pro Arg Ala Ala Ile
 740 745 750

ES 2 583 203 T3

Thr Ala Asp Glu Ile Ala Lys Glu Ala Glu Phe Phe Ser Phe Gly Thr
 755 760 765
 Asn Asp Leu Thr Gln Met Thr Phe Gly Phe Ser Arg Asp Asp Ala Gly
 770 775 780
 Lys Phe Leu Asn Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys Val Tyr Glu Phe Asp Pro
 785 790 795 800
 Phe Gln Arg Leu Asp Gln Val Gly Val Gly Lys Leu Val Glu Thr Ala
 805 810 815
 Val Lys Leu Gly Lys Lys Thr Arg Pro Asp Ile His Leu Gly Ile Cys
 820 825 830
 Gly Glu His Gly Gly Asp Pro Ser Ser Val Glu Phe Phe His Asn Val
 835 840 845
 Gly Leu Asp Tyr Val Ser Cys Ser Pro Phe Arg Val Pro Val Ala Arg
 850 855 860
 Leu Ala Ala Ala Gln Ala Gln Ile Lys Asn Pro Arg Pro Ile Lys
 865 870 875

- <210> 46
- <211> 3447
- <212> ADN
- <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 46

atggattact tgtaaagag gtttaagagg gttctttag cgaatagagg agaaatagcc	60
ataagaatat tcagagcatg caaagaattg ggaataacta ctgtagcaat atattcaaat	120
gaggataaga gatctctttt cagaactaaa gctgatgaat cctatatgat agggaaaaat	180
aagggacctg tagaagcata tttggatatt gatgaaataa tagatatagc tttgaagaaa	240
aatgtagatg caatacatcc gggttatgga ttccatcag aaaatcctga attggcaaaa	300
aagtgtaaag aagcaggat tgaatttata ggacctacat cagatatgat ggagatgctt	360
ggtgataaga taaaatctaa aattgttgca caaaggctg gagtaccaac aataccagga	420
gttcaagaag ctataaagac agaagaagaa gctttaaaat ttgctaactt ctgtggatat	480
cctgttatga ttaaagcagc tgacgggtggc ggcggcagag gaatgagaat agtaagggaa	540
gaaaaagatc tcatagaatc ctataacagt gctaaaaatg aatctagaaa agcttttggt	600
tcagaaaaaa tatacattga aaaatatatt gaaaatccaa aacacataga ggtgcaggta	660
cttgagata agtacggcaa tattgttcat ctatatgaaa gagattgttc catacagaga	720
agacatcaaa aggttataga atttacacca tctttagccc tctcagaaga aaaaagacaa	780
caaatatgtg aagatgcttt aaaaattgcg agaactgtag gatatacaag tgcaggatcc	840
ttggagtttt tagttgacaa aatgaaaat cactatttta tagagatgaa tactagaatt	900

10

ES 2 583 203 T3

caggtagaac aactgtaac tgaatgggtt acaggaatag atatatgttca agatcaaata 960
 cttattgcag aagggcattc acttgattct aaggaaatag gaataaaatc tcaagatgat 1020
 atagagttaa aaggatatgc aatacaatgc agaattacta cagaagatcc tttaaataat 1080
 tttgcgccag atacaggaag aatagatatg tatagaactg gttctggatt tggataaga 1140
 cttgatggag gaaatggatt tacaggtgca gtaataagtc cttattatga tagcttactg 1200
 gtaaaaactg tatcttggtc aagaactttt gaagatgcta taagaaaggc aataaggctt 1260
 ataaatgaga ctgttatatc aggggtaaag acaaatgcag actttataat aaaagtgtta 1320
 agtcatgaaa agtttataaa aggtgaatgt gatactaatt ttattgaaga taatccagat 1380
 ttatttgata taaaaccaa attagataaa gaaatgagtg tacttaaatt tataggaaat 1440
 aaagtagtaa atgagactcg tggaaagaag aagaaatita atatacctat tgtacaaaa 1500
 gtagaagaaa atattaaatt gagtggaaca aagcaaacac ttgatacaaa aggagcagat 1560
 ggattagttag attggataaa atcacaagat aagcttctta ttacagatac tactatgaga 1620
 gacgctcatc agtcacttat ggcaactagg gtgagaacta gagatttgct taagatagca 1680
 aaagcccaat cagctttggc aaacgatcct ttctccatgg aaatgtgggg aggagcaact 1740
 tttgatgtag cgtatagatt tttaaatgaa tctccttggg aaagacttga aaaacttaga 1800
 gaaaaggttc ctaataact attccagatg ctcataagag gagctaatgc agtaggatat 1860
 aagaactatc ctgataatgt tattagagaa tttataaaac aatcttcaac ttcaggcatt 1920
 gatgtattta gaatatttga ttcactaaac tggcttaaag gaatgaaagt tgctatagat 1980
 cagacattaa aagaaggaaa gatagctgaa gcatgcatgt gctatacagg agatgtatta 2040
 gatgacaagg aggataaata tacgcttcag tactatataa acttagctaa agaaatagag 2100
 aaaactggag cacagattct tggaaataag gatatgtctg ctttgttaaa gccatattct 2160
 gcttataaac ttgtaaaagc acttaagaat gaaatctcta ttccaataca tcttcatact 2220
 catgatacta caggtaatgg tgtggcaaca gtacttatgg ctgctgatgc aggacttgat 2280
 atagctgata ctgcattcaa tagtatgtct gggcttacta gccagccagc tttgaattca 2340
 atagcagcag cacttaaaaa tacaataga gatactaagt tagatgcaga taatcttcaa 2400
 aaaatatcta actactggga agatgtaaga cctatatata gtcagtttga gtcgggactt 2460
 aagtcaagta ctgcagaaat atacaagtat gagataccag gaggccagta ttcaaaactta 2520
 aaacctcagg ttgaaagttt tgggttggga gatcgttttg aagatgtaaa agaaatgtat 2580
 aagagagtta ataaaatgct tggaaatata attaaagtaa ctccttcttc aaaaatggta 2640
 ggagatctgg ctatatttat gatacaaaat gatttggatg aaaagaatat ttatgaaaa 2700
 ggtaagaatt taactttccc agattctaca atttctttct tcaagggaaat gatgggtcag 2760
 cctatggggag gatttccaaa agaacttcaa aaaatagttc taaagggaga ggaaccttta 2820
 aaggaagac caggagaatt tttgccacca gaagattttg gcaagataga agatcattta 2880
 actaaaaaat ataagagaaa atttgaaat aaagaactct tgagttatgc tatgtatcct 2940

ES 2 583 203 T3

gatgtatttg aaaattacct taaattcata gatgaatatg gtgatctcag cagaatggaa 3000
 agtgaacat tcttctatgg acttgcagaa ggagaacttt gtgaagttga aataggagaa 3060
 ggaaaaagtt tatttgtaca attactagag attacaaaag ttgacgatga aggatataga 3120
 ttcttagtgt ttgaggttaa tggattaag agagacataa ggataaaaga taacttggct 3180
 ttctctggat caggaataaa agaaaattca tgtgttatgg cagatgaaga taatgaaaaa 3240
 gaaataggat caagtatacc tggaaacatt gttaaagtac ttgtaaaacc aggagataaa 3300
 gtagaagagg gccagagctt aattgtaata gaagctatga aaatggaaac aaatgtttca 3360
 gctgctgaag caggagtaat tgatggagta tttgtaaaag aaggccagag agttaaact 3420
 ggagaacttt taattaaatt aaagtaa 3447

<210> 47

<211> 1148

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 47

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

10

ES 2 583 203 T3

Ile Val Arg Glu Glu Lys Asp Leu Ile Glu Ser Tyr Asn Ser Ala Lys
 180 185 190
 Asn Glu Ser Arg Lys Ala Phe Gly Ser Glu Lys Ile Tyr Ile Glu Lys
 195 200 205
 Tyr Ile Glu Asn Pro Lys His Ile Glu Val Gln Val Leu Gly Asp Lys
 210 215 220
 Tyr Gly Asn Ile Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser Ile Gln Arg
 225 230 235 240
 Arg His Gln Lys Val Ile Glu Phe Thr Pro Ser Leu Ala Leu Ser Glu
 245 250 255
 Glu Lys Arg Gln Gln Ile Cys Glu Asp Ala Leu Lys Ile Ala Arg Thr
 260 265 270
 Val Gly Tyr Thr Ser Ala Gly Thr Leu Glu Phe Leu Val Asp Lys Asn
 275 280 285
 Glu Asn His Tyr Phe Ile Glu Met Asn Thr Arg Ile Gln Val Glu His
 290 295 300
 Thr Val Thr Glu Met Val Thr Gly Ile Asp Ile Val Gln Asp Gln Ile
 305 310 315 320
 Leu Ile Ala Glu Gly His Ser Leu Asp Ser Lys Glu Ile Gly Ile Lys
 325 330 335
 Ser Gln Asp Asp Ile Glu Leu Lys Gly Tyr Ala Ile Gln Cys Arg Ile
 340 345 350
 Thr Thr Glu Asp Pro Leu Asn Asn Phe Ala Pro Asp Thr Gly Arg Ile
 355 360 365
 Asp Met Tyr Arg Thr Gly Ser Gly Phe Gly Ile Arg Leu Asp Gly Gly
 370 375 380
 Asn Gly Phe Thr Gly Ala Val Ile Ser Pro Tyr Tyr Asp Ser Leu Leu
 385 390 395 400
 Val Lys Thr Val Ser Trp Ser Arg Thr Phe Glu Asp Ala Ile Arg Lys
 405 410 415
 Ala Ile Arg Ser Ile Asn Glu Thr Val Ile Ser Gly Val Lys Thr Asn
 420 425 430
 Ala Asp Phe Ile Ile Lys Val Leu Ser His Glu Lys Phe Ile Lys Gly
 435 440 445

ES 2 583 203 T3

Glu Cys Asp Thr Asn Phe Ile Glu Asp Asn Pro Asp Leu Phe Asp Ile
 450 455 460

Lys Pro Lys Leu Asp Lys Glu Met Ser Val Leu Lys Phe Ile Gly Asn
 465 470 475 480

Lys Val Val Asn Glu Thr Arg Gly Lys Lys Lys Phe Asn Ile Pro
 485 490 495

Ile Val Pro Lys Val Glu Glu Asn Ile Lys Leu Ser Gly Thr Lys Gln
 500 505 510

Ile Leu Asp Thr Lys Gly Ala Asp Gly Leu Val Asp Trp Ile Lys Ser
 515 520 525

Gln Asp Lys Leu Leu Ile Thr Asp Thr Thr Met Arg Asp Ala His Gln
 530 535 540

Ser Leu Met Ala Thr Arg Val Arg Thr Arg Asp Leu Leu Lys Ile Ala
 545 550 555 560

Lys Ala Gln Ser Ala Leu Ala Asn Asp Leu Phe Ser Met Glu Met Trp
 565 570 575

Gly Gly Ala Thr Phe Asp Val Ala Tyr Arg Phe Leu Asn Glu Ser Pro
 580 585 590

Trp Glu Arg Leu Glu Lys Leu Arg Glu Lys Val Pro Asn Ile Leu Phe
 595 600 605

Gln Met Leu Ile Arg Gly Ala Asn Ala Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Pro
 610 615 620

Asp Asn Val Ile Arg Glu Phe Ile Lys Gln Ser Ser Thr Ser Gly Ile
 625 630 635 640

Asp Val Phe Arg Ile Phe Asp Ser Leu Asn Trp Leu Lys Gly Met Lys
 645 650 655

Val Ala Ile Asp Gln Thr Leu Lys Glu Gly Lys Ile Ala Glu Ala Cys
 660 665 670

Met Cys Tyr Thr Gly Asp Val Leu Asp Asp Lys Glu Asp Lys Tyr Thr
 675 680 685

Leu Gln Tyr Tyr Ile Asn Leu Ala Lys Glu Ile Glu Lys Thr Gly Ala
 690 695 700

Gln Ile Leu Gly Ile Lys Asp Met Ser Ala Leu Leu Lys Pro Tyr Ser
 705 710 715 720

ES 2 583 203 T3

Ala Tyr Lys Leu Val Lys Ala Leu Lys Asn Glu Ile Ser Ile Pro Ile
725 730 735

His Leu His Thr His Asp Thr Thr Gly Asn Gly Val Ala Thr Val Leu
740 745 750

Met Ala Ala Asp Ala Gly Leu Asp Ile Ala Asp Thr Ala Phe Asn Ser
755 760 765

Met Ser Gly Leu Thr Ser Gln Pro Ala Leu Asn Ser Ile Ala Ala Ala
770 775 780

Leu Lys Asn Thr Asn Arg Asp Thr Lys Leu Asp Ala Asp Asn Leu Gln
785 790 795 800

Lys Ile Ser Asn Tyr Trp Glu Asp Val Arg Pro Ile Tyr Ser Gln Phe
805 810 815

Glu Ser Gly Leu Lys Ser Ser Thr Ala Glu Ile Tyr Lys Tyr Glu Ile
820 825 830

Pro Gly Gly Gln Tyr Ser Asn Leu Lys Pro Gln Val Glu Ser Phe Gly
835 840 845

Leu Gly Asp Arg Phe Glu Asp Val Lys Glu Met Tyr Lys Arg Val Asn
850 855 860

Lys Met Leu Gly Asn Ile Ile Lys Val Thr Pro Ser Ser Lys Met Val
865 870 875 880

Gly Asp Leu Ala Ile Phe Met Ile Gln Asn Asp Leu Asp Glu Lys Asn
885 890 895

Ile Tyr Glu Lys Gly Lys Asn Leu Thr Phe Pro Asp Ser Thr Ile Ser
900 905 910

Phe Phe Lys Gly Met Met Gly Gln Pro Met Gly Gly Phe Pro Lys Glu
915 920 925

Leu Gln Lys Ile Val Leu Lys Gly Glu Glu Pro Leu Lys Gly Arg Pro
930 935 940

Gly Glu Phe Leu Pro Pro Glu Asp Phe Gly Lys Ile Glu Asp His Leu
945 950 955 960

Thr Lys Lys Tyr Lys Arg Lys Phe Glu Asn Lys Glu Leu Leu Ser Tyr
965 970 975

Ala Met Tyr Pro Asp Val Phe Glu Asn Tyr Leu Lys Phe Ile Asp Glu
980 985 990

ES 2 583 203 T3

Tyr Gly Asp Leu Ser Arg Met Glu Ser Glu Thr Phe Phe Tyr Gly Leu
 995 1000 1005

Ala Glu Gly Glu Leu Cys Glu Val Glu Ile Gly Glu Gly Lys Ser
 1010 1015 1020

Leu Phe Val Gln Leu Leu Glu Ile Thr Lys Val Asp Asp Glu Gly
 1025 1030 1035

Tyr Arg Phe Leu Val Phe Glu Val Asn Gly Ile Lys Arg Asp Ile
 1040 1045 1050

Arg Ile Lys Asp Asn Leu Ala Phe Ser Gly Ser Gly Ile Lys Glu
 1055 1060 1065

Asn Ser Cys Val Met Ala Asp Glu Asp Asn Glu Lys Glu Ile Gly
 1070 1075 1080

Ser Ser Ile Pro Gly Asn Ile Val Lys Val Leu Val Lys Pro Gly
 1085 1090 1095

Asp Lys Val Glu Glu Gly Gln Ser Leu Ile Val Ile Glu Ala Met
 1100 1105 1110

Lys Met Glu Thr Asn Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly Val Ile Asp
 1115 1120 1125

Gly Val Phe Val Lys Glu Gly Gln Arg Val Lys Thr Gly Glu Leu
 1130 1135 1140

Leu Ile Lys Leu Lys
 1145

<210> 48
 <211> 1524
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 48

atgtataaaa atttatcacc atcagaatta acggaathtt caattaaaag aggagaagga	60
ttttatcaa ataaggagc tcttatgatt aatactggaa agtacacagg aagatctcct	120
aaagatagat ttatagttaa tcaagaaagc attaggaaca aaataaactg gggaaatgta	180
aatctttcta tagaagaaga ttttttaat aaaatgtatg ataagathtt aaattatata	240
agtgataaag atatttttgt gtttgatgga ttgtttggag ctttaaaaaa atataccctt	300
cctataagag taatatgcca aagggcatcc caggcgttgt ttgcaaatca attgtttaga	360
agaccaacgg aggaggatht aaagtgtttt actcctgaat ttaatattat atcggcacct	420
ggatttaagg ctaagggcaa agaagacggt ttaaattcag atgcctttat tttagtaaat	480

ES 2 583 203 T3

ttcgataaaa aaattatatt aataggtgga accagttact cgggagaaat aaaaaaatca 540
gtattttcag taatgaactt cttgcttcca caaaaaggag tcatgcctat gcactgttct 600
gctaataatag gacaagataa taaaacttgc ttatTTTTTg gattgtcagg aacaggaaaa 660
actactttat cagcagatgg tgaagaaga ctgattggg atgacgaaca tggatgggtct 720
aatgaagggtg tatttaattt tgaggggtgga tgttatgcta aaactataag acttgataag 780
gaaaaggaaa gtcagatata caatgccata aaatttggaa ctgtagttga aaatgtagtg 840
gcagatggga atagagtacc tgattataat gatgctagat atactgaaaa tacaagggca 900
gcatatccta taaattatat agataatata gaagaaagtg gtgtaggagg aaatccagag 960
actataatat ttttaaccgc agatgctttt ggtgtaatgc cacctatatac aaggctttct 1020
aaagaagcag caatgtatca ctttatgtct ggatatacta gcaagatagc tggaactgaa 1080
agaggaataa ttgaacctca agctactttt tcctcttgct ttggtgaacc gtttatgtta 1140
atgaatcctg ctgtctatgc aaaattgtta ggcgaaagaa tagacaagta taacactcag 1200
gtatatttag tgaactactgg atggctatct ggaggatatg gaaatggaga tagaataaaa 1260
ctttcctata caagggctat gattagagaa gctttgaaag ggaagttaa ggatgttgaa 1320
tttgtggaac atcctgtatt taaagtaatg atgcctaaaa gatgtccagg tgtacctgat 1380
gaaatattaa atcctagaaa tatatgggaa gataaagaag catatgatga gacagcgaga 1440
aagctggcgc tgaagtttag taaaacttt gagaaagtta aagatgtttc cgaagatata 1500
gcaaaagctg gacctgaagc ttaa 1524

<210> 49

<211> 507

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 49

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

Arg Gly Glu Gly Phe Leu Ser Asn Lys Gly Ala Leu Met Ile Asn Thr
20 25 30

Gly Lys Tyr Thr Gly Arg Ser Pro Lys Asp Arg Phe Ile Val Asn Gln
35 40 45

Glu Ser Ile Arg Asn Lys Ile Asn Trp Gly Asn Val Asn Leu Ser Ile
50 55 60

Glu Glu Asp Ile Phe Asn Lys Met Tyr Asp Lys Ile Leu Asn Tyr Ile
65 70 75 80

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

ES 2 583 203 T3

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

ES 2 583 203 T3

Thr Phe Ser Ser Cys Phe Gly Glu Pro Phe Met Leu Met Asn Pro Ala
 370 375 380
 Val Tyr Ala Lys Leu Leu Gly Glu Arg Ile Asp Lys Tyr Asn Thr Gln
 385 390 395 400
 Val Tyr Leu Val Asn Thr Gly Trp Leu Ser Gly Gly Tyr Gly Asn Gly
 405 410 415
 Asp Arg Ile Lys Leu Ser Tyr Thr Arg Ala Met Ile Arg Glu Ala Leu
 420 425 430
 Lys Gly Lys Phe Lys Asp Val Glu Phe Val Glu His Pro Val Phe Lys
 435 440 445
 Val Met Met Pro Lys Arg Cys Pro Gly Val Pro Asp Glu Ile Leu Asn
 450 455 460
 Pro Arg Asn Ile Trp Glu Asp Lys Glu Ala Tyr Asp Glu Thr Ala Arg
 465 470 475 480
 Lys Leu Ala Leu Lys Phe Ser Lys Asn Phe Glu Lys Phe Lys Asp Val
 485 490 495
 Ser Glu Asp Ile Ala Lys Ala Gly Pro Glu Ala
 500 505

<210> 50
 <211> 843
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

5

<400> 50
 atgagagaag tagatgtatc cactataact aaagctgtta gaaatctctg tatagatgcc 60
 aattattatc tttcggagga tgtaagaaa aagataaaag aatgtgaaga ggacgaaaaa 120
 tggcctactg caaaagacat tttaggtaaa atacttgaaa atatagatat atctaaaaat 180
 gaagatgtgc ctatgtgtca agatacagga atggcttgtg tatttataac aattggccag 240
 gatgttcata tagtaggagg aagtttagaa gacgcaataa ataagggagt aggccagggg 300
 tatgtagaag ggtatttaag aaaatctgta gtctctgatc ctataaatag agttaatact 360
 aaggacaata ctctgcagt aatatattat gaaatagttc caggagataa acttaacata 420
 aaagtggctc ctaaaggatt tggatcagaa aatatgagtc agataaaaat gcttaaacca 480
 gcagatggtc ttaaggggtg taaagatttt gtaataaaag tagtaaagga cgcaggacca 540
 aatccatgtc ctctatggt tgtaggagta ggtataggag gaacttttga caaggctgca 600
 aatcttgcaa agaaagctct tgtaagacca ttatctgaaa gaaataaaaa taagttttat 660
 tcagatttag aaaatgaact tttagacaaa ataaatctcc ttggtatagg acctcaagga 720
 ctagggggaa agactacagc tcttgca gta aatatagaaa cttatcctac ccatatagca 780
 ggattacctg tagccgtaaa tataaattgt cacgttacaa gacataagga aatagaattg 840
 taa 843

10

<210> 51
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Clostridium autoethanogenum

15

ES 2 583 203 T3

<400> 51

Met Arg Glu Val Asp Val Ser Thr Ile Thr Lys Ala Val Arg Asn Leu
 1 5 10 15
 Cys Ile Asp Ala Asn Tyr Tyr Leu Ser Glu Asp Val Lys Lys Lys Ile
 20 25 30
 Lys Glu Cys Glu Glu Asp Glu Lys Trp Pro Thr Ala Lys Asp Ile Leu
 35 40 45
 Gly Lys Ile Leu Glu Asn Ile Asp Ile Ser Lys Asn Glu Asp Val Pro
 50 55 60
 Met Cys Gln Asp Thr Gly Met Ala Cys Val Phe Ile Thr Ile Gly Gln
 65 70 75 80
 Asp Val His Ile Val Gly Gly Ser Leu Glu Asp Ala Ile Asn Lys Gly
 85 90 95
 Val Gly Gln Gly Tyr Val Glu Gly Tyr Leu Arg Lys Ser Val Val Ser
 100 105
 Asp Pro Ile Asn Arg Val Asn Thr Lys Asp Asn Thr Pro Ala Val Ile
 115 120 125
 Tyr Tyr Glu Ile Val Pro Gly Asp Lys Leu Asn Ile Lys Val Ala Pro
 130 135 140
 Lys Gly Phe Gly Ser Glu Asn Met Ser Gln Ile Lys Met Leu Lys Pro
 145 150 155 160
 Ala Asp Gly Leu Lys Gly Val Lys Asp Phe Val Ile Lys Val Val Lys
 165 170 175
 Asp Ala Gly Pro Asn Pro Cys Pro Pro Met Val Val Gly Val Gly Ile
 180 185 190
 Gly Gly Thr Phe Asp Lys Ala Ala Asn Leu Ala Lys Lys Ala Leu Val
 195 200 205
 Arg Pro Leu Ser Glu Arg Asn Lys Asn Lys Phe Tyr Ser Asp Leu Glu
 210 215 220
 Asn Glu Leu Leu Asp Lys Ile Asn Leu Leu Gly Ile Gly Pro Gln Gly
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Lys Thr Thr Ala Leu Ala Val Asn Ile Glu Thr Tyr Pro
 245 250 255
 Thr His Ile Ala Gly Leu Pro Val Ala Val Asn Ile Asn Cys His Val
 260 265 270
 Thr Arg His Lys Glu Ile Glu Leu
 275 280

5

<210> 52

<211> 573

<212> ADN

10 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 52

ES 2 583 203 T3

atgtatatgg aaaaaaagat aactactccg ttaacggaag aaaagggttaa aactttaaaa 60
 gcaggggata gtgttttaat atcagggaca atatatactg ctagagatgc tgctcataag 120
 agattagttg aattattaga tgaaggtaaa tcacttccta taaatgtaa agatgaaata 180
 atatattacg caggaccaag tcctgcaaaa ccaggccatg taataggttc agcaggacca 240
 acaagtagtt atagaatgga tccatttgca ccaagactgc ttgatatagg tttaaagggg 300
 atgataggaa aaggccttcg ttcaaaagaa gttatagaat ccatgaagaa aaataaagct 360
 gtttactttg ctgcaatagg cggggctgca gcacttgtag caaaatccat aaagaaagca 420
 gaagtagtag cttatgaaga tttggattct gaagctataa gaaaattaga agtaaaagac 480
 ttacctgtaa ttgtagtaat agattcagag ggcaataatt tatatgaatc aggacgaaaa 540
 gagtacttgg actctgtgga ccagtctaag tag 573

<210> 53

<211> 190

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 53

Met Tyr Met Glu Lys Lys Ile Thr Thr Pro Leu Thr Glu Glu Lys Val
 1 5 10 15

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

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

Gly Lys Ser Leu Pro Ile Asn Val Lys Asp Glu Ile Ile Tyr Tyr Ala
 50 55 60

10 Gly Pro Ser Pro Ala Lys Pro Gly His Val Ile Gly Ser Ala Gly Pro
 65 70 75 80

Thr Ser Ser Tyr Arg Met Asp Pro Phe Ala Pro Arg Leu Leu Asp Ile
 85 90 95

Gly Leu Lys Gly Met Ile Gly Lys Gly Leu Arg Ser Lys Glu Val Ile
 100 105 110

Glu Ser Met Lys Lys Asn Lys Ala Val Tyr Phe Ala Ala Ile Gly Gly
 115 120 125

Ala Ala Ala Leu Val Ala Lys Ser Ile Lys Lys Ala Glu Val Val Ala
 130 135 140

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

Leu Pro Val Ile Val Val Ile Asp Ser Glu Gly Asn Asn Leu Tyr Glu
 165 170 175

Ser Gly Arg Lys Glu Tyr Leu Asp Ser Val Asp Gln Ser Lys
 180 185 190

<210> 54

<211> 1797

15 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

ES 2 583 203 T3

<400> 54

atgcaaatag ataagataat tgatactgac atattagttg ttggaggttc tggagcagga 60
tcaatggcag ctgtaacagc tgcgagaaaa ggagcaaaag tactacttgc agtaaaaggg 120
aagcttgga aaagcggaaa tgccattatg gcaggggag gattttctat ggatggagaa 180
acagcatatt ataaatatgg actcaaggaa gcagatccta aaaatacaaa gggaaaatta 240
tttgaacaaa ttgtaaaaca gtctttttat ttaagtgatc aaaatatggt tgagcagttt 300
gtaagtgatt gtgatgagtg ctgctgggaa cttaaacagt ggattgaaaa agcaggacac 360
aagtttgtat tttttggaga agaaggatat ataagctcgg gtaaagctgt gggagttggc 420
tgccgatatg gagtttcaaa agcaggtggt attgatgtta tagaagattt tatagcagtg 480
gatattttaa tggaagataa aaaagctgta ggtgcagtg gcatagaagt atatacagga 540
aaaattattg aatcagatc aaagtcagtt attttagcta ctggcggata tcagccttat 600
tcctttaaat gtactgtttc cgatatgact ggcgatggaa tggctatggc ataccgtgca 660
ggagccaagc ttgcagatat ggaattttta ttatatatac cagcagttgc ctttcacca 720
tcagtatata aaggttcaat ttatcccttc ttacactcca gtatgttaat gcctattggt 780
aaaaatggtg agggagaatc aattttagat aatatacctg aaaatttact taaaatggcc 840
aaggaaagtg aaatgggaaa gcttatattt acgtattatt atggagatca aattgcaaga 900
ggaaaaggaa ctccaaatgg aggagtatat tttgattatt ccaatgtacc ttttgatatt 960
tatgaaaaag ctttaaaaa agctgaacca ttaatgaaca tatggtatag aaaaggattc 1020
tatcaaggaa acaacttggg tacttttggg gaaaatatta gaaagggcat tccatgggaa 1080
gtaggtattg gcagtgaata cagcatgggc ggcattgaag tagacgaaaa tatgtacact 1140
ggagtaccag gactttatgc agctgggtgag actacaagtg gtgtatttgg agctatgagg 1200
gttgacagatg gacttattga aatgcttgta cagggttata gagcagcatt gtccgcttgc 1260
aaatatatac aaaatgtaaa tgagccaagt atgaaaaata ccaatattga tagtataatt 1320
aaagatattt tttcacctct tgaagaaaa gaaggagtta gtcctataaa aatacacaga 1380
aatatagaaa aaacggctga tgttgattc aactttagaa gaaatgaaga gggacttaca 1440
aaagctttag atgaaatttt aaaaatacac aaatatgaca taagcgcaat gagtactaaa 1500
agtaaaaata gagtttataa ctatgaatgg atagaatcag tacaggctcg aaatctttta 1560
acttgtaacag aagcaggtgt aagagctgcc cttatgagaa aggaaagtag gggtaacacac 1620
atacgtgatg attatgaatt ttagataat gataactggc ttttaaggat tatgagttcg 1680
aaaggtgaag acgaaacat gaaattatca accagaaagc ctaaagtaac aacaatggaa 1740
cttccaggtg gtaaaaataa gaatattcct gattatatgc tttcaatggt aaagtaa 1797

5

<210> 55

<211> 598

<212> PRT

10 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 55

ES 2 583 203 T3

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

Ser Gly Ala Gly Ser Met Ala Ala Val Thr Ala Ala Arg Lys Gly Ala
 20 25 30

Lys Val Leu Leu Ala Val Lys Gly Lys Leu Gly Lys Ser Gly Asn Ala
 35 40 45

Ile Met Ala Gly Ala Gly Phe Ser Met Asp Gly Glu Thr Ala Tyr Tyr
 50 55 60

Lys Tyr Gly Leu Lys Glu Ala Asp Pro Lys Asn Thr Lys Gly Lys Leu
 65 70 75 80

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

Val Glu Gln Phe Val Ser Asp Cys Asp Glu Cys Cys Trp Glu Leu Lys
 100 105 110

Gln Trp Ile Glu Lys Ala Gly His Lys Val Val Phe Phe Gly Glu Glu
 115 120 125

ES 2 583 203 T3

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

ES 2 583 203 T3

Val Ala Asp Gly Leu Ile Glu Met Leu Val Gln Gly Tyr Arg Ala Ala
 405 410 415

Leu Ser Ala Cys Lys Tyr Ile Gln Asn Val Asn Glu Pro Ser Met Lys
 420 425 430

Asn Thr Asn Ile Asp Ser Ile Ile Lys Asp Ile Phe Ser Pro Leu Glu
 435 440 445

Arg Lys Glu Gly Val Ser Pro Ile Lys Ile His Arg Asn Ile Glu Lys
 450 455 460

Thr Ala Asp Val Gly Phe Asn Phe Arg Arg Asn Glu Glu Gly Leu Thr
 465 470 475 480

Lys Ala Leu Asp Glu Ile Leu Lys Ile His Lys Tyr Asp Ile Ser Ala
 485 490 495

Met Ser Thr Lys Ser Lys Asn Arg Val Tyr Asn Tyr Glu Trp Ile Glu
 500 505 510

Ser Val Gln Ala Arg Asn Leu Leu Thr Cys Thr Glu Ala Gly Val Arg
 515 520 525

Ala Ala Leu Met Arg Lys Glu Ser Arg Gly Thr His Ile Arg Asp Asp
 530 535 540

Tyr Glu Phe Val Asp Asn Asp Asn Trp Leu Leu Arg Ile Met Ser Ser
 545 550 555 560

Lys Gly Glu Asp Glu Thr Met Lys Leu Ser Thr Arg Lys Pro Lys Val
 565 570 575

Thr Thr Met Glu Leu Pro Gly Gly Lys Asn Lys Asn Ile Pro Asp Tyr
 580 585 590

Met Leu Ser Met Leu Lys
 595

<210> 56

<211> 2781

5 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 56

atgctaacta ataatactga ggcacttata ttggcagaaa agattggaaa agaagctgca	60
ctatcatggt tacagggaaat gtatgattat ggcacaagtc ctatgaaagt tttagatatg	120
ataaaggaaa aacctaattg taaagttata gttggagcac taaacaattc ggatacagat	180
ggaatgctta atattttggc aaaaacaaat ccagctggac ttgcagcagg tctttcagta	240
10 ttagcaaagg catcaggagc agaagaggcc ctattagaac ttcgtaatac ggataatgaa	300

ES 2 583 203 T3

gctgaattat tagccagtgc aaaaacagca ggagtâaaâc ttagagtaga agtaggtgaa 360
ctagttgatg taagggcaca taaagagcat attatTTTTa atttagaaac tttagccgga 420
attgccgata aaattacggg cacagcacca ggaattatta tagcagtaga tgaagatgta 480
cctaaggaag ttaaattcgg tacaaaactt gtggattttt tagacacagc taaggttaaa 540
tcggttatga ttaaccacca tttttataga ttagatgtat taaataatgg cattataaag 600
gaaaactcct atggaagtgg tgttattcat ataatttacg aaaatgattg catagtagaa 660
aaaacaaaaa aagaactaga aaatcctaga aagcaaagct gtggaaaatg tactttttgc 720
cgtgaaggat tatatcagct tgatgttata tttgatgaca tgataaaagg cagatcagag 780
aaagaggatc ttgctatggg agaagagtta acaagtgcaa tgaaattttc atgtaattgc 840
tcattaggaa aatgctcagg agaaccagca gcaagtgcaa taacagaatt taaattagaa 900
gtagagcagc atataaagaa gaggggatgt cctgctggcc agtgtttagc ctttacaat 960
atatacgtag atcctagaaa atgcaaaggt tgtggaaaat gcttggaaat ttgtccagag 1020
gattgtattg aagcaaaaaa gggctatatt tccatgattg acgaatttga ttgactaaa 1080
tgccgcatat gtatagatga atgtcccaat aatgcaattg ttaaggtaaa tggcaaaacc 1140
cctaaacttc ctacaaaact aacaagagta aaaggaagta aaaatataac agaagaggac 1200
acagagaaga aaaaacggca caatttmeta agacacagaa ctaagcttgt tattccactt 1260
aaaaaagata ataataaagc atctgagaaa atatcagaga ttaaaaagtc aaaggagggt 1320
actattatga aaaagatgga aacagatatt ataatcgag caggaggccc agcaggactg 1380
gcagcagcta ttacagctgg agagaacaat ttaaaatcta ttctttttga aaaatctagt 1440
acaacaggtg gagcagcaaa catgggtatg ggaccacttg gaatagatac taaaattcag 1500
aaagataact ttaacaatat aagtgtagca gaagcccttg acatgcatat gaaatatact 1560
cattatcgtg tagatgagga tttagttcag acatacttta ataagagtgc agaaacaatt 1620
gaatggttac aggatatggg agtagaattt gcaggagcat ttcgctattt taaagaatca 1680
gcccgaactt ggcatatagt taagccggaa aatggagtta ttggaccacg tgcagctagt 1740
ggaatggcaa aaataatgac agaacgtgca aaagaacttg gaacaaaaat cctattggaa 1800
acaccagtgg tttctttaat aaaggaaaat ggaagaatat gtggtggtta agcacaagat 1860
agtgaaggta atattattga agtcagggca aaagctgcta ttggtgcaac tgggtggttt 1920
ggcaataaca agaatatgat aaaatctgaa tttggtttga caattggaga agattatctc 1980
ccatttatgg ttcctggaat aacaggtgat ggcttgmeta tgatgtggga agcaggtgca 2040
atgaaatatg gagaaaatat tgaggcaatt tatkagcttc ctgataatct aactgggttt 2100
ttactagatg cagtgtcgcg tcagccaaat cttttaatta atcaacttgg tgatcgtttt 2160
atgaatgaag gagatatggg aaatactaca ttactggaa atgccattgc aatgcagccg 2220
ggcaattatg cttactgcat tatggatgaa ggaatmtta aacattataa aaagaatggg 2280
ccagatattt ttgatattgt tcatccagca gatgctttcc ttgcagttga tggagagatt 2340

ES 2 583 203 T3

gctaaggcag tagaacaagg ttatgaatca tattttgaag cacgaacagt agaagagctt 2400
gctaaaaaac ttaatattga tgctgaaaaa ttacaagata ctattgatga atataatgaa 2460
gcctgtgaaa cgggagtaga cactaaattc cataaaaaac aggcataatct ccatcctatc 2520
actgгааagg gaaaatattt agttggaaaa ttctaccttg gagcttatgg aacaattggt 2580
gggtgttcgta tcaataaata ttgtgaagtt ttagatgaaa gctttaatcc aattgaggga 2640
ctttatagcg ctggtactga tgctaataca atttatggag acagctataa ttttactctt 2700
cctggtaaca gcatgggatt tgcaattaat tcaggacgta tggctggaga aagtgccgca 2760
gagtatattg aagaagtata a 2781

<210> 57
<211> 926
5 <212> PRT
<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 57

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

ES 2 583 203 T3

Ala Lys Val Lys Ser Val Met Ile Asn His His Phe Tyr Arg Leu Asp
180 185 190

Val Leu Asn Asn Gly Ile Ile Lys Glu Asn Ser Tyr Gly Ser Gly Val
195 200 205

Ile His Ile Ile Tyr Glu Asn Asp Cys Ile Val Glu Lys Thr Lys Lys
210 215 220

Glu Leu Glu Asn Leu Arg Lys Gln Ser Cys Gly Lys Cys Thr Phe Cys
225 230 235 240

Arg Glu Gly Leu Tyr Gln Leu Asp Val Ile Phe Asp Asp Met Ile Lys
245 250 255

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

Ala Met Lys Phe Ser Cys Asn Cys Ser Leu Gly Lys Cys Ser Gly Glu
275 280 285

Pro Ala Ala Ser Ala Ile Thr Glu Phe Lys Leu Glu Val Glu Gln His
290 295 300

Ile Lys Lys Arg Gly Cys Pro Ala Gly Gln Cys Leu Ala Phe Thr Asn
305 310 315 320

Ile Tyr Val Asp Pro Arg Lys Cys Lys Gly Cys Gly Lys Cys Leu Glu
325 330 335

Val Cys Pro Glu Asp Cys Ile Glu Ala Lys Lys Gly Tyr Ile Ser Met
340 345 350

Ile Asp Glu Phe Asp Cys Thr Lys Cys Gly Ile Cys Ile Asp Glu Cys
355 360 365

Pro Asn Asn Ala Ile Val Lys Val Asn Gly Lys Thr Pro Lys Leu Pro
370 375 380

Thr Lys Leu Thr Arg Val Lys Gly Ser Lys Asn Ile Thr Glu Glu Asp
385 390 395 400

Thr Glu Lys Lys Lys Arg His Asn Leu Lys Arg His Arg Thr Lys Leu
405 410 415

Val Ile Pro Leu Lys Lys Asp Asn Asn Lys Ala Ser Glu Lys Ile Ser
420 425 430

Glu Ile Lys Lys Ser Lys Glu Gly Thr Ile Met Lys Lys Met Glu Thr
435 440 445

ES 2 583 203 T3

Asp Ile Ile Ile Ala Ala Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala Ala Ala Ile
 450 455 460

Thr Ala Gly Glu Asn Asn Leu Lys Ser Ile Leu Phe Glu Lys Ser Ser
 465 470 475 480

Thr Thr Gly Gly Ala Ala Asn Met Gly Met Gly Pro Leu Gly Ile Asp
 485 490 495

Thr Lys Ile Gln Lys Asp Asn Phe Asn Ile Ser Val Ala Gln Ala
 500 505 510

Leu Asp Met His Met Lys Tyr Thr His Tyr Arg Val Asp Glu Asp Leu
 515 520 525

Val Gln Thr Tyr Phe Asn Lys Ser Ala Glu Thr Ile Gln Trp Leu Gln
 530 535 540

Asp Met Gly Val Glu Phe Ala Gly Ala Phe Arg Tyr Phe Lys Glu Ser
 545 550 555 560

Ala Ala Thr Trp His Ile Val Lys Pro Glu Asn Gly Val Ile Gly Pro
 565 570 575

Arg Ala Ala Ser Gly Met Ala Lys Ile Met Thr Glu Arg Ala Lys Glu
 580 585 590

Leu Gly Thr Lys Ile Leu Leu Glu Thr Pro Val Val Ser Leu Ile Lys
 595 600 605

Glu Asn Gly Arg Ile Cys Gly Val Lys Ala Gln Asp Ser Glu Gly Asn
 610 615 620

Ile Ile Glu Val Arg Ala Lys Ala Val Ile Val Ala Thr Gly Gly Phe
 625 630 635 640

Gly Asn Asn Lys Asn Met Ile Lys Ser Glu Phe Gly Leu Thr Ile Gly
 645 650 655

Glu Asp Tyr Phe Pro Phe Met Val Pro Gly Ile Thr Gly Asp Gly Leu
 660 665 670

Lys Met Met Trp Glu Ala Gly Ala Met Lys Tyr Gly Glu Asn Ile Glu
 675 680 685

Ala Ile Tyr Gln Leu Pro Asp Asn Leu Asn Trp Phe Leu Leu Asp Ala
 690 695 700

Val Leu Arg Gln Pro Asn Leu Leu Ile Asn Gln Leu Gly Asp Arg Phe
 705 710 715 720

ES 2 583 203 T3

Met Asn Glu Gly Asp Met Gly Asn Thr Thr Phe Thr Gly Asn Ala Ile
 725 730 735

Ala Met Gln Pro Gly Asn Tyr Ala Tyr Cys Ile Met Asp Glu Gly Ile
 740 745 750

Leu Lys His Tyr Lys Lys Asn Gly Pro Asp Ile Phe Asp Ile Val His
 755 760 765

Pro Ala Asp Ala Phe Leu Ala Val Asp Gly Glu Ile Ala Lys Ala Val
 770 775 780

Glu Gln Gly Tyr Glu Ser Tyr Phe Glu Ala Arg Thr Val Glu Glu Leu
 785 790 795 800

Ala Lys Lys Leu Asn Ile Asp Ala Glu Lys Leu Gln Asp Thr Ile Asp
 805 810 815

Glu Tyr Asn Glu Ala Cys Glu Thr Gly Val Asp Thr Lys Phe His Lys
 820 825 830

Lys Gln Ala Tyr Leu His Pro Ile Thr Gly Lys Gly Lys Tyr Leu Val
 835 840 845

Gly Lys Phe Tyr Leu Gly Ala Tyr Gly Thr Ile Gly Gly Val Arg Ile
 850 855 860

Asn Lys Tyr Cys Glu Val Leu Asp Glu Ser Phe Asn Pro Ile Glu Gly
 865 870 875 880

Leu Tyr Ser Ala Gly Thr Asp Ala Asn Thr Ile Tyr Gly Asp Ser Tyr
 885 890 895

Asn Phe Thr Leu Pro Gly Asn Ser Met Gly Phe Ala Ile Asn Ser Gly
 900 905 910

Arg Met Ala Gly Glu Ser Ala Ala Glu Tyr Ile Glu Glu Val
 915 920 925

<210> 58

<211> 1461

5 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 58

atgagagaat ttgaaacaga tgtagttggt gttggtggag gagcatcagg gctagctgca	60
gcagttactg ctgcagaaaa tggcgcaaaa gtaatggtgc ttgaaaaagc taatactaca	120
ggtggatgtg ctaatatggc aatggggcct ctagggtgtg aaacaagaat gcaaagagaa	180
agacttatag atatctctgt agatagagct ttaataagt tcatggaata ttctactgg	240
agatcagatg caagattgat aagaagatat ttggagcagt cagcaggaac tattgaaatgg	300

10

ES 2 583 203 T3

ttagaaaata tgggagtaga attcgcatta cttcaaagt atttccagc ttcagaagca 360
 acctggcata ttgttaaacc taaaacaggg aaaccgggac ttcgtgcagc tgctactatg 420
 attaaaatta tgacagaaag agcagaagaa ttaggcgcta aaatattatt agaaacacct 480
 gtaaaaagta ttattaaaga tcaaggagaa gtaattggcg taacagctag tgataaagat 540
 ggtgaattag aagtatatgc tggagcagtt atcatcggta caggtggatt tggtgataat 600
 ccagacttta ttaagaagta gtgtggactt gaatggggaa aagatttgtt ctcatataga 660
 attcctggat taactggaga tggaatccag atggcttggg atgctggtgc ttcaaagat 720
 tttatgacta tggaaatggt attttttggc cctaactctg gtggatatgc tcctatagag 780
 ttacctttcc gtcaacctaa tctcttagtt aacctggacg gtgaaagatt tataaatgaa 840
 gaagttatag aaaatcctgt atttaccgca aatgctattg aaaaacaaaa aagaaaaatt 900
 gcatattcta taatagatga agaactaatc aagcattatg aagaaaaggg cttagatctt 960
 ataaatgtgg ttacttctag tatggatatg agttatttta gacaagaaga agaagaagct 1020
 aagaaaaatg gaagtgatgt attatttatt gctgattcta tagaagagtt agctgaaaaa 1080
 actggcattg atgcagaaaa cttaaaaaat accattgata cttataattc ttattgtgat 1140
 tcaaaagatg agttattcca taaaaatcct aaatacttat taccaattaa aggcctctaaa 1200
 tattacgcat taaaacttgg ttttaagtgc tatggaagtg ctggcgggat aaaaataaac 1260
 tataaactctg aagttcttaa tgatgattta aatgttataa agggacttta tgctgctgga 1320
 actgatgcta attcactata taatcctgat tatgcttttg tactacctgg aaattcccta 1380
 ggttttgctt tgaacagcgg aagaatagca gggctagcgg ctgttgaata tattaagca 1440
 aatcttatgg aagaacaata a 1461

<210> 59

<211> 486

5 <212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 59

Met Arg Glu Phe Glu Thr Asp Val Val Val Val Gly Gly Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Ala Ala Ala Val Thr Ala Ala Glu Asn Gly Ala Lys Val Met
 20 25 30

Val Leu Glu Lys Ala Asn Thr Thr Gly Gly Cys Ala Asn Met Ala Met
 35 40 45

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

10 Ile Ser Val Asp Arg Ala Phe Asn Lys Phe Met Glu Tyr Ser His Trp
 65 70 75 80

ES 2 583 203 T3

Arg Ser Asp Ala Arg Leu Ile Arg Arg Tyr Leu Glu Gln Ser Ala Gly
85 90 95

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

Lys Tyr Phe Pro Ala Ser Glu Ala Thr Trp His Ile Val Lys Pro Lys
115 120 125

Thr Gly Lys Pro Gly Leu Arg Ala Ala Ala Thr Met Ile Lys Ile Met
130 135 140

Thr Glu Arg Ala Glu Glu Leu Gly Val Lys Ile Leu Leu Glu Thr Pro
145 150 155 160

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

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

Gly Thr Gly Gly Phe Gly Asp Asn Pro Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Val
195 200 205

Gly Leu Glu Trp Gly Lys Asp Leu Phe Ser Tyr Arg Ile Pro Gly Leu
210 215 220

Thr Gly Asp Gly Ile Gln Met Ala Trp Asp Ala Gly Ala Ser Lys Asp
225 230 235 240

Phe Met Thr Met Glu Met Val Phe Phe Ala Pro Asn Thr Gly Gly Tyr
245 250 255

Ala Pro Ile Glu Leu Pro Phe Arg Gln Pro Asn Leu Leu Val Asn Leu
260 265 270

Asp Gly Glu Arg Phe Ile Asn Glu Glu Val Ile Glu Asn Pro Val Phe
275 280 285

Thr Ala Asn Ala Ile Glu Lys Gln Lys Arg Lys Ile Ala Tyr Ser Ile
290 295 300

Ile Asp Glu Glu Leu Ile Lys His Tyr Glu Glu Lys Gly Leu Asp Leu
305 310 315 320

Ile Asn Val Val Thr Ser Ser Met Asp Met Ser Tyr Phe Arg Gln Glu
325 330 335

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

ES 2 583 203 T3

Ser Ile Glu Glu Leu Ala Glu Lys Thr Gly Ile Asp Ala Glu Asn Leu
 355 360 365
 Lys Asn Thr Ile Asp Thr Tyr Asn Ser Tyr Cys Asp Ser Lys Asp Glu
 370 375 380
 Leu Phe His Lys Asn Pro Lys Tyr Leu Leu Pro Ile Lys Gly Ser Lys
 385 390 395 400
 Tyr Tyr Ala Leu Lys Leu Gly Leu Ser Ala Tyr Gly Ser Ala Gly Gly
 405 410 415
 Ile Lys Ile Asn Tyr Asn Thr Glu Val Leu Asn Asp Asp Leu Asn Val
 420 425 430
 Ile Lys Gly Leu Tyr Ala Ala Gly Thr Asp Ala Asn Ser Leu Tyr Asn
 435 440 445
 Pro Asp Tyr Ala Phe Val Leu Pro Gly Asn Ser Leu Gly Phe Ala Leu
 450 455 460
 Asn Ser Gly Arg Ile Ala Gly Ser Ser Ala Val Glu Tyr Ile Lys Ala
 465 470 475 480
 Asn Leu Met Glu Glu Gln
 485

<210> 60

<211> 1230

5 <212> ADN

<213> Clostridium ragsdalei

<400> 60

atgaacaatt taaaagaaga agcattaaag tttcataaag aacatgaagg taaaatagaa	60
cttaaaagta aagtagctgt taaaacaaga gaggatctgg gtttagcata tactccaggt	120
gttgctgaac catgtcttga aatcaacaaa aactataatg ccctatacga ttatacttct	180
aagggaaatt atgtagcagt agtaactaac ggcagtgcag ttttgggact tggaaatata	240
ggtgctgcag ctggcttgcc tgtaatggaa ggtaaatcta ttctatttaa gacttttgca	300
ggagtagacg cttttcctat ttgtgttgac agcaaagatc ctgacaagat tgtagaaca	360
gtaaaattaa tagaatccac atttggagga ataaacctag aagatataaa agcccctgaa	420
tgctttgaaa tagaagataa attaaaaag gtctgcaata taccagtttt tcatgacgac	480
caacacggaa cagcagtagt aacttttagct gctatgataa acgcgcttaa aatagtaaac	540
aaaaaatttg aagacttaaa agtaataata aatggtgcag gagctgcagg tacagcaatc	600
gcaaagctgc ttgtaagtag aggagttaaa aacattattg tatgcatag aaaaggtgct	660
atatcaaaag atagagaaaa ttaagtgtc gcaaaaaaag acctggcaga aattacaaat	720
10 cctagcatgg taaaaggtgc gcttaaagat gtactaaaag aagctgatgt atttataggt	780

ES 2 583 203 T3

gtatctgctc ctggagtaat tactcctgaa atgataaaaa caatggataa agatcccctc 840
 atttttgcta tggccaatcc taaacctgaa atctaccctg atgaagcaaa agctgcaggt 900
 gccagagtag ttggtacagg aagatcggat tttccaaatc aaataaataa tgttcttgca 960
 ttccctggaa tatttagagg agcacttgat gtaagagcat caaaaataaa cgaagaaatg 1020
 aaaatagctg ctgcatgtgc tatagcagat ataataactg aaaaagaact taatgaagat 1080
 tatgttatac cagatgcttt cgactcaaga atagcaccaa aggtagctta ctatgtagca 1140
 aaagctgcca tagaaagtgg agttgcaaga agaactgaca tcactcctga aatggtagaa 1200
 gaacatacta aaaagcttgt acaagcataa 1230

<210> 61
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Clostridium ragsdalei

5

<400> 61

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

10

ES 2 583 203 T3

Lys Ile Val Asn Lys Lys Phe Glu Asp Leu Lys Val Ile Ile Asn Gly
 180 185 190

Ala Gly Ala Ala Gly Thr Ala Ile Ala Lys Leu Leu Val Ser Arg Gly
 195 200 205

Val Lys Asn Ile Ile Val Cys Asp Arg Lys Gly Ala Ile Ser Lys Asp
 210 215 220

Arg Glu Asn Leu Ser Ala Ala Lys Lys Asp Leu Ala Glu Ile Thr Asn
 225 230 235 240

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

Val Phe Ile Gly Val Ser Ala Pro Gly Val Ile Thr Pro Glu Met Ile
 260 265 270

Lys Thr Met Asp Lys Asp Pro Leu Ile Phe Ala Met Ala Asn Pro Lys
 275 280 285

Pro Glu Ile Tyr Pro Asp Glu Ala Lys Ala Ala Gly Ala Arg Val Val
 290 295 300

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

Phe Pro Gly Ile Phe Arg Gly Ala Leu Asp Val Arg Ala Ser Lys Ile
 325 330 335

Asn Glu Glu Met Lys Ile Ala Ala Ala Cys Ala Ile Ala Asp Ile Ile
 340 345 350

Thr Glu Lys Glu Leu Asn Glu Asp Tyr Val Ile Pro Asp Ala Phe Asp
 355 360 365

Ser Arg Ile Ala Pro Lys Val Ala Tyr Tyr Val Ala Lys Ala Ala Ile
 370 375 380

Glu Ser Gly Val Ala Arg Arg Thr Asp Ile Thr Pro Glu Met Val Glu
 385 390 395 400

Glu His Thr Lys Lys Leu Val Gln Ala
 405

<210> 62
 <211> 1098
 <212> ADN
 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 62

atgtcataca ccaaggttaa gtatgaagat ataaaaaagt tgtgtaattt ggtttttgag

60

5

10

ES 2 583 203 T3

aaatttggat tcaaccagga agatagtaaa accataacta gcgttttgct tttatcagat 120
ctatatggaa ttgaatcaca tggatatcaa aggctagtca aatactacag tgaataaaaa 180
agtggcctta taaatatcaa ttctaaaatg aaaatagtaa aggaaacacc tgtatctgca 240
acaatagatg gcatgggagg tatgggacaa ctaattggta aaaaagccat gaatctggca 300
attaaaaaag ctaaaacttc aggaatgggt atggtagtag ttagaaattc aaatcactat 360
ggatttgcag gctactatgc caaaatggct gaggaggaag gacttcttgg aatttcaatg 420
accaattctc cagctgtaat ggtaccaacc tttggaaaag atgctatgct tggtaacaat 480
cctattgccca tatcttttcc agctaaacc taccatttt taatggatat ggctactagc 540
gtagttacca gaggaaaaat tgaagtttat acaaaaaggc atgaacctct tccacttggg 600
ctcgccttaa atagtgcagg tgaagatact acagatcccc tagatgtact tcttaatgta 660
cgaaaaaatt ctggaggagg cctgcttct cttggaggat caaaagaatc aactggagga 720
cataaagggt atggatttgc acttgcagtt gaaatgttta cagcaatttt gtctggagga 780
tttactgcaa ataaagttag ctagataga gaaatggat ctggaacatg tcattatttc 840
tttgcagtgg attatggat atttggggat aaacaatcca ttgaagagaa cttttccagt 900
tacctaaatg aacttagaaa ttcaaaaaa gcaaaaggcg ccacaagaat atatactcat 960
ggtgagaaag aagtagaatc ctataaggat aaaatggaaa atggaattcc agtaaatgag 1020
actactctta aagaaatata cgacatatgt gactacttta atataaaagc tagtgattat 1080
gtaactaaag taatataa 1098

<210> 63
<211> 365
5 <212> PRT
<213> Clostridium ragsdalei

<400> 63

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

ES 2 583 203 T3

Met Asn Leu Ala Ile Lys Lys Ala Lys Thr Ser Gly Met Gly Met Val
 100 105 110

Val Val Arg Asn Ser Asn His Tyr Gly Ile Ala Gly Tyr Tyr Ala Lys
 115 120 125

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

Ala Val Met Val Pro Thr Phe Gly Lys Asp Ala Met Leu Gly Thr Asn
 145 150 155 160

Pro Ile Ala Ile Ser Phe Pro Ala Lys Pro Tyr Pro Phe Leu Met Asp
 165 170 175

Met Ala Thr Ser Val Val Thr Arg Gly Lys Ile Glu Val Tyr Asn Lys
 180 185 190

Arg His Glu Pro Leu Pro Leu Gly Leu Ala Leu Asn Ser Asp Gly Glu
 195 200 205

Asp Thr Thr Asp Pro Leu Asp Val Leu Leu Asn Val Arg Lys Asn Ser
 210 215 220

Gly Gly Gly Leu Leu Pro Leu Gly Gly Ser Lys Glu Ser Thr Gly Gly
 225 230 235 240

His Lys Gly Tyr Gly Phe Ala Leu Ala Val Glu Met Phe Thr Ala Ile
 245 250 255

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

Gly Ser Gly Thr Cys His Tyr Phe Phe Ala Val Asp Tyr Gly Ile Phe
 275 280 285

Gly Asp Lys Gln Ser Ile Glu Glu Asn Phe Ser Ser Tyr Leu Asn Glu
 290 295 300

Leu Arg Asn Ser Lys Lys Ala Lys Gly Ala Thr Arg Ile Tyr Thr His
 305 310 315 320

Gly Glu Lys Glu Val Glu Ser Tyr Lys Asp Lys Met Glu Asn Gly Ile
 325 330 335

Pro Val Asn Glu Thr Thr Leu Lys Glu Ile Tyr Asp Ile Cys Asp Tyr
 340 345 350

Phe Asn Ile Lys Ala Ser Asp Tyr Val Thr Lys Val Ile
 355 360 365

<210> 64

<211> 2634

<212> ADN

<213> Clostridium ragsdalei

<400> 64

5

ES 2 583 203 T3

atgaatggta agaagtacgt ttatcttttc aatgaaggaa atgctggcat gagaaattha	60
cttgaggca agggagctaa tcttgcagaa atgaccaatc ttggcatacc cgttcctggt	120
ggatttacta tatccacaga ggcattgtacc aatattatg aagatggtaa atccatatca	180
cagcaagtta tagatcaaat ttatgatgca cttaaaaatg tggaaagagac aacaggaaaa	240
aagtttgaa gtatagagaa tccactgtta gtttcagtaa ggtcaggagc cagagtttct	300
atgccaggaa tgatggatac tatattaat ttgggattaa atgatgatac tgtaatagga	360
cttaaaaagc taacaggaaa tgaagatatt gcgatgatt cttatagaag atttattcaa	420
atgttttcag atgtagttat gggaaattgaa aagagagaat ttgaagatgt gctggatgac	480
gtaaaaatg ctaaaggagt aaaatacgat acagatttag atgaatccga tttaaaggat	540
ataatccaga aatttaaga tatttacaaa aaagaagtaa aggaagactt tcctcaagat	600
cctaaggaac agttaattca gtcagttact gcagtgttta gatcttggga aaaccttaga	660
gcaataatth acagaaggtt aaacgatata tcaggtgatt ggggaactgc agtaaatggt	720
caatcaatgg tattttgaaa tatgggagag acttcaggaa caggagttgc atttactaga	780
aacctatcta caggggaaaa gtccatattt ggtgaatata tcataaacgc tcaaggagag	840
gatgtagttg cagggataag aacacctcaa cctatacaa agctaaaaga agacctcca	900
aatgtttatt ctcaatttat gaggatagcg aataaactcg aaaatcatta taaagatatg	960
caggatatgg agtttactat agagcagggg aaattatatt tccttcagac gagaaacggt	1020
aagagaacag cttaggctgc acttagaata gcagtaaata tggtagatga aggtctcatc	1080
actaaagaag aggccatact taaagttgag cctaaacagc ttgacacact attgcatcca	1140
aactttgaca gtgatgaatt gaaacgggca gctgtaatag caaatggact tcctgcatca	1200
ccaggagcag cttgtggtaa gatataatth acagcagatg atgctaagaa acatcatgat	1260
caaggtgaaa aggtaatact tgtaaggtta gagacttccc cagaagatat agaaggaatg	1320
gcagcttctg aaggaatact tacagttaga ggaggtatga catctcatgc agctgttgta	1380
gcaagaggta tgggaacatg ctgtgtagct ggatgtggtg atcttatagt aagtgaaaag	1440
gaaaagctth tcaaaagatt agataaggtt tataaagaag gagattacat atctttagat	1500
ggaagtactg gaaatgttta tggagagcct ataaagactg tagcaccaga aatatcggga	1560
gattttgaa tcttcatggg atgggctgat aatataagaa aattaggagt tagaaccaat	1620
gcagatacac caagagatgc aaaccaggct attagttttg gtgccgaagg aataggactt	1680
tgtagaacag agcatatgth cttcagatgaa gatagaatac cagaaatgag agaaatgata	1740
gtttcaaaaa cggaagagca gagaagaaaa gcttttagata aattgctacc aagacaaaag	1800
aaagatttha ttggaatata tgaggcaatg gaaggaaaac ctgtcacaat tagatthttg	1860

ES 2 583 203 T3

gatccaccac ttcatgaatt cttacctact gaaactgagg atatagaggc tttagcaaag 1920
 gaagtgggag taagttttca agaattgaaa gatactatag attctctaca tgaatttaat 1980
 cctatgatgg gacatagagg atgcaggctt actgtttcat atccagaaat agctgaaatg 2040
 caaacaaggg ctattataga agcagctata gatgttaaga agagaaaagg gtatgatata 2100
 gttccagaaa ttatgatacc tcttgtagga gaagtaaaag aattaaata tgtaaagat 2160
 gtagttgtaa aggtagcaga tgaaataata caaaaagagg gagtcaattt aaaatatgaa 2220
 gtaggaacta tgatagaaat tccaagagcg gctattacag ctgatgaaat agcaaaagaa 2280
 gctgagttct tctcatttgg aactaatgat ttaactcaaa tgacttttgg attttcaaga 2340
 gatgatgcag gtaaattttt aatgattat tatgataaaa aagtatatga gtttgatcca 2400
 ttccaaaagt tagatcagat tggagtagga aaacttgtag agactgctgt aaaattaggt 2460
 aaaaagacta gacctgacat tcactttgga atatgtggag aacatggagg ggatccatct 2520
 tctgtagaat ttttccacaa tgtaggactt gactatgtat cttgttcacc atttagggta 2580
 cctgtggcaa gacttgctgc agctcaagct caataaaga atccaagaaa gtaa 2634

<210> 65

<211> 877

<212> PRT

<213> Clostridium ragsdalei

<400> 65

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

Met Arg Asn Leu Leu Gly Gly Lys Gly Ala Asn Leu Ala Glu Met Thr
 20 25 30

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

Cys Thr Lys Tyr Tyr Glu Asp Gly Lys Ser Ile Ser Gln Gln Val Ile
 50 55 60

Asp Gln Ile Tyr Asp Ala Leu Lys Asn Val Glu Glu Thr Thr Gly Lys
 65 70 75 80

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

Ala Arg Val Ser Met Pro Gly Met Met Asp Thr Ile Leu Asn Leu Gly
 100 105 110

Leu Asn Asp Asp Thr Val Ile Gly Leu Lys Lys Leu Thr Gly Asn Glu
 115 120 125

Arg Phe Ala Tyr Asp Ser Tyr Arg Arg Phe Ile Gln Met Phe Ser Asp
 130 135 140

5

10

ES 2 583 203 T3

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

ES 2 583 203 T3

Lys His His Asp Gln Gly Glu Lys Val Ile Leu Val Arg Leu Glu Thr
 420 425 430
 Ser Pro Glu Asp Ile Glu Gly Met Ala Ala Ser Glu Gly Ile Leu Thr
 435 440 445
 Val Arg Gly Gly Met Thr Ser His Ala Ala Val Val Ala Arg Gly Met
 450 455 460
 Gly Thr Cys Cys Val Ala Gly Cys Gly Asp Leu Ile Val Ser Glu Lys
 465 470 475 480
 Glu Lys Leu Phe Lys Arg Leu Asp Lys Val Tyr Lys Glu Gly Asp Tyr
 485 490 495
 Ile Ser Leu Asp Gly Ser Thr Gly Asn Val Tyr Gly Glu Pro Ile Lys
 500 505 510
 Thr Val Ala Pro Glu Ile Ser Gly Asp Phe Gly Ile Phe Met Gly Trp
 515 520 525
 Ala Asp Asn Ile Arg Lys Leu Gly Val Arg Thr Asn Ala Asp Thr Pro
 530 535 540
 Arg Asp Ala Asn Gln Ala Ile Ser Phe Gly Ala Glu Gly Ile Gly Leu
 545 550 555 560
 Cys Arg Thr Glu His Met Phe Phe Asp Glu Asp Arg Ile Pro Glu Met
 565 570 575
 Arg Glu Met Ile Val Ser Lys Thr Glu Glu Gln Arg Arg Lys Ala Leu
 580 585 590
 Asp Lys Leu Leu Pro Arg Gln Lys Lys Asp Phe Ile Gly Ile Tyr Glu
 595 600 605
 Ala Met Glu Gly Lys Pro Val Thr Ile Arg Phe Leu Asp Pro Pro Leu
 610 615 620
 His Glu Phe Leu Pro Thr Glu Thr Glu Asp Ile Glu Ala Leu Ala Lys
 625 630 635 640
 Glu Val Gly Val Ser Phe Gln Glu Leu Lys Asp Thr Ile Asp Ser Leu
 645 650 655
 His Glu Phe Asn Pro Met Met Gly His Arg Gly Cys Arg Leu Thr Val
 660 665 670
 Ser Tyr Pro Glu Ile Ala Glu Met Gln Thr Arg Ala Ile Ile Glu Ala
 675 680 685

ES 2 583 203 T3

Ala Ile Asp Val Lys Lys Arg Lys Gly Tyr Asp Ile Val Pro Glu Ile
 690 695 700

Met Ile Pro Leu Val Gly Glu Val Lys Glu Leu Lys Tyr Val Lys Asp
 705 710 715 720

Val Val Val Lys Val Ala Asp Glu Ile Ile Gln Lys Glu Gly Val Asn
 725 730 735

Leu Lys Tyr Glu Val Gly Thr Met Ile Glu Ile Pro Arg Ala Ala Ile
 740 745 750

Thr Ala Asp Glu Ile Ala Lys Glu Ala Glu Phe Phe Ser Phe Gly Thr
 755 760 765

Asn Asp Leu Thr Gln Met Thr Phe Gly Phe Ser Arg Asp Asp Ala Gly
 770 775 780

Lys Phe Leu Asn Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys Val Tyr Glu Phe Asp Pro
 785 790 795 800

Phe Gln Lys Leu Asp Gln Ile Gly Val Gly Lys Leu Val Glu Thr Ala
 805 810 815

Val Lys Leu Gly Lys Lys Thr Arg Pro Asp Ile His Leu Gly Ile Cys
 820 825 830

Gly Glu His Gly Gly Asp Pro Ser Ser Val Glu Phe Phe His Asn Val
 835 840 845

Gly Leu Asp Tyr Val Ser Cys Ser Pro Phe Arg Val Pro Val Ala Arg
 850 855 860

Leu Ala Ala Ala Gln Ala Gln Ile Lys Asn Pro Arg Lys
 865 870 875

<210> 66
 <211> 3447
 <212> ADN
 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 66

atggcgtact tgttaaagag gtttaagagg gttctttag cgaatagagg agaaatagcc	60
ataagaatat tcagagcatg taaagaattg ggaataacta ctgtagcagt atattcaaat	120
gaggataaga gatctctttt cagaactaaa gctgatgaat cctatatgat agggaaaaat	180
aagggacctg tagaagcata tttagatatt gatgaaataa tagatatagc tttgaagaaa	240
aatgtagatg caatacatcc gggttatgga tttctatcag aaaatcctga attggcaaaa	300
aagtgtaaag aagcaggat tgaatttata ggacctacat cagatatgat ggagatgctt	360

10

ES 2 583 203 T3

ggtgataaga taaaatctaa gattggtgca caaaaggctg gggttccaac aataccagga 420
 gttcaagagg ctataaagac agaagaagaa gctttaaataa ttgctaagtt ctgtggatat 480
 cctgtcatga ttaaagcagc tgatggcggg ggcggcagag gaatgagaat agtaagggaa 540
 gaaaaagatc tcgtagaatc ctacaacagt gctaaaaacg aatccagaaa agcttttggt 600
 tcagaaaaaa tatatattga aaaatatatt gaaagtccaa aacacataga ggtgcaggta 660
 ctcggagata agtacggcaa tattgtccat ctgtatgaaa gagattgttc tatacagagg 720
 agacatcaaa aggtgataga atttacacca tctttagccc tctcagaaga aaaaagacaa 780
 caaatatgtg aagatgcttt aaaattgca agaactgtag gatatacaag tgcagggtacc 840
 ttggagtttt tggttgataa aaacggaaat cactatttca tagagatgaa tactagaatt 900
 caggtagaac atactgtaac tgaaatgggt acaggaatag atatagttca agatcaaata 960
 cttattgcag aagggcattc acttgattct aaggaaatag gaataaaatc tcaagatgat 1020
 atagagttaa aaggatattc aatacaatgc agaattacga cagaagatcc tttaaataat 1080
 tttgcaccag atacaggaag aatagatatg tatagaactg gttctggatt tggataaaga 1140
 cttgatggag ggaatggatt tacaggcaca gtaataagtc ctcattatga tagtttgcta 1200
 gtaaaaactg tatcttggtc aagaactttt gaagatgcca taagaaaggc aataagggtct 1260
 ataaatgaga ctgttatatc aggagtaaag acaaatgcag actttataat aaaagtgtta 1320
 agtcatgaaa agtttataaa aggtgaatgt gatactaatt ttattgaaga taatccagat 1380
 ttatttgata taaaacaaaa actagataaa gagatgagtg tacttaaatt tataggaaat 1440
 aaagtagtaa atgagactcg tggaaagaag aagaaatita atatacctat tgtacaaaaa 1500
 gtagaagaaa atattaaatt gagtggaacg aagcagatac ttgataccaa aggagcagat 1560
 ggattagttg atttgataaa atcacaagat aagcttctta ttacagatac tactatgaga 1620
 gatgcccatac agtcgcttat ggcaactagg gtgagaacta gagatttgct taagatagca 1680
 aaagcacaat cagtattgac aaacgatctt ttctccatgg aaatgtgggg aggagcaact 1740
 tttgatgtag cttatagatt tttaaatgaa tctccttggg aaagactaga aaaacttaga 1800
 gaaaagggtc ctaatatact attccagatg ctcataagag gagctaatic agtaggatat 1860
 aagaactatc ctgataatgt tattagagaa tttataaaac aatctgcagc ttcagggtatt 1920
 gatgtattta gagtatttga tgctttaaac tggcttaaaag gaatggaagt ttctatagat 1980
 cagacattaa aagaaggaaa aatagctgaa gcatgtatgt gctatacagg agatgtatta 2040
 gatgacaagg aagataaata tacacttcag tactatgtaa acttagctaa agaaatagag 2100
 aaaactggag cacagattct tggataaaag gatatgtctg ccctattaa gccatattct 2160
 gcttataaac ttgtaaaagc acttaagaat gaggtatcta ttccaataca tcttcatact 2220
 catgatacta caggtaatgg tgtggcaaca gtactcatgg ctgccgatgc aggacttgat 2280
 atagctgata ctgcattcaa tagtatgtct gggcttacta gccagccagc tttgaattca 2340
 atagcagcag cacttaaaaa tacacctaga gatactaagt tagatgcaga taatcttcaa 2400

ES 2 583 203 T3

aaaatatcta actattggga agatgtaagg cctatataca gtcagtttga gtcaggactt 2460
 aagtcgagta ctgcagaaat atacaagtat gagataccag gaggtcaata ttcaaactta 2520
 aaacctcagg ttgaaagttt tgggttgggg gatcgTTTTg aagatgtaaa ggaaatgtat 2580
 aagagagtta ataaaatgct tggcaacata attaaagtaa ctccttcttc aaaaatggta 2640
 ggagacctgg ctatattcat gatacaaaat gatttagatg aaaagaatat ttatgaaaaa 2700
 ggtaagagct taactttccc agattctaca atttcttact ttaagggaaat gatgggtcag 2760
 cctatgggag gattcccaaa ggaacttcaa aaagtagttt taaagggaga agaacctttt 2820
 acggtaagac caggagaact tttaccacca gaagattttg ccaaaataaa agagtattta 2880
 actaaaaaat ataagagaga atttaataat aaagaactta taagctatgc tatgtatcct 2940
 gatgtatatg aaggttatct taaattctta agtgaatatg gtgatcttag cagaatggaa 3000
 agtgaacat tcttctatgg acttgcggaa ggagaacttt gtgaagtga aataggagaa 3060
 ggaaagagtt tttttgtaca gttattagag attcaaaaag ttgatgatga aggatacaga 3120
 ttcttagtat ttgaggtaaa tggattaag agagacataa ggataaaaga taacttggct 3180
 ttctctggat caggaataaa agaaaattca tgtgttatgg cagatgaaga tgatgaaaaa 3240
 gaaataggat caagtatacc tggaaacatt gttaaagtac ttgtaaacc aggagataaa 3300
 gtagaagagg gccagagctt aattgtaata gaagctatga aaatggaaac aaatgttca 3360
 gctgctgaag caggagtaat tgatggagta tttgtaaaag aaggccagag agttaaaact 3420
 ggagaacttt taattagatt aaaatag 3447

<210> 67

<211> 1148

5 <212> PRT

<213> Clostridium ragsdalei

<400> 67

Met Ala Tyr Leu Leu Lys Arg Phe Lys Arg Val Leu Val Ala Asn Arg
 1 5 10 15

Gly Glu Ile Ala Ile Arg Ile Phe Arg Ala Cys Lys Glu Leu Gly Ile
 20 25 30

Thr Thr Val Ala Val Tyr Ser Asn Glu Asp Lys Arg Ser Leu Phe Arg
 35 40 45

Thr Lys Ala Asp Glu Ser Tyr Met Ile Gly Lys Asn Lys Gly Pro Val
 50 55 60

Glu Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Asp Ile Ala Leu Lys Lys
 65 70 75 80

10 Asn Val Asp Ala Ile His Pro Gly Tyr Gly Phe Leu Ser Glu Asn Pro
 85 90 95

ES 2 583 203 T3

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

ES 2 583 203 T3

Asp Met Tyr Arg Thr Gly Ser Gly Phe Gly Ile Arg Leu Asp Gly Gly
 370 375 380

Asn Gly Phe Thr Gly Ala Val Ile Ser Pro His Tyr Asp Ser Leu Leu
 385 390 395 400

Val Lys Thr Val Ser Trp Ser Arg Thr Phe Glu Asp Ala Ile Arg Lys
 405 410 415

Ala Ile Arg Ser Ile Asn Glu Thr Val Ile Ser Gly Val Lys Thr Asn
 420 425 430

Ala Asp Phe Ile Ile Lys Val Leu Ser His Glu Lys Phe Ile Lys Gly
 435 440 445

Glu Cys Asp Thr Asn Phe Ile Glu Asp Asn Pro Asp Leu Phe Asp Ile
 450 455 460

Lys Pro Lys Leu Asp Lys Glu Met Ser Val Leu Lys Phe Ile Gly Asn
 465 470 475 480

Lys Val Val Asn Glu Thr Arg Gly Lys Lys Lys Lys Phe Asn Ile Pro
 485 490 495

Ile Val Pro Lys Val Glu Glu Asn Ile Lys Leu Ser Gly Thr Lys Gln
 500 505 510

Ile Leu Asp Thr Lys Gly Ala Asp Gly Leu Val Asp Trp Ile Lys Ser
 515 520 525

Gln Asp Lys Leu Leu Ile Thr Asp Thr Thr Met Arg Asp Ala His Gln
 530 535 540

Ser Leu Met Ala Thr Arg Val Arg Thr Arg Asp Leu Leu Lys Ile Ala
 545 550 555 560

Lys Ala Gln Ser Val Leu Thr Asn Asp Leu Phe Ser Met Glu Met Trp
 565 570 575

Gly Gly Ala Thr Phe Asp Val Ala Tyr Arg Phe Leu Asn Glu Ser Pro
 580 585 590

Trp Glu Arg Leu Glu Lys Leu Arg Glu Lys Val Pro Asn Ile Leu Phe
 595 600 605

Gln Met Leu Ile Arg Gly Ala Asn Ala Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Pro
 610 615 620

Asp Asn Val Ile Arg Glu Phe Ile Lys Gln Ser Ala Ala Ser Gly Ile
 625 630 635 640

ES 2 583 203 T3

Asp Val Phe Arg Val Phe Asp Ala Leu Asn Trp Leu Lys Gly Met Glu
645 650 655

Val Ser Ile Asp Gln Thr Leu Lys Glu Gly Lys Ile Ala Glu Ala Cys
660 665 670

Met Cys Tyr Thr Gly Asp Val Leu Asp Asp Lys Glu Asp Lys Tyr Thr
675 680 685

Leu Gln Tyr Tyr Val Asn Leu Ala Lys Glu Ile Glu Lys Thr Gly Ala
690 695 700

Gln Ile Leu Gly Ile Lys Asp Met Ser Ala Leu Leu Lys Pro Tyr Ser
705 710 715 720

Ala Tyr Lys Leu Val Lys Ala Leu Lys Asn Glu Val Ser Ile Pro Ile
725 730 735

His Leu His Thr His Asp Thr Thr Gly Asn Gly Val Ala Thr Val Leu
740 745 750

Met Ala Ala Asp Ala Gly Leu Asp Ile Ala Asp Thr Ala Phe Asn Ser
755 760 765

Met Ser Gly Leu Thr Ser Gln Pro Ala Leu Asn Ser Ile Ala Ala Ala
770 775 780

Leu Lys Asn Thr Pro Arg Asp Thr Lys Leu Asp Ala Asp Asn Leu Gln
785 790 795 800

Lys Ile Ser Asn Tyr Trp Glu Asp Val Arg Pro Ile Tyr Ser Gln Phe
805 810 815

Glu Ser Gly Leu Lys Ser Ser Thr Ala Glu Ile Tyr Lys Tyr Glu Ile
820 825 830

Pro Gly Gly Gln Tyr Ser Asn Leu Lys Pro Gln Val Glu Ser Phe Gly
835 840 845

Leu Gly Asp Arg Phe Glu Asp Val Lys Glu Met Tyr Lys Arg Val Asn
850 855 860

Lys Met Leu Gly Asn Ile Ile Lys Val Thr Pro Ser Ser Lys Met Val
865 870 875 880

Gly Asp Leu Ala Ile Phe Met Ile Gln Asn Asp Leu Asp Glu Lys Asn
885 890 895

Ile Tyr Glu Lys Gly Lys Ser Leu Thr Phe Pro Asp Ser Thr Ile Ser
900 905 910

ES 2 583 203 T3

Tyr Phe Lys Gly Met Met Gly Gln Pro Met Gly Gly Phe Pro Lys Glu
 915 920 925
 Leu Gln Lys Val Val Leu Lys Gly Glu Glu Pro Phe Thr Val Arg Pro
 930 935 940
 Gly Glu Leu Leu Pro Pro Glu Asp Phe Ala Lys Ile Lys Glu Tyr Leu
 945 950 955 960
 Thr Lys Lys Tyr Lys Arg Glu Phe Asn Asn Lys Glu Leu Ile Ser Tyr
 965 970 975
 Ala Met Tyr Pro Asp Val Tyr Glu Gly Tyr Leu Lys Phe Leu Ser Glu
 980 985 990
 Tyr Gly Asp Leu Ser Arg Met Glu Ser Glu Thr Phe Phe Tyr Gly Leu
 995 1000 1005
 Ala Glu Gly Glu Leu Cys Glu Val Glu Ile Gly Glu Gly Lys Ser
 1010 1015 1020
 Leu Phe Val Gln Leu Leu Glu Ile Thr Lys Val Asp Asp Glu Gly
 1025 1030 1035
 Tyr Arg Phe Leu Val Phe Glu Val Asn Gly Ile Lys Arg Asp Ile
 1040 1045 1050
 Arg Ile Lys Asp Asn Leu Ala Phe Ser Gly Ser Gly Ile Lys Glu
 1055 1060 1065
 Asn Ser Cys Val Met Ala Asp Glu Asp Asp Glu Lys Glu Ile Gly
 1070 1075 1080
 Ser Ser Ile Pro Gly Asn Ile Val Lys Val Leu Val Lys Pro Gly
 1085 1090 1095
 Asp Lys Val Glu Glu Gly Gln Ser Leu Ile Val Ile Glu Ala Met
 1100 1105 1110
 Lys Met Glu Thr Asn Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly Val Ile Asp
 1115 1120 1125
 Gly Val Phe Val Lys Glu Gly Gln Arg Val Lys Thr Gly Glu Leu
 1130 1135 1140
 Leu Ile Arg Leu Lys
 1145

<210> 68

<211> 1506

5 <212> ADN

<213> Clostridium ragsdalei

<400> 68

ES 2 583 203 T3

ttgaatatta ataaatatag aaatatgtat aaaaatttat caccatcgga attaacggaa 60
 ttttcaatta aaaggggaga aggattttta tcaaataagg gagctcttat gattaatact 120
 ggaaagtata caggaagatc tcctaaagat agatttatag ttaatcaaga aagcattagg 180
 aacaaaataa actggggaaa tgtaaacttt tctatagaag aagatatttt taataaaatg 240
 tatgataaga ttttaaatta tataagtgat aaagacattt ttgtgtttga tggatttggt 300
 ggagctttiaa aaaaatatac ccttcctata agagtaatat gcgaaagagc atcccaggcg 360
 ttgtttgcaa atcaattggt tagaaggcca acggaggagg atttaaagtg ttttactcct 420
 gaatttaata ttatatcggg acctggattt aaagctaagg ggaaagagga cggtttaaat 480
 tcagatgcct ttattttagt aaattttgat aaaaaatta tattaatagg gggaaccagt 540
 tactcgggag aaataaaaaa atcagtattt tcagtaatga actttttgct tccacaaaaa 600
 ggggcatgct ctatgactgt ttctgcta ataggacaag acaataaaac ttgcttattt 660
 tttgggttgt caggaacagg aaaaaccact ttatcagcag atggtgaaag aagattaatt 720
 ggtgatgacg aacatggatg gtctaataaa ggtgtattta attttgaggg tggatgttat 780
 gctaaaacta taaggcttga taaggaaaag gaaagccaga tatacaatgc cataaaattt 840
 ggaactgtag ttgaaaatgt agtggcagat gagaataggg tacctgatta taatgatggt 900
 aggtatactg aaaatacaag ggcagcatat cctataaatt atatagataa tatagaagaa 960
 agcgggtgtag gaggaaatcc agagactata atatttttaa ctgcagatgc ttttggtgta 1020
 atgccaccta tatcaagact ttctaaagaa gcagcaatgt atcactttat gtctggatat 1080
 accgcaaga tagctggaac tgaaagagga ataattgaac ctcaagctac ttttcctct 1140
 tgctttgggt aaccttttat gttaatgaat cctgctgtct atgcaaagct gttaggcgaa 1200
 agaatagaca agtataacac ccaggtatat ttagtgaata ctggatggct atctggagga 1260
 tatgaaatg gagatagaat aaaactttcc tatacaagaa ctatgattag agaagctttg 1320
 aaaggaaaat tcaaagatgt tgattttgtg gaacatcctg tgtttaaagt aatgatgcct 1380
 acaagatgtc caggtgtacc tgatgaaata ttaaacccta gaaatacatg gcaagataaa 1440
 gaagcgtatg atgagacagc gagaaagctg gcaatgaagt ttagtaaaaa ctttgagaag 1500
 ttttaa 1506

<210> 69

<211> 501

5 <212> PRT

<213> Clostridium ragsdalei

<400> 69

Met Asn Ile Asn Lys Tyr Arg Asn Met Tyr Lys Asn Leu Ser Pro Ser
 1 5 10 15

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

ES 2 583 203 T3

Lys Gly Ala Leu Met Ile Asn Thr Gly Lys Tyr Thr Gly Arg Ser Pro
 35 40 45
 Lys Asp Arg Phe Ile Val Asn Gln Glu Ser Ile Arg Asn Lys Ile Asn
 50 55 60
 Trp Gly Asn Val Asn Leu Ser Ile Glu Glu Asp Ile Phe Asn Lys Met
 65 70 75 80
 Tyr Asp Lys Ile Leu Asn Tyr Ile Ser Asp Lys Asp Ile Phe Val Phe
 85 90 95
 Asp Gly Phe Val Gly Ala Leu Lys Lys Tyr Thr Leu Pro Ile Arg Val
 100 105 110
 Ile Cys Glu Arg Ala Ser Gln Ala Leu Phe Ala Asn Gln Leu Phe Arg
 115 120 125
 Arg Pro Thr Glu Glu Asp Leu Lys Cys Phe Thr Pro Glu Phe Asn Ile
 130 135 140
 Ile Ser Val Pro Gly Phe Lys Ala Lys Gly Lys Glu Asp Gly Leu Asn
 145 150 155 160
 Ser Asp Ala Phe Ile Leu Val Asn Phe Asp Lys Lys Ile Ile Leu Ile
 165 170 175
 Gly Gly Thr Ser Tyr Ser Gly Glu Ile Lys Lys Ser Val Phe Ser Val
 180 185 190
 Met Asn Phe Leu Leu Pro Gln Lys Gly Val Met Pro Met His Cys Ser
 195 200 205
 Ala Asn Ile Gly Gln Asp Asn Lys Thr Cys Leu Phe Phe Gly Leu Ser
 210 215 220
 Gly Thr Gly Lys Thr Thr Leu Ser Ala Asp Gly Glu Arg Arg Leu Ile
 225 230 235 240
 Gly Asp Asp Glu His Gly Trp Ser Asn Glu Gly Val Phe Asn Phe Glu
 245 250 255
 Gly Gly Cys Tyr Ala Lys Thr Ile Arg Leu Asp Lys Glu Lys Glu Ser
 260 265 270
 Gln Ile Tyr Asn Ala Ile Lys Phe Gly Thr Val Val Glu Asn Val Val
 275 280 285
 Ala Asp Glu Asn Arg Val Pro Asp Tyr Asn Asp Gly Arg Tyr Thr Glu
 290 295 300

ES 2 583 203 T3

Asn Thr Arg Ala Ala Tyr Pro Ile Asn Tyr Ile Asp Asn Ile Glu Glu
 305 310 315 320

Ser Gly Val Gly Gly Asn Pro Glu Thr Ile Ile Phe Leu Thr Ala Asp
 325 330 335

Ala Phe Gly Val Met Pro Pro Ile Ser Arg Leu Ser Lys Glu Ala Ala
 340 345 350

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

Arg Gly Ile Ile Glu Pro Gln Ala Thr Phe Ser Ser Cys Phe Gly Glu
 370 375 380

Pro Phe Met Leu Met Asn Pro Ala Val Tyr Ala Lys Leu Leu Gly Glu
 385 390 395 400

Arg Ile Asp Lys Tyr Asn Thr Gln Val Tyr Leu Val Asn Thr Gly Trp
 405 410 415

Leu Ser Gly Gly Tyr Gly Asn Gly Asp Arg Ile Lys Leu Ser Tyr Thr
 420 425 430

Arg Thr Met Ile Arg Glu Ala Leu Lys Gly Lys Phe Lys Asp Val Asp
 435 440 445

Phe Val Glu His Pro Val Phe Lys Val Met Met Pro Thr Arg Cys Pro
 450 455 460

Gly Val Pro Asp Glu Ile Leu Asn Pro Arg Asn Thr Trp Gln Asp Lys
 465 470 475 480

Glu Ala Tyr Asp Glu Thr Ala Arg Lys Leu Ala Met Lys Phe Ser Lys
 485 490 495

Asn Phe Glu Lys Phe
 500

<210> 70
 <211> 843
 <212> ADN
 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 70

atgagagaag tagatgtatc cactataaca aaagctgtta gaaatctctg tatagatgcc	60
aattattatc tttcggagga tgtaagaaa aagataaaag aatgtgaaga ggacgaaaaa	120
tggcctactg caaaagacat tttaggtaaa atacttgaaa atatagatat atctaaaaat	180
gaagatgtgc ctatgtgtca ggatacagga atggcttgtg tatttgtaac aattggccag	240

ES 2 583 203 T3

gatgttcata tagtaggagg aagtttagaa gacgcàatàa ataagggagt aagtcagga 300
 tatgtagaag ggtatttaag aaagtctgta gtctctgatc ctataaatag agttaatact 360
 aaggataata ctctgcagt aatatattat gaaatagttc caggagataa acttaacata 420
 aaagtggctc ctaaaggatt tggatcagaa aatatgagcc agataaaaat gcttaacca 480
 gcagatggac ttaaggggtgt taaagatttc gtaataaaag tagtaaagga cgcaggacca 540
 aatccatgtc ctctatggt tgtaggagta ggtataggag gaacttttga caaggctgca 600
 aatcttgcaa agaaagctct tgtaagacca ttatctgaaa gaaataaaaa taagttttat 660
 tcagatttag aaaatgaact tttagacaaa ataaatttcc taggtatagg acctcaagga 720
 ctagggggaa agactacagc tcttgtagta aatatagaaa cttatcttac gcatatagca 780
 ggattacctg tagccgtaaa tataaattgc catgttacia gacataagga aatagaattg 840
 taa 843

<210> 71
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Clostridium ragsdalei

5

<400> 71

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

10

ES 2 583 203 T3

Ala Asp Gly Leu Lys Gly Val Lys Asp Phe Val Ile Lys Val Val Lys
 165 170 175
 Asp Ala Gly Pro Asn Pro Cys Pro Pro Met Val Val Gly Val Gly Ile
 180 185 190
 Gly Gly Thr Phe Asp Lys Ala Ala Asn Leu Ala Lys Lys Ala Leu Val
 195 200 205
 Arg Pro Leu Ser Glu Arg Asn Lys Asn Lys Phe Tyr Ser Asp Leu Glu
 210 215 220
 Asn Glu Leu Leu Asp Lys Ile Asn Phe Leu Gly Ile Gly Pro Gln Gly
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Lys Thr Thr Ala Leu Ala Val Asn Ile Glu Thr Tyr Pro
 245 250 255
 Thr His Ile Ala Gly Leu Pro Val Ala Val Asn Ile Asn Cys His Val
 260 265 270
 Thr Arg His Lys Glu Ile Glu Leu
 275 280

<210> 72
 <211> 574
 5 <212> ADN
 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 72

atgtatatgg aaaaaaagat aactactccg ttaacggaag waaaagggtta aaactttaa 60
 agcaggggat agtgttttaa tatcaggac aatatatact gctagagatg ctgctcataa 120
 gagattggtc gagttattag atgaaggtaa atctcttcct atagatgtaa aagatgcaat 180
 aatatattac gcaggaccaa gtcctgcaa accaggccat gtaatagggtt cagctggacc 240
 aacaagtagt tatagaatgg acccatttgc accaagactg cttgatatag ggttaaaagg 300
 aatgatagga aaaggccttc gttcaaaaga agttatagaa tccatgaaga aaaatggagc 360
 tgtttacttt gctgcaatag gcggggctgc agcacttgta gcaaaatcca taaagaaagc 420
 agaagtagta gcttatgaag atttggattc tgaagctata agaaaattag aagtaaaaga 480
 tttacctgta attgtagtaa tagattcaga gggcaataat ttatatgaat caggacgaaa 540
 10 agagtacttg gactctgtgg gccagtctaa gtaa 574

<210> 73
 <211> 190
 <212> PRT
 15 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 73

ES 2 583 203 T3

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

<210> 74
 <211> 1797
 <212> ADN
 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 74

atgcaaatag ataagataat tgatactgac atattagtgtg ttggaggctc tggagcaggg 60
 tcaatggcag ctgtaacagc tgctgaaaaa ggagcaaaag tactgcttgc attaaaagga 120
 aagcttgga aaagtggtaa tgctattatg gcaggagcag gattttctat ggatggagaa 180
 actgcatatt ataaatatgg actcaaggaa gcagatccta gaaatacgaa ggaaaaatta 240
 tttgaacaaa ttgtaaagca gtctttttat ctaagtgatc aaaatatggt tgagcagttt 300
 gttaatgatt gtggatgatg ctgctggaaa cttaaacagt ggattgaaaa agcaggacat 360
 aaggttgcac tctttggaga agaaggatat ataacatcag gtaaagctgt tgcagatgga 420

10

ES 2 583 203 T3

tgccgatatg gagtttctga ggcaggcagc attgatgta tacaagattt tatggttgca 480
 gatgttttga tggaagatgg aagagctgta ggtgcagttg gaatagatat atattcagga 540
 gagattattg aaattagatc aaagtcagtt attttagcta ctggcggata tcagccctat 600
 tcctttaaat gcactgtttc cgatatgact ggcgatggaa tggctatggc gtaccgtgca 660
 ggagtcaagc ttgcagatat ggaattttta ttatatatac cagcagttgc cttttcacca 720
 tcagtatata aaggttcaat ttatcctttc ttacattcca gtatgcttat gccattggt 780
 aaaaatggca aaggagaatc aatttttagac aatatacctg aaactttact taaaatggcc 840
 aaggaaagtg aaatgggaaa gcttatatct acgtattatt atggagatca aattgcaaaa 900
 ggaaaagcaa ctccaaatgg aggagtatat tttgattatt ccaatgtacc ttttgatatt 960
 tatgaaaaag ccttaaaaaa atctgagcca ttaatgaaca tgtggtatag aaaaggattc 1020
 tatcaaggaa acaacttgga tacttttggg gaaaatataa gaaagggcat tccatgggaa 1080
 gtaggtattg gctcagaata cagcatgggt ggcattgaag tagacgaaa tatgtacact 1140
 ggagtaccag gactttatgc agctggtag actacaagtg gtgtatttgg agctatgagg 1200
 gttgcagacg gacttattga aatgcttcta catggttata gacgagcatt gtccgcttgc 1260
 aaatatatac aaaatgtaaa tgagccaagt atgaaaaata ctaattattga tagtataatt 1320
 aaagatattt tttcacctct tgaaagaaaa gaagggataa gtcctataaa aatacacaga 1380
 aatatagaaa agacagctga tgctggattc aactttagaa gaaatgaaga gggacttaca 1440
 aaagctttag atgatatttt aaaaatacac aaatatgaca taagcgcaat gagtactaaa 1500
 agtaaaaata gagtttataa ctatgaatgg atagaatcag tacaggttcg aaatctttta 1560
 acttgcacag aagcaggtgt aagagctgcc cttatgagaa aagaaagtag gggtacacat 1620
 atacgtgatg attatgaatt tgtagataat gataactggc ttttaaggat tatgagttta 1680
 aaaagtgaag acggaactat gaaattatca accagaaagc ctaaagtaac aacaatggaa 1740
 ctcccaaagtg gtaaaaaata gaatattcct gattatatgc tttcaatggt aaagtaa 1797

<210> 75
 <211> 598
 5 <212> PRT
 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 75

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

Ser Gly Ala Gly Ser Met Ala Ala Val Thr Ala Ala Glu Lys Gly Ala
 20 25 30

Lys Val Leu Leu Ala Leu Lys Gly Lys Leu Gly Lys Ser Gly Asn Ala
 35 40 45

10 Ile Met Ala Gly Ala Gly Phe Ser Met Asp Gly Glu Thr Ala Tyr Tyr
 50 55 60

ES 2 583 203 T3

Lys Tyr Gly Leu Lys Glu Ala Asp Pro Arg Asn Thr Lys Glu Lys Leu
 65 70 75 80
 Phe Glu Gln Ile Val Lys Gln Ser Phe Tyr Leu Ser Asp Gln Asn Met
 85 90 95
 Val Glu Gln Phe Val Asn Asp Cys Gly Glu Cys Cys Trp Lys Leu Lys
 100 105 110
 Gln Trp Ile Glu Lys Ala Gly His Lys Val Ala Phe Phe Gly Glu Glu
 115 120 125
 Gly Tyr Ile Thr Ser Gly Lys Ala Val Ala Asp Gly Cys Arg Tyr Gly
 130 135 140
 Val Ser Glu Ala Gly Ser Ile Asp Val Ile Gln Asp Phe Met Val Ala
 145 150 155 160
 Asp Val Leu Met Glu Asp Gly Arg Ala Val Gly Ala Val Gly Ile Asp
 165 170 175
 Ile Tyr Ser Gly Glu Ile Ile Glu Ile Arg Ser Lys Ser Val Ile Leu
 180 185 190
 Ala Thr Gly Gly Tyr Gln Pro Tyr Ser Phe Lys Cys Thr Val Ser Asp
 195 200 205
 Met Thr Gly Asp Gly Met Ala Met Ala Tyr Arg Ala Gly Val Lys Leu
 210 215 220
 Ala Asp Met Glu Phe Leu Leu Tyr Ile Pro Ala Val Ala Leu Ser Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Tyr Lys Gly Ser Ile Tyr Pro Phe Leu His Ser Ser Met Leu
 245 250 255
 Met Pro Ile Val Lys Asn Gly Lys Gly Glu Ser Ile Leu Asp Asn Ile
 260 265 270
 Pro Glu Thr Leu Leu Lys Met Ala Lys Glu Ser Glu Met Gly Lys Leu
 275 280 285
 Ile Phe Thr Tyr Tyr Tyr Gly Asp Gln Ile Ala Lys Gly Lys Ala Thr
 290 295 300
 Pro Asn Gly Gly Val Tyr Phe Asp Tyr Ser Asn Val Pro Phe Asp Ile
 305 310 315 320
 Tyr Glu Lys Ala Leu Lys Lys Ser Glu Pro Leu Met Asn Met Trp Tyr
 325 330 335

ES 2 583 203 T3

Arg Lys Gly Phe Tyr Gln Gly Asn Asn Leu Asp Thr Phe Val Glu Asn
 340 345 350

Ile Arg Lys Gly Ile Pro Trp Glu Val Gly Ile Gly Ser Glu Tyr Ser
 355 360 365

Met Gly Gly Ile Glu Val Asp Glu Asn Met Tyr Thr Gly Val Pro Gly
 370 375 380

Leu Tyr Ala Ala Gly Glu Thr Thr Ser Gly Val Phe Gly Ala Met Arg
 385 390 395 400

Val Ala Asp Gly Leu Ile Glu Met Leu Val His Gly Tyr Arg Ala Ala
 405 410 415

Leu Ser Ala Cys Lys Tyr Ile Gln Asn Val Asn Glu Pro Ser Met Lys
 420 425 430

Asn Thr Asn Ile Asp Ser Ile Ile Lys Asp Ile Phe Ser Pro Leu Glu
 435 440 445

Arg Lys Glu Gly Ile Ser Pro Ile Lys Ile His Arg Asn Ile Glu Lys
 450 455 460

Thr Ala Asp Ala Gly Phe Asn Phe Arg Arg Asn Glu Glu Gly Leu Thr
 465 470 475 480

Lys Ala Leu Asp Asp Ile Leu Lys Ile His Lys Tyr Asp Ile Ser Ala
 485 490 495

Met Ser Thr Lys Ser Lys Asn Arg Val Tyr Asn Tyr Glu Trp Ile Glu
 500 505 510

Ser Val Gln Val Arg Asn Leu Leu Thr Cys Thr Glu Ala Gly Val Arg
 515 520 525

Ala Ala Leu Met Arg Lys Glu Ser Arg Gly Thr His Ile Arg Asp Asp
 530 535 540

Tyr Glu Phe Val Asp Asn Asp Asn Trp Leu Leu Arg Ile Met Ser Leu
 545 550 555 560

Lys Ser Glu Asp Gly Thr Met Lys Leu Ser Thr Arg Lys Pro Lys Val
 565 570 575

Thr Thr Met Glu Leu Pro Asn Gly Lys Asn Lys Asn Ile Pro Asp Tyr
 580 585 590

Met Leu Ser Met Leu Lys
 595

<210> 76

<211> 912

<212> ADN

<213> Clostridium ragsdalei

<400> 76

5

ES 2 583 203 T3

atgagagagt ttgaaacaga tgttgttgtt gttggaggag gagcatcagg gcttgctgca 60
gcagttactg ctgctgaaaa tggtgcaaaa gtaatggtgc ttgaaaaagc taatactaca 120
ggatgagtg ctaatatggc aatgggccct ctagggtgtg aaacaagaat gcaaagagaa 180
aggcttatag atatatctgt agatagagca ttaataagt tcatggaata ttctactgg 240
agatcagatg caagattgat aagaagatat ttagagcagt cagcaggaac tattgaatgg 300
ttagaaaata tgggagtaga attcgcatta ccttcaaat atttccagc ttcagaagca 360
acttggcata ttgttaacc taaaactgga aaaccaggac tccgtgcagc tgctactatg 420
attaaaatca tgacagaaag agcagaagaa ttaggcgcta aaatattatt agaaacacct 480
gtaaagagta ttattaaaga tcaaggagag ataattggcg taacagctag cgataaagat 540
ggatgaattag aagtatatgc tggagcagtt atcatcggtc caggcggatt tggtgataat 600
ccagatttta ttaagaagta tgttggactt gaatggggaa aagatttgtt ctcatataga 660
attcctggat taactggaga tggaatccag atggcttggg atgctggcgc ttcaaaagat 720
tttatgacta tggaaatggt attctttgct cctaacactg gtggatatgc tcctatagag 780
ttacccttcc gtcaacctaa ccttttagtt aacctggatg gtgaaagatt tataaatgaa 840
gaagttatag aaaatcctgt atttaccgca aatgctattg aaaaacaaaa aagaaagttg 900
catattctat aa 912

<210> 77

<211> 303

5 <212> PRT

<213> Clostridium ragsdalei

<400> 77

Met Arg Glu Phe Glu Thr Asp Val Val Val Val Gly Gly Gly Ala Ser
1 5 10 15

Gly Leu Ala Ala Ala Val Thr Ala Ala Glu Asn Gly Ala Lys Val Met
20 25 30

Val Leu Glu Lys Ala Asn Thr Thr Gly Gly Cys Ala Asn Met Ala Met
35 40 45

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

10 Ile Ser Val Asp Arg Ala Phe Asn Lys Phe Met Glu Tyr Ser His Trp
65 70 75 80

ES 2 583 203 T3

Arg Ser Asp Ala Arg Leu Ile Arg Arg Tyr Leu Glu Gln Ser Ala Gly
 85 90 95

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

Lys Tyr Phe Pro Ala Ser Glu Ala Thr Trp His Ile Val Lys Pro Lys
 115 120 125

Thr Gly Lys Pro Gly Leu Arg Ala Ala Ala Thr Met Ile Lys Ile Met
 130 135 140

Thr Glu Arg Ala Glu Glu Leu Gly Val Lys Ile Leu Leu Glu Thr Pro
 145 150 155 160

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

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

Gly Thr Gly Gly Phe Gly Asp Asn Pro Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Val
 195 200 205

Gly Leu Glu Trp Gly Lys Asp Leu Phe Ser Tyr Arg Ile Pro Gly Leu
 210 215 220

Thr Gly Asp Gly Ile Gln Met Ala Trp Asp Ala Gly Ala Ser Lys Asp
 225 230 235 240

Phe Met Thr Met Glu Met Val Phe Phe Ala Pro Asn Thr Gly Gly Tyr
 245 250 255

Ala Pro Ile Glu Leu Pro Phe Arg Gln Pro Asn Leu Leu Val Asn Leu
 260 265 270

Asp Gly Glu Arg Phe Ile Asn Glu Glu Val Ile Glu Asn Pro Val Phe
 275 280 285

Thr Ala Asn Ala Ile Glu Lys Gln Lys Arg Lys Leu His Ile Leu
 290 295 300

<210> 78

<211> 962

5 <212> ADN

<213> Clostridium ljungdahlii

<400> 78

tttcttcaca ggaaaatata cttcagtaac aagatcttta ggaatggtga cttggtggg	60
gtcagtaca tatacttcat atgggtgggt tgtaagtta tatccttcat tttctacca	120
ttcctcaac ttagcatata cagatgttaa ttctgaatat gagcccccta aaacagactt	180

10

ES 2 583 203 T3

cgcacaaagg actccaggca agtatcttgt tccctitaca atctccttta tcggaatggc 240
 aagttctgta tcattgccag aaggattgta ttcagcgtg tgataaatag ttattggcct 300
 accaagaaag tcaattacaa aaatataat aaagaaagca aagctacata tattaagca 360
 ttttaaggtaa aactaaaaat attataaaaa tgaattatt ttttctcata gctaaagtta 420
 cataatacga ggaggattta taatgaaaa agtaatagga attataagta ttgtactatt 480
 tgtactcgta gcacttcaat cctgtgctgc aggagtagga aatgcattaa gtaataacaa 540
 agaagctagt ggatctgctg gattatcttt atctgtatgt atgcttattg ctggaataat 600
 agcaataata tcaaaatata gtaaaggat gactataaca gctatagtat tttatttggt 660
 agcttttggt gtagggattg ctaatgttgg gcatttttca gatttgcaa tttggcaat 720
 cattaacttg atatttgctg gactattgat atttcattg cttaaaaata agcaattata 780
 taatagcagt gggaaaaagt agaatcatat attgtaatta ttttaatta tggtagcaaa 840
 attgaaattg tcaactgaac acctctaaat gttttaata catatgttta attattgtga 900
 cagattctaa tagtagaaag tagaaattg ctatgttata atgacataga ggtgaatgta 960
 at 962

<210> 79
 <211> 977
 <212> ADN
 <213> Clostridium ljungdahlii

5

<400> 79

actagacagt gctaataaca atgtctagt cttttatct tgcctcaattt tttcattgag 60
 ttcatttaag taagtccacc tgtccatctt ttcgtctagc tctttttcca gtgaattctt 120
 ttcggataag agatcttcaa gaagtgcata atcagatgaa gcagcttcca tttctatttt 180
 cttttcagat atagattttt ctagatgttc aattacctca tctattttgt caaactccat 240
 ttgttctgca taggtaaatt ttagaggctt ttctttttgc aacttatagt tgtttttagc 300
 tgtatttttc ttagagctta ttttttctc tgatattttt gcagttttgt gaaaatagga 360
 atagtttctt gtatattgag tgattttacc gtttccttca aaagaaaata ttttatcaac 420
 tgttttgca aggaagtacc tgtcatgaga tacagctata acagctcctt caaaatcggt 480
 aatataatct tctaggattg taagtgttc tatatccaga tcatttggtg gttcgtccag 540
 caaaagtaca ttaggtaat tcatcaatat ttttagaaga tataatcttc ttcgttctcc 600
 tcctgaaagt tttccaaggg gagtccattg aactgaagg tcaataaaa aattttcaag 660
 tacagcagaa gcacttattt tttcaccga tgaagttgac gcatattctg atgtcccacg 720
 tatgtattca attacccttt cgttcatatc catatcagaa attccctgag aatagtatcc 780
 tatctttact gtttcaccta tatctatagt gccgtgtcc ggcagaattt tttgactaa 840
 aatattcata agagtggatt taccacttcc attaggcca ataataccta ttctgtcatt 900
 attagtatg ttataagtga aatttttaat taatgtcttt tcacaaaac ttttgcttat 960
 gttatccagg tttatga 977

10

<210> 80
 <211> 962
 <212> ADN
 <213> Clostridium ragsdalei

15

<400> 80

ES 2 583 203 T3

tttcttcaca ggaaaatata cttcagtaac aagatcttta ggaatggtga cttggtgggg 60
 gtcagttaca tatacttcat atggtggggt tgtaagttta tacccttcat tttctacca 120
 ttccctcaac ttagcatata cagatgttaa ttctgaatat gagccctta aaacagactt 180
 cgcacaaagg actccaggca agtatcttgt tccctttaca atctcctta tcggaatggc 240
 aagttctgta tcattgccag aaggattgta ttcagcgctg tgataaatag ttattggctt 300
 accaagaaag tcaattacaa aaatataat aaagaaagca aagctacata tattaagca 360
 ttaaggtaa aactaaaaat attataaaaa tgaattatt ttttctcata gctaaagta 420
 cataatacga ggaggattta taatgaaaa agtaatagga attataagta ttgtactatt 480
 tgtactcgtg gcacttcaat cctgtgctgc aggagtagga aatgcattaa gtaataacaa 540
 agaagctagt ggatctgctg gattatcttt atctgtatgt atgcttattg ctggaataat 600
 agcaataata tcaaaatata gtaaaggat gactataaca gctatagtat tttattgtt 660
 agcttttgtt gtagggattg ctaatgttgg gcatttttca gatttgcaaa tttggcaat 720
 cattaacttg atatttgctg gactattgat atttcattg cttaaaaata agcaattata 780
 taatagcagt gggaaaaagt agaatcatat attgtaatta ttttaatta ttttgcaaa 840
 attgaaattg tcaactgaaac acctctaaat gtttaataa catatgttta attattgtga 900
 cagattctaa tagtagaaag tagaaatttg ctatgttata atgacataga ggtgaatgta 960
 at 962

<210> 81
 <211> 975
 <212> ADN
 <213> Clostridium ragsdalei

5

<400> 81

ctagacagt ttaataacaa tgtctagtgt ttttctcttg ttcaattttt tcattgagtt 60
 catttaggta agtccacctg tccatctttt cttctaattc tttttccagt gaattctttt 120
 cagataagag atcttcaaga agtgcataat cagatgaagc agcttccatt tctattttct 180
 tttcagatat agatttttct agattttcaa ttacctatc tattttgtca aactccattt 240
 gttctgcata ggtaaatttt aaaggctttt ctttttgcaa cctataattg ttttagctg 300
 tattgttctt agtgggtatt ttttcttctg gtatttttgc agtttcgtga aaatgggagt 360
 agtttctctg atattgagcg attttaccat ttccttcaaa agaaaatatt ttatcaactg 420
 ttttgcaag gaagtatctg tcatgggata cagctataac agttccttca aaatcattaa 480
 tataatctc taggattgta agtgtttcta tatccagatc atttgttggt tcgtccagta 540
 aaagtacatt aggataattc atcagtattt ttagaaggta taatcttctt cgttccctc 600

10

ctgaaagttt tccaagggga gtccattgaa ctgaaggttc aaatagaaaa ttttcaagta 660
 cagcagaagc acttattttt tcaccgatg aagttgaggc atattctgat gtcccacgta 720
 tgtattcaat taccctttcg ttcatatcca tatcagaaat tccctgagaa tagtatccta 780
 ttttactgt ttcacctata tctatagtac cgctgtccgg cagaattttt tgagttaaaa 840
 tattcataag agtggattta ccacttccat taggtccaat aatacctatt ctatcattat 900
 ttagtacgtt ataagtgaat ttttaatta atgttttttc accaaaactt ttgcttatgt 960
 tatccagggt tatga 975

<210> 82
 <211> 353
 <212> ADN

15

ES 2 583 203 T3

<213> Clostridium autoethanogenum
 <400> 82
 aaaaaagctt ataattatcc ttagttaacg atcaggtgcg cccagatagg gtgtaagtc 60
 aagtagttta aggtactact ctgtaagata acacagaaaa cagccaacct aaccgaaaag 120
 cgaaagctga tacgggaaca gagcacggtt ggaaagcgat gagttaccta aagacaatcg 180
 ggtacgactg agtcgcaatg ttaatcagat ataaggtata agttgtgttt actgaacgca 240
 agtttctaata ttcgatttta actcgataga ggaaagtgtc tgaaacctct agtacaaga 300
 5 aagtaagtt aggctgatcg acttatctgt taccaccaca tttgtacaat ctg 353
 <210> 83
 <211> 353
 <212> ADN
 10 <213> Clostridium autoethanogenum
 <400> 83
 aaaaaagctt ataattatcc ttagcactcg ttgaggtgcg cccagatagg gtgtaagtc 60
 aagtagttta aggtactact ctgtaagata acacagaaaa cagccaacct aaccgaaaag 120
 cgaaagctga tacgggaaca gagcacggtt ggaaagcgat gagttaccta aagacaatcg 180
 ggtacgactg agtcgcaatg ttaatcagat ataaggtata agttgtgttt actgaacgca 240
 agtttctaata ttcgattagt gtcgataga ggaaagtgtc tgaaacctct agtacaaga 300
 aagtaagtt aggctcaacg acttatctgt taccaccaca tttgtacaat ctg 353
 15
 <210> 84
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 84
 25
 ctgcacctaa aaccagca gtatt 25
 <210> 85
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 35
 <400> 85
 atccttaag caagagtact gcacc 25
 40 <210> 86
 <211> 520
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum
 45 <400> 86

ES 2 583 203 T3

ccggatwgka ysctrwmgw gmarrcytwa saymtksmk ycsssrcsag gkagccgtaa 60
gcttggatcc cgggawtmgk rgrwggkwsy ckgtksktgs mtccygggra gaggggatw 120
scctcccgaag aggaratta mtacsgcata ataatcagtt ttcwcatgga gactgattta 180
aaggagtaat ccscctttgag atggaccgcg ggcgcattag ctagttggta gggtaacggc 240
ctaccaaggc gacratgctg agcckacctg agaggggtgat cggccmctt ggaactgaga 300
gacgggtccmg actyctacgg gaggcakcag kggggaatwt tgcacaatgg gcgaaagcct 360
gatgcarcaa cscgcgtga gtgaagaagg ttttcggatt gtaaagctwt gtctttgggg 420
acgataatga cggtwcckwa ggaggaagcc mcsgstaact acgtgyywg mkckckcgga 480
atacgytygt gmgagygtt gtyygaatm wckwgkykta 520

<210> 87

<211> 639

5 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 87

ggrrraystr amyscwgyr wrmmymssm tmssskmrw ckragmcrgr wtcaarctct 60
gttgctgacr aattcgamwr awccrggatc aaactctggt gtcgamsaat kcsgrkwaac 120
swaktyacmr cymcrttkts attcrmkatt actagcaact ccaacttcwt gtaggcgagt 180
ttcagcctgc aatccgaact gggggcagtt tttgaggttt gctccacctt gcggtcttgc 240
ttctctctgt actgcccatt gtarcacgtg kgttgcctg racataaggg gcatgatgat 300
ttwacstcwt cccaccttc ytccgcgta accmcggcag tcttgctara rtgctcaact 360
aatgttakc aactaacamc aggggttgck ctckttgcag gacttaacct aacwtctcac 420
gacacgagct gacracaacc atgcaccacc tgtatycctg cccgaaggg yttctcttat 480
ctctaarata ttmaggtat gtcmwgtcca ggwawggttc ttcgcgttgc ttcgaattaa 540
accacatgct ccgctgcttg tgcgggcccc cgtaattcc tttgagtttt aatmttgcca 600
tcgtacttcc caggcggagt acttattgtg tttactgctg 639

10

<210> 88

<211> 1028

<212> ADN

15 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 88

ES 2 583 203 T3

ccgatwgwaa ysctsgmrgc asrsytwasa ymtksarkyc sysrcaaggk agccgtaagc 60
 ttggatcccg ggaaccgsrg aagkascacs krgsktgsmt mcccgggraga ggggatagc 120
 cwcccsaaag ggagawtmy rsrcataat awtcagtttt cacwtggaga ctgwtttaaa 180
 ggaktaatcc gctttgagat ggaccgcg cgcattagct agttgtagg gtaacggcct 240
 accaaggcga cgatgcgtag ccgacctgag agggtagtcg gccacattgg aactgagaga 300
 cgyyccarac tcctacggga ggcakcagtg gggaaatattg cacaatgggc gaaagcctga 360
 tgcagcaacg ccgctgagt gaagaaggtt ttcggattgt aaagctctgt ctttggggac 420
 gataatgacg gtacccaagg aggaagccac ggstaactac gkgccascag ccgcgtaat 480
 acgtaggtgg cgagcgttgt ccggaattac tggkcgtaaa gaggcgtag gcggatattt 540
 aagtgasatg tgaataccc gggcttaacy cgggactgc wtttyaaact ggatatctar 600
 agtgcgggag aggakaatgg aattcctwkt gtagcggtrg aaatgcgtak agattaggaa 660
 gaacaccagt ggcaargcg attctctgga ccrtactga crctgaggya cgaaagcrtg 720
 ggtagcaakm aggattagat accctggkta gwccacrccg taaacratga ktactakktg 780
 twggaggtwt cacccttyt ktgcrsmkt aacacaata aktactccsc cckggraagt 840
 ackatygcaa gawttaaacc tcaaaggrwt tgayggggg cccgcyaag yagcggagc 900
 atgtggkttw wtycaakca mtsckaykaa ccttwcctkg rayttkrwmt wmccmgcaww 960
 cytwataawt aaagaakccc ttsygkgymr gggwawmmgg gkkgtgyat gkktktygt 1020
 ywatmycg 1028

<210> 89

<211> 716

5 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 89

gggtaygtsa ayswgyyatr mrysyskmtm rwsckmrwck ragmcrgrat caarctctgt 60
 tgtckacraa ttcggmkrak crrggatcaa actctgttgk cgacsaattc sgrkgaaccy 120
 rkwymcmrck mcrtttsat ycrckaytac tagcaactcc aacttcatgt aggcgagttt 180
 cagcctgcaa tccgaactgg gggcagtttt tgaggttgc tccmccttgc ggtcttgctt 240
 ctctctgtac tgccattgt ascacgtgtg ttgccctgga cataaggggc atgatgattt 300
 gacgtcatcc ccaccttctt ccgcttaac cgcggcagtc ttgctagagt gctcaactaa 360
 atgttagcaa ctaacaacag gggttgcgct cgttgcagga cttaacctaa catctcacga 420
 cagcagctga cgacaacat gcaccactg tatccctgyc ccraaggyt tctcttatct 480
 ctaagatawt cagggtatkt yaagtcagg waagttctt cscrttgytt csaattaaac 540
 cacatgctcc gctgcttggt cgggccccg tcaattcctt tgagttttaa tcttgcgatc 600
 gtacttccya ggcggagtac twattgtgt tactgyggca sasaarrggt cgatacctcc 660
 10 tacacctagt actcatcggt tackgmtgy actaccaggr watstaatwc tgtttg 716

<210> 90

<211> 556

<212> ADN

15 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 90

ES 2 583 203 T3

ccgatwkaw awscctsmgg cwrrcytwas aymtksmky csyrrcaagg kagccgtaag 60
 cttgatccc gggawscgkr gswggkagcc skwksktgsm tccysggrrg agggggrwvs 120
 ccwcccgrrr gggagaytmm yrssgsataa taatcakttt tcwcatggar actgatttaa 180
 aggagtaatc csctttgaga tggaccscg gcgcattakc tagkkgtag ggtaacggyc 240
 taccaaggcg acrktgcgta gccgacctga ragggtgatc ggscacattg kaactgagag 300
 amggtccara ctctacggg aygyagcart ggggaatatt gmacaatggg cgaaagccmg 360
 atgcagcaac gccscgtgag tgaagaaggt tttcggattg twaarytctg tctttgggga 420
 mgataatgac kgtaccaag gasyaagccw cggstaacta cgtgccagya kyckcggtaa 480
 tamktaggtg gcgagcgttg tccggaatta cyggmgtaa agartgcgta rgcggatatt 540
 tarkgakatg tgaat 556

5 <210> 91
 <211> 478
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 91

gggwayytsa mkcwgyrwr maykyrgwta rcskkmrwck ragmcrgrat caarctctgt 60
 tgtckacraa ttcgakwrar ccrgatcaa actctgttgt csacmaattc sgmkraawcm 120
 rgwyymmact myrttstsaw ycamtwytac tagcaactcc aacttcwtgt akgcgagttt 180
 cagcctgcaa tccraactgg gggcagtttt tgaggtttgc tccmccttgc ggtcttgctt 240
 ctcyctgtac tgcccattgt agcmcgtgtg ttgcwctggw mataaggggc atgatgattt 300
 gacgtcatcc ccaccttctt ccgcgkaac cgcggsagtc ttgcyagagw gytcaaytaa 360
 atgttrscra cwaacaacag gggttgcgct cgttgcagga cmtaamctaa yatctcayga 420
 camgagctga cgamaayyat gcaccaccty tatccctgwc yckaagggct tctyttat 478

10

<210> 92
 <211> 561
 <212> ADN
 15 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 92

ccgawwrgka aygstmwsmr wgcwrrsktw asaymsksam kyckrrcaa ggkagccgta 60
 agcttgatc ccgggawycg krgraggkas yckkksktr sawmyykggr ararggggat 120
 wscwcccgr awggmarawt amtasrcat aataatcagt tttcmcatgg agactgattt 180
 awaggagtaa tccgctttga gatggaccg cggcgcwttta gcwagtggg agggtaacgg 240
 cctaccaagg cgacgatgcg takccsacct gasagggatga tcggccacat tggaactgar 300
 20 agacggtcca ractcctacg ggaggyakca gtggggaata ttgcacaatg ggcgaaagcc 360
 tgatgcakca acgccgctg agtgaagaag gttttcsgat tgyaaagctc tgtctttggg 420
 gacgataatg acggwaccca aggaggaarc cacggctrac tacgtgccws csgycgyggt 480
 aatacrtagg tggkkagcgt tgtccggaat tyctyggckt aatgagtgcg wargcgatm 540
 yttaagtgas atstgaaama c 561

20

<210> 93
 <211> 362
 25 <212> ADN

ES 2 583 203 T3

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 93

```

agggwaaysk maakgawgat matrmatgas katarcskka awckragmcr ggatcaarct      60
ctgttgtcga craattcgmk wrakccagga tcaaactctg ttgtcgacma attcsgmwra      120
accwaktcmm crckmcrttc tgatyrkmkw ctactagcaa ctccaacttc atgtaggcga      180
gtttcakcct gsaatccgaa ytgggggyag tttttgaggt tyuctccayc ttgcggtcct      240
gcttctytct gtactgccca ttgtakcacg tgtgttgccc tggacataag gggcatgatg      300
at ttgacgtc atccccawct tyctccgmgt waaccgcggc agtyttycta rartgctyaa      360
yt                                                                              362

```

5

<210> 94

<211> 1160

<212> ADN

10 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 94

```

agtggcactg gaaaagaact cttagctcaa tctattcaca attatagtga aagatgtgaa      60
ggcccttttg tagctataaa ttgtagttct atacctagag aacttgtaga aagtgagcct      120
tttggttatg aaaaaggagc ttttacggga gctttaaagc aaggaaagcc tggaaagttt      180
gaattagcag atggaggaac ttttttttg gatgaagtag gagagcttcc tcttgatata      240
cagtcaaagc ttttaagggg tcttgataat aataaaatta caagagttgg aggaacttat      300
gaaaacagc taaatgtaag gataatagga gctacaaca gggtgctcaa ggatgaaatt      360
aaaaagaaa atttcagaag tgacctttat tatagattga gtgtgatgaa tataaaaact      420
gtcccactta gggaaagaaa agaagatata gagcttttaa ttaaataatt tatggaagaa      480
ttgaattcta aaagtttggt taagaagaaa gtagtggaaa aagcatacat agaaaagatt      540
aaagcttatg attggcctgg aaatgttaga gaacttagaa atgtaataga gagggattac      600
tatttaagtg aggataagat ggcccccttg gattatttag aaaagaagt ttatgaaaaa      660
aatgtctcct ctgatccagt aaatattagt gtgcttccaa tggatgtttt agaaaagaa      720
aacattgaaa atgcacttaa aaagtgtaag ggaaatata taaaagctgc aaaatcttta      780
aatatcagta gatctaccat gtatagaaaa atgaaaagat atggaataaa aagtgtgtca      840
aatgaccag aaaagagtaa gattctcaaa ataggacact aagtatgtgt cataatggca      900
catagtgatt taaatgtct ttttaacagg tttcttgitt ttggtatggc ttttgcttat      960
aaaatagat gaatatatta acaggtatat gtaaatttta atattgcat actattataa     1020
aaaaggagag ataattatga aagctgtatt gtggtatgat aaaaaagatg taagagtaga     1080
ggaaattgag gaacctaagg taaaagaaaa tgctgtaaaa attaaagtga aatggtgtgg     1140
tatatgtggt tctgacttgc                                                         1160

```

15

<210> 95

<211> 834

<212> ADN

20 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 95

ES 2 583 203 T3

tattgaggag gccaaaaatg agctttaaga aaaatgtata cgatacaatg agggaactaa 60
 tatctgtgcc aagcatatct ggtacaaaag aagagtgtgc ggcagcagaa aaaatatatg 120
 aaaaaatfff ggaaatacct tattttaagg acaatcctga aaatctagga atagagcaaa 180
 ttgaagatga tccttttagga agaagctttg tatgggcagt agtaaatgga aatgaaaatt 240
 caccaaatfc gtttatactt tcaggtcatt tggatgtagt tggagtagaa gaatttggac 300
 atttaaaatc tatggctfff gatgtagatg aatgtactaa aagaatctca gaattgaatt 360
 tagatgaaga tgctatggag gattttaaat caggagattg gatatttggga aggggaactg 420
 cagacatgaa gtttggagtg gccctcaata tggaaactfff aagagaattc agtaaagaga 480
 gaaactffaa gggaaactta ttactfftag tagttcctgg tgaagagagt aattccgaag 540
 gaatgattgc tgcagctcca tttcttctta aattaaagga agagaggaag tacaattact 600
 gtggtatgat aatatcagag ccaagtatac ctgaaagagg agaaaaagaa ggcaagagat 660
 tatatatagg tagtgtaggt aaaattatgc ctttattfff ttgtgtggga aaagaaactc 720
 atgtagggga atctttaaga ggattgaatc caaatttgc agtttcagag ataaacaaat 780
 taatggaatg taatccagat ctctcagata gcgfftatga tactgtgact ccac 834

<210> 96
 <211> 39
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

10 <400> 96

attcatcctg caggagtggc actggaaaag aactcttag 39

15 <210> 97
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 97

25 gactgcggcc gcgcaagtca gaaccacata taccaca 37

<210> 98
 <211> 35
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

35 <400> 98

atatgctagc tattgaggag gccaaaaatg agctt 35

<210> 99
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> Cebador sintético

ES 2 583 203 T3

<400> 99
gactggcgcg ccgtggagtc acagtatcat aaacgct 37

5 <210> 100
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador sintético

<400> 100

15 aatggcaggg cagataattg taatg 25

<210> 101
<211> 25
<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético

25 <400> 101

aaggcattct gagccagttc tttta 25

<210> 102
<211> 1062
<212> ADN
<213> Clostridium autoethanogenum

35 <400> 102

acagttaaaa agcatatccta acagtccttc cactgtacta attcaaggcg aaagcggtac 60
aggtaaagaa cttattgcmc agtccatcca caatgacagc agcagaaaa ataacagctt 120
tatagcaata aattgcmgtg ccatacccaa aaatttaata gaaagtgaat tattcggata 180
tgaagatgga tcattcacag gtgcaaaaca tggaggmcmgt gcaggaaaa ttgaacttgc 240
aaatggmgtg actttatmtt tagatgaaat tggggaaatg cmtttagata tgcaagtaaa 300
tcttttaaga gttctccaag aaaactgtat tacaagaata ggcgggaaca gatgtgtaaa 360

aatagatata agaatcattg cagctactaa taaaaatmtg agggaagaaa tacataaagg 420
aactmtttcmg gaagatmtt actatagact aaatgtaata cctatatatg taccaccact 480
gcgggaaaga gatatggata ttaaaatact gataaactat tmttttaaga taaaagcttt 540
taaacttaaa aaacctatmt caatagtaag acctgatata tatcaaaagc tcttaaatma 600
taattggccc ggaaatgtaa gagaattgga aaattgtatt gaaaatatcmg taaatatgaa 660
tggaaatama tctmtcaact tcmgaaaatag tmtttcagta aatagcaaaa ctagtcmctg 720
tactacaaaa tmtaaatatg atatgtatmt attaaaagag tgggaaaaag aagcaataac 780
aaattgtatg agtaattgca atggtaacat tgcaaaagct tctaaaatmt tgggaataaa 840
tagaagtact mtgtatacaa aaataaaaa atatcaaat aatmtttctt aaagtgtatg 900
taaacacaaac tmtgttmtgaa aaagcaacat tmtttctta aaaaatgmtg cmttttacag 960
cmttttcaa mtatatatat taacctata aagtcmctacc cmctaaatmt caacctmttc 1020
atgataaaaa acatactggc acaacattg cmtatatatmt ta 1062

40 <210> 103

ES 2 583 203 T3

<211> 823
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum

5 <400> 103

cgtatTTTTA attgcgaact taagatttaa ttaatatcta ctatgagtaa gtcaacatat	60
atacctaaat tatgataaaa ttatatatta taatttcaaa ataaacataa ctataataat	120
acactaagat aaagctatTT atctgatggc tacctactgt aacctccct cttctatcaa	180
agtgagagat aacagtagct acgcccctag ataattcatc taaacttagt gggagaaaca	240
aaactctaaa gagaaagcga ttcactttaa atcaaagatt tgagatatct gcttctccca	300
ctaagtaaga ttcattgata taaaaaggaa ggtaacttaa taatgtttaa accatttact	360
catagtgaag tagtcagtag gtctcttaat agatgcatta aataccatat agaaaaaggt	420
ataccaaaac ctaaacgaac acttagtcgc aaagaattgg acaacttaat aaaagaaaac	480
aacgatatta taaaaatagc aaaaccattt atggaaatac tttatgattt ttttaagtga	540
tcaggtttct cattatatct cacagacaaa aatgggaattg tattaactat cataggtgac	600
aaagatattg taatggagca ggcaaaggct ggaatagcag aaggatttga tctgagtga	660
caaagtgcag gtacaaatgc agcaggaact gctatTTTTg aaaatttgc agttcaactt	720
tcaggcaaag aacattttat aaatactttt cagatttata cctgctctgc atctgtcata	780
cataacgaac aaggaaatat aatcggatgt ctaactttaa ctg	823

10 <210> 104
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 104

20 attcatcctg caggacagtt aaaaagcata tctaacagt 39

<210> 105
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 105

30 gactgcgcc gctaaatata taagcaaatg ttgtgcc 37

<210> 106
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 106

atatgctagc gtatTTTTaa ttgcgaactt aaga 34

45 <210> 107

ES 2 583 203 T3

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 107

10 gactggcgcg ccagttaaag ttagacatcc gattat 36

<210> 108
 <211> 25
 <212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

20 <400> 108

ttggaatttt agctgtagat aacaa 25

25 <210> 109
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 109

35 taagtgattt tcaatggact ttact 25

<210> 110
 <211> 344
 <212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Casete director de intrón

45 <400> 110

aagcttataa ttatccttag atatcaatct tgtgcccga gataggggtg taagtcaagt 60
 agtttaagggt actactctgt aagataacac agaaaacagc caacctaacc gaaaagcgaa 120
 agctgatacg ggaacagagc acggttggaa agcgatgagt tacctaaaga caatcgggta 180
 cgactgagtc gcaatgtaa tcagatataa ggtataagtt gtgtttactg aacgcaagtt 240
 tctaatttcg attatatctc gatagaggaa agtgtctgaa acctctagta caaagaaagg 300
 taagttagca agattgactt atctgttatc accacatttg taca 344

<210> 111

50 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Cebador sintético

<400> 111

ES 2 583 203 T3

tgattttagg ccatgaagct gtagg 25

<210> 112

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

10

<400> 112

catgatttgt tcaactatat cacc 24

15 <210> 113

<211> 1005

<212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

20 <400> 113

catatgcact tttaggtaaa taagcatgct tcctgcttc cacagataaa tctggagata	60
atccaagcat aaccaagtct ttttttgac tttgtgaatt tttcaaaata ccgtaaaaaa	120
ctgaattaaa ttttgtatct acaccacaag agctatcaat tttacaatat actcctttta	180
cataaaaaat taacgtaga gtagtaataa caagaaatat attagtttta ttaaaaattt	240
gttttctatc aattttcact atccttagca taataagaac tacaagtggc aattcaacaa	300
aacattgggc ttttagctcca agaacaataa tggacgagat aaatataaat aaaaattttt	360
tataagacct atcttctcta tgttttaaaa agtaaataat acttgaaata aacaaaagaa	420
aacctacaat catcattggt tctccataaa ggctgttaaa ccatacaata tagtttccat	480
ctactaatat tattatagat aatatactaa aaaaaactgc tgcagctata tttttaaant	540
gaatacagct aaagcatata tataatcctg tcatatacaa aattaagtaa ataaaagcta	600
aaattctagt gtcaaaataa ttataaccaa ttaccitaca taataatttt ccaaatgtaa	660
taggataaat catgcttgta gttggaataa ttctaaaag ccttgaaaaa ctggttggaa	720
gcattttata ttcagttaca acatacttaa accagtgagc tgaatctttc cctttggcat	780
ctgttaaacc agtagctttc attactcttt caaaatctcc ttgatctgct atacctggca	840
taggaggata aaaaagtata aataaagctg ctatgaaagc tcctaggata ctaataattg	900
gtatataatct acataaactt gaattttccc taagagacca cctattttct ttcataat	960
agtaataact ctcccctttc ctgggactta tccaaaaata taaca	1005

25 <210> 114

<211> 959

<212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

30 <400> 114

ES 2 583 203 T3

attacaagtg agcataactta tgtttcatat ttttctaaat ataaccttga taccaatgta 60
 atctttatta gaaaatacgg cactggagag ccaagtgata caatggtaga agcaatttgt 120
 aaggatataa aagatattac ttataaaaga gtaattgcta ttggcggcgg aagtgtcctt 180
 gacgtttcaa aattgtttgc attaaagaaa gtctcgccag tacttgattt atttgatcac 240
 aaattagaat ttgtaaaaga taaggaattg atcctaattc caacaacttg cggaacaggc 300
 agtgaagtaa ctaatatctt tattcttgaa ttgaagtcaa gacatacaaa attaggtctt 360
 gctatagatg aactatatgc agatcttgct gttatgattc cagaacttct agagaattta 420
 ccctttaaat tttttgcaac tagttccatt gatgccttga ttcattccat tgaatccagt 480
 gtttcaccaa aagctacaag ctatacagaa atgttttctc ataaagcaat ggaaatgatc 540
 ttaaaggat atcaggagat ttcaaaaaat ggcccagacg ccaggttttc cttgttagat 600
 aaatctttac ttgcaagcaa ttatgctgga attgcatttg gcaatgcagg gtgtggtgca 660
 gtacatgcta tgagtattcc tttaggtgct aattaccatg ttcctcatgg agaagcaaat 720
 tatcaaatgt tcattggagt attttaaacc tattatcgtt taaaaccaca aggtaaaatt 780
 acaaaaactaa ataaattctt agcatccatt ttaaactgca aagaaaatga agtttacatt 840
 aaaatagaag agttattaaa tgtattgatt ctaaaaaac aattacgtga gtatgggta 900
 aaagaaaaag aattaaagga atttacacaa agtgttatga ctaaacaagg tcgtttaat 959

5 <210> 115
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 115

atcatcctg caggcatatg cacttttagg taaataagc 39

15 <210> 116
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 116

25 gactgcgcc gctgttatat ttttgataa gtcccag 37

30 <210> 117
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 117

atagctagc attacaagtg agcataactta tgttt 35

40 <210> 118
 <211> 37

ES 2 583 203 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador sintético

 <400> 118

 gactggcgcg ccattaaacg acctgttta gtcataa 37
 10
 <210> 119
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 119
 20
 agaatttgc aagtttata ttgct 25

 <210> 120
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 30
 <400> 120

 aagtcaagct ctaacttga aatat 25
 35
 <210> 121
 <211> 1041
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum
 40 <400> 121

 tacatacaca cactaaattt ttcgataaaa taaatttaaa aacaataaa cttaaatag 60
 agtataaaaa aaacagacat acacccaat ggggcgaagg tctgtcgctg taccaccaa 120

ES 2 583 203 T3

attattactc gtatatataa cggctgtgcc ggcataaactt actttatata aagttcagtc 180
 tgcaacttag gagtgatfff caacaactgt agcttatggg ttcccaccaa atccccattc 240
 tctgaaagca tatttttggt tactcttctc cgtcatcgtt tttttatttg cactaactat 300
 actataaaaa aatatgtatg tcaacaattt tttgaaata tataattaac tctataaaga 360
 aatcctaat aaaaaatcaa ggtacaattc aaatattttt acaatcttca gctcgggtaa 420
 atattttgat aagcctaagc aataaattct aaaaagctaa aagtttaaat tgagtatttg 480
 cttttataaa attatgaaaa atatttttta cggtaatata atgtaagaaa aacataatgc 540
 aataaaaaaa taaaaaaatt ttaaaaaaac tattgacatt attctcataa ggtattatta 600
 tcgtcacata cactaaatat tgataaagta aatttcaaaa acaataaat ttttcaaagt 660
 gatttaaaac caattagggt tatttttagtt ttaataaaat aaatgatatt tattagtcac 720
 atccatgggg gttatttcta attgatattt tgaattggta caattgtaga gtacaaagac 780
 aatgataggg aagagtaaat aggaagtatt ttttagagag tgagattttg gtgaaaactc 840
 ataaatatga ctattgaagg tagccttggg gtcgtgagct gaaactaagt aggctttacc 900
 ggtaaaaccg ttattacttt gagtaaaaaa ttgggtggta ccgcgcgacc aaacttctcg 960
 cccaagcag agaatgttgg ttgtttttt atacaaaaa ttagtggtaa ttgctcaaat 1020
 gctggttctt aaaattgaaa t 1041

<210> 122

<211> 1016

5 <212> ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 122

agattcattg attaaattgg ggtaatat ttaacagtata tcaataagaa aatacttatg 60
 aataacgctt atgaataagg gggcttatca ttttagcggat gacttaaatt tacaggagaa 120
 gtaggggagg tacttttccc cactaattcc tgtaatgtaa atatctatct ttttaggggc 180
 aaaataatta taggtagata ttacttgtaa ataaaaaagg gcttataaat ataaattttt 240
 ttataaaatg tgcgaaaatt attacgaaat tatatatagg tattataaaa actatgatgg 300
 agaagagtaa atagtgaggt attttttagag aattgggata aggtgaaaac ccatgaatac 360
 gaaacttttg aaaatcactc ctaagttaca agctgaaatt agtaagctgt gtcggtatta 420
 ccgttattag aattagaaaa aagttgggtg gtaccgcaa gcttcttgcc ctaggcaggc 480
 ggttattttt ttacaaaaa tttccagatt taaggaggat actaaaaatg aaaagtgatt 540
 cagtaaaaaa ggggattaag gcagctccag caagagcact tatgtatgga atgggatata 600
 caaaagagga aattgaaga cctcttatag gaatagtaa ttcaaaaaac gaaatagttg 660
 caggtcacat gcatttagat gaaatagcaa aagctgcaa acttgagta gcaatgtctg 720
 ggggtactcc tatagagttt cctgctattg cagtttgca tgggaattgca atgggtcatg 780
 ttggaatgaa gtattctctt gcttcaagag aactaatagc agattcaatt gaagctatgg 840
 10 caacagctca tggttttgac ggattggtac tcatacctaa ctgtgacaaa attgtacctg 900
 gaatgcttat ggcagctgca agacttaata taccagctgt ttagtaagt ggaggaccta 960
 tgagggcagg taagctaaat aacaaagcac ttgattttag cacttgtatt gaaaag 1016

<210> 123

15 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético
 5 <400> 123
 attcatcctg caggtacata cacacactaa attttcga 39
 <210> 124
 10 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador sintético
 <400> 124
 gactgcgcc gcattcaat ttaagaacc agcattt 37
 20 <210> 125
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 125
 30 atatgctagc agattcattg attaaattgg ggtaa 35
 <210> 126
 <211> 36
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador sintético
 <400> 126
 gactggcgcg cctttcaat acaagtgcta aaatca 36
 45 <210> 127
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 127
 55 tgagagtag tatttactct caact 25
 <210> 128
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 65 <400> 128

ttctttacac aatccattac ataca 25

<210> 129

<211> 978

5 <212>ADN

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 129

taaggctata tttggcaatg aaataaataa aggcgatgta attgtaataa gatatgaagg	60
accaaaaggc ggacctggaa tgagagaaat gctttcacca acttctgcta tagcaggtat	120
gggttttagat aaagatgtag cacttttaac agatggaaga ttctcaggag ctacaagagg	180
ggcatctata ggccatgtgt caccagaagc tatggaaggt ggactaatag gacttgtaga	240
agaaggagat actatatttg tagatattac aaataaaaaa ttagagctaa aagtaagtga	300
ggaagaactt gaaaagagaa gaaagaacta tgtaaagcct gaacctaaaga taaaaacagg	360
atatttatca agatatgcaa aattggttac ttctgcaaat acagggtcag ttcttaaata	420
attggagttt cttaatgtac ttttaatttg taaatatact caactttcaa ctaaaaatat	480
ttcatatatg tgaagttga gtaaatatat tatttaataa aaattcagaa taaactattg	540
acatttaagt tgttttatag taacatatac tcatatttaa ataataaaag ctttgacagg	600
gactattaaa tatgatgtat attttaaagc gagtgggatc tgggtgtaaac ccataaatat	660
ttcatattga aactcaccct tgagctgtaa gctgaaatta tagtaagctg tgccggtgtg	720
aatcgttatt gaattaagta ataaaattgg gtggtaccgc gaacagactt ctgcctcaa	780
gagaaaaggct gttttttgt gctaattttt aacctaaaat tacctatatt aattactttg	840
aattataaat atttagtgtg tatcaagttt aaatttgatt taagtaattt aatttttaga	900
aactatttat aaatgtaaat tagaaagtat aaaatacgta ttaatatatg aaagcttga	960
aagggataag tagatatt	978

10

<210> 130

<211> 1002

<212> ADN

15 <213> Clostridium autoethanogenum

<400> 130

aagttataga tgaaatgcca taagggtggt atgaaaatta aatttagagg agggacacag	60
acatggacaa tacaatatta ttgagtaaga tatcccaggg cttaatggaa tgctgtaaat	120
caaaaaattt ttcaagagta aataaattaa ctgtgaatgt aatgaaaac agcaatatta	180
attcttgtaa tctttatgag tatcttaaaa attttaataa aggcatagta gatgaatcta	240
cagaaattaa aattgaaatt gaagatttgc cggatcaagt tgtaatcata agcagcatag	300
aaggtgatat atcacaagag tgcatataaa gtatgtataa ggtttccaca cgaaaaatca	360

20

ES 2 583 203 T3

	aggaaatggg tatagatttg gtttttacac aaatctatac ccattcccac taagcaagat	420
	taaatttctt tctaatacata ttaactaata cttttgctgt atcatcaact cgcgcaaca	480
	ggctgctgtt aattaagatg tctttgtaaa gtacattatc actgtatgac tttgcataac	540
	ttaggctgta tagctgacgc gcttcatcaa cttctttaat caacttatca gcttcatctg	600
	gctttatatg aagtatattg atacaatfff cctttcgat ctcataggga gcatagataa	660
	atatgctgaa atgatttgaa tggtttctta aaatatagtc agaacacctt cctacaaata	720
	tacaggatga tttatctgcc agatcacaga tgattttctt ttgggcttca aatatttctt	780
	cttgtgtctt ttctgaacta gttcctagt gaaatttcat tttttgtat tcatttttat	840
	ctatttcttc tccactgtca atagtagata caggcaaatt catctttttt gcagcttctt	900
	caacgatatc cctgtcgtaa tattcaacgc ctaacaattc agccattttt ttagcaatgg	960
	gacgtcccag actcccgaat tgacgggaaa tagttattac at	1002
	<210> 131	
	<211> 39	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
10	<400> 131	
	atcatcctg caggtaaggc tatattggc aatgaata 39	
15	<210> 132	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 132	
25	gactgcggcc gcaatatcta cttatccctt tcaaagc 37	
	<210> 133	
	<211> 35	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
35	<400> 133	
	atatgctagc aagttataga tgaaatgcca taagg 35	
	<210> 134	
40	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador sintético	
	<400> 134	
50	gactggcgcg ccatgtaata actattccc gtcaatt 37	

ES 2 583 203 T3

<210> 135
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 135
 10
 ataaatgaag atgcacttac tgta 25
 <210> 136
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador sintético
 20
 <400> 136
 aaaatttctc cattttacga tccta 25
 25
 <210> 137
 <211> 1115
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum
 30
 <400> 137
 agtaaatatt acgcgtaaag tgtagagaa tgggagggtg tctctaaacg aaaagcttaa 60
 ataattttac tttataatth aaagccttatg atgtgatatt gcttccgctg ttacattaaa 120
 gagattttgt acttacctct tttctcttta atgtgactac attaaagaga aaagagggtg 180
 ttctatgtag attttttctg ctgtgtaaat taatttaata ttataacact gggggtaaaa 240
 agtatgaaaa gtagaatgaa cacaaaatth ctgttacta ccgctgtttt tgttgccgctc 300
 gcagttgttt tgagatcgtt ttctatagca atagctgcag gtggcatact cactatgaga 360
 ataagttttg acgccatag ttatataatg cctggtatat tatttgacc attatatggg 420
 ggaatttcag gtggattaat cgatatactt ggctatataa taagacctat ggggtggatac 480
 atccctttgt ttactataac taatatagca gctggtatth tgcctgcact tatatggaga 540
 tatattaaaa atgctaaaga atataaagta aggaattgtt atattgctth ctttggattg 600
 ctcttagtag taggtttttt taattttatc ataatgaaat ttgcatatca tactacttta 660
 ggacaactgc tatcatctth aggaaaaaaa tctcaatacc ttagtaccgg acttatgtta 720
 ataggtgcta taggcgttat tatatttata ataaatgtat ttattaagaa aagcatggta 780
 aaatcctatg attttgtaa taacaattat tttaaattaa taattgcaat tggatatatct 840
 ggaattttaa tatgcactat aaatacttat atattgctta tatttactcc tgctctcatt 900
 gccaaaggct ttatgttctt atggatacct agaataatg aggctcttct tatgactata 960
 gtaaattcct atataacctg tatgattatg tactgttata gcttatttca aggtagggta 1020
 gtaaaaaag cttaaacgt aaaagaaatg gggctcaaca aatgtcccca tttttattt 1080
 ctctgtttac tcttctacta aatctgatat agccg 1115
 35
 <210> 138
 <211> 956
 <212> ADN

ES 2 583 203 T3

<213> Clostridium autoethanogenum

<400> 138

atctaagtc	cccttttatt	tatatattaa	tcaattat	tatcaataa	tataataatt	60
tatacttagt	tagactaaaa	aatagattgc	ttgttat	tttcacatac	ttatttattc	120
ttttttaca	cttatttact	tagctaagtt	agaattacac	cttttatatt	atatttatat	180
aatataaaag	accaaacttc	tcccctctgg	ggcgagaagt	ttggtccgcg	gtaccaccca	240
atTTTTtact	taattcaatt	aacggctctg	ccggtataac	ttacttatat	ttcagttaaa	300
caactccagg	gtgattttca	ctagctaata	atltatgagc	ttcacctaa	cctcattctc	360
tttgaaatct	ttcaccaatt	acttttccct	atcctcattt	ttactatcta	atTTTcaatt	420
taattacact	ttcacattta	gtatatat	taataatact	atcttatttt	ttaaatgca	480
atagcttttt	taaattttta	gaaaataaat	tcaaaaatat	acatgaatac	ctaggttgtt	540
aaaaaatcag	accatataaa	catggtctga	taagcagaaa	ttattttgct	gcatcttggtg	600
tacttgcaaa	atcttcatcg	ttcataacac	tatgactatt	cccatataca	aagtatatta	660
taagtccaac	aacaagccat	actgcaaatc	tcaccaaaagt	taccttttgc	agattatata	720
tcaagaaagc	acaagctgcc	atagcaaaaa	caggtgtaac	cggtgaaaat	ggaactttaa	780
atgatctagg	tctatccggt	tctctttttc	ttaaaactat	aactgatgca	gatactatta	840
taaagtctgc	tagtgtacct	atattagtta	gttctgaaac	aacacttatt	ggtgtaaadc	900
5	cagctattat	catagttata	atgccaacaa	gtaaagtact	ttttacaggt	gtatgg 956

<210> 139

<211> 39

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

15 <400> 139

attcatcctg caggagtaaa tattacgcgt aaagtgtta 39

<210> 140

20 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador sintético

<400> 140

gactgcgcc gcgctatat cagatttagt agaaga 36

30 <210> 141

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Cebador sintético

<400> 141

40 <210> 141

atatgctagc atctaagtc cccttttatt tatat 35

ES 2 583 203 T3

<210> 142
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 142
 10
 gactggcgcg ccatacacct gtaaaaagta ctta 35
 <210> 143
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador sintético
 20
 <400> 143
 atgctggtat atcaaatggt ttagt 25
 25
 <210> 144
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 144
 35
 attgcagtat cagctatatt aacag 25
 <210> 145
 <211> 353
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum
 40
 <400> 145
 aaaaaagctt ataattatcc ttagatggcg ctccggtgcy cccagatagg gtgtaagtc 60
 aagtagttta aggtactact ctgtaagata acacagaaaa cagccaacct aaccgaaaag 120
 cgaaagctga tacgggaaca gagcacggtt ggaaagcgat gagttaccta aagacaatcg 180
 ggtacgactg agtcgcaatg ttaatcagat ataaggata agttgtgttt actgaacgca 240
 agtttctaata ttcgattcca tctcgataga ggaaagtgtc tgaaacctct agtacaaga 300
 aaggtaaagt aaccggagcg acttatctgt taccaccaca tttgtacaat ctg 353
 45
 <210> 146
 <211> 353
 <212> ADN
 <213> Clostridium autoethanogenum
 50
 <400> 146

ES 2 583 203 T3

	aaaaaagctt ataattatcc ttagttaacc aagcagtgcg cccagatagg gtgtaagtc	60
	aagtagttta aggtactact ctgtaagata acacagaaaa cagccaacct aaccgaaaag	120
	cgaaagctga tacgggaaca gagcacggtt ggaaagcgat gagttaccta aagacaatcg	180
	ggtacgactg agtcgcaatg ttaatcagat ataaggata agttgtgttt actgaacgca	240
	agtttcta atcgcatttta actcgataga ggaaagtgtc tgaacctct agtacaaga	300
	aaggttaagtt atctgcttgg acttatctgt taccaccaca tttgtacaat ctg	353
	<210> 147	
	<211> 353	
5	<212> ADN	
	<213> Clostridium autoethanogenum	
	<400> 147	
	aaaaaagctt ataattatcc ttaagtgtct taccggtgcg cccagatagg gtgtaagtc	60
	aagtagttta aggtactact ctgtaagata acacagaaaa cagccaacct aaccgaaaag	120
	cgaaagctga tacgggaaca gagcacggtt ggaaagcgat gagttaccta aagacaatcg	180
	ggtacgactg agtcgcaatg ttaatcagat ataaggata agttgtgttt actgaacgca	240
	agtttcta atcgcatttta actcgataga ggaaagtgtc tgaacctct agtacaaga	300
10	aaggttaagtt atccgataag acttatctgt taccaccaca tttgtacaat ctg	353
	<210> 148	
	<211> 353	
	<212> ADN	
15	<213> Clostridium autoethanogenum	
	<400> 148	
	aaaaaagctt ataattatcc ttacatgacc agcccgtgcg cccagatagg gtgtaagtc	60
	aagtagttta aggtactact ctgtaagata acacagaaaa cagccaacct aaccgaaaag	120
	cgaaagctga tacgggaaca gagcacggtt ggaaagcgat gagttaccta aagacaatcg	180
	ggtacgactg agtcgcaatg ttaatcagat ataaggata agttgtgttt actgaacgca	240
	agtttcta atcgcatttta actcgataga ggaaagtgtc tgaacctct agtacaaga	300
20	aaggttaagtt aaggggctgg acttatctgt taccaccaca tttgtacaat ctg	353
	<210> 149	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 149	
30	cacaaccgt catgagcaag gtgc 24	
	<210> 150	
	<211> 19	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
40	<400> 150	

tgtaattact aaatcagcc 19
 <210> 151
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 10 <400> 151
 ggaagtcagg gacatgcaca tgct 24
 15 <210> 152
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 152
 25 catttcagg agcatatcca gcttc 25
 <210> 153
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 35 <400> 153
 gtcaggtgg cggagttata ctggc 25
 40 <210> 154
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador sintético
 <400> 154
 ccatagtcc gaggctcca g 21
 50 <210> 155
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 155
 60 ggagctgaag tactattaa atg 23
 <210> 156
 <211> 22
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

5 <400> 156

ctacttcagc tgattgtacg tc 22

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo acetógeno carboxidotrófico recombinante que está adaptado para producir uno o más productos y una cantidad reducida o no producir sustancialmente 2,3-butanodiol por fermentación de un sustrato que comprende monóxido de carbono, comprendiendo el microorganismo una o más modificaciones genéticas que alteran la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol, comparado con un microorganismo original, en donde la una o más modificaciones genéticas que alteran la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol se seleccionan de:
- 5 (a) al menos una modificación genética que altera la expresión y/o actividad de una o más enzimas capaces de convertir el piruvato en acetolactato;
- 10 (b) al menos una modificación genética que altera la expresión y/o actividad de una o más enzimas capaces de convertir el acetolactato en acetoína;
- (c) al menos una modificación genética que altera la expresión y/o actividad de una o más enzimas capaces de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol; y
- (d) combinaciones de las mismas.
2. Un microorganismo acetógeno carboxidotrófico recombinante según la reivindicación 1, que está adaptado para producir etanol como el producto principal.
3. Un microorganismo recombinante según la reivindicación 2, en donde el microorganismo está adaptado para producir uno o más de formiato, lactato, piruvato, succinato, valina, leucina, isoleucina, acetolactato, malato, fumarato, 2-oxoglutarato y citrato.
- 20 4. Un microorganismo recombinante según la reivindicación 2 o 3, en donde el microorganismo está adaptado para producir una cantidad mayor de uno o más de etanol, formiato, lactato, piruvato, succinato, valina, leucina, isoleucina, acetolactato, malato, fumarato, 2-oxoglutarato y citrato comparado con el microorganismo original.
5. Un microorganismo recombinante según la reivindicación 1, en donde el microorganismo está adaptado para producir uno o más productos seleccionados del grupo que consiste en etanol, formiato, lactato, piruvato, succinato, valina, leucina, isoleucina, acetolactato, malato, fumarato, 2-oxoglutarato y citrato.
- 25 6. Un microorganismo recombinante según la reivindicación 1 o 2, en donde:
- (a) la una o más enzimas capaces de convertir el piruvato en acetolactato es una acetolactato sintasa (EC 2.2.1.6) (alsS);
- (b) la una o más enzimas capaces de convertir el acetolactato en acetoína es una acetolactato descarboxilasa (EC 4.1.1.5) (budA); o
- 30 (c) la una o más enzimas capaces de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol es una enzima seleccionada de 2,3-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.4) (2,3bdh), una acetoína reductasa, (EC 1.1.1.4) y una alcohol primario:secundario deshidrogenasa (EC 1.1.1.2).
7. Un microorganismo recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la una o más modificaciones genéticas alteran la expresión y/o actividad de uno o más de la acetolactato sintasa (EC 2.2.1.6) (alsS), acetolactato descarboxilasa (EC 4.1.1.5) (BudA), 2,3-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.4) (2,3 bdh), acetoína reductasa (EC 1.1.1.4) y una alcohol primario:secundario deshidrogenasa (EC 1.1.1.2).
- 35 8. Un microorganismo recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el microorganismo original se selecciona del grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* y *Clostridium coskatii*.
- 40 9. Un microorganismo recombinante según la reivindicación 7, en donde el microorganismo original es *Clostridium autoethanogenum* DSM23693.
10. Un método para la producción de un microorganismo acetógeno carboxidotrófico recombinante que es capaz de producir uno o más productos y una cantidad reducida o no producir sustancialmente 2,3-butanodiol, por fermentación de un sustrato que comprende monóxido de carbono, comprendiendo el método modificar genéticamente un microorganismo acetógeno carboxidotrófico original para alterar la ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol, en donde el método comprende introducir en el microorganismo original una o más modificaciones genéticas que alteran genes que codifican:
- 45 (a) enzimas capaces de convertir el piruvato en acetolactato;
- (b) enzimas capaces de convertir el acetolactato en acetoína;
- 50 (c) enzimas capaces de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol; y

(d) combinaciones de las mismas;

en donde preferiblemente el método comprende introducir en el microorganismo original una o más modificaciones genéticas que alteran una combinación de dos o más de dichos genes.

5 11. Un método según la reivindicación 10, que es para la producción de un microorganismo acetógeno carboxidotrófico recombinante que es capaz de producir etanol como el producto principal.

12. Un método según las reivindicaciones 10 u 11, en donde:

(a) la una o más enzimas capaces de convertir el piruvato en acetolactato es una acetolactato sintasa (EC 2.2.1.6) (alsS);

10 (b) la una o más enzimas capaces de convertir el acetolactato en acetoína es una acetolactato descarboxilasa (EC 4.1.1.5) (budA); o

(c) la una o más enzimas capaces de convertir la acetoína en 2,3-butanodiol es una enzima seleccionada de la 2,3-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.4) (2,3bdh), una acetoína reductasa (EC 1.1.1.4) y una alcohol primario:secundario deshidrogenasa (EC 1.1.1.2).

15 13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el método comprende introducir en el microorganismo original una o más modificaciones genéticas que alteran uno o más de los genes que codifican una o más de la acetolactato sintasa (EC 2.2.1.6) (alsS), acetolactato descarboxilasa (EC 4.1.1.5) (BudA), 2,3-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.4) (2,3 bdh), acetoína reductasa (EC 1.1.1.4) y alcohol primario:secundario deshidrogenasa (EC 1.1.1.2).

20 14. Un método para la producción de uno o más productos, comprendiendo el método la fermentación de un sustrato que comprende CO, usando un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; en donde dicho producto preferiblemente es uno o más de etanol, formiato, lactato, piruvato, succinato, valina, leucina, isoleucina, acetolactato, malato, fumarato, 2-oxoglutarato y citrato.

15. Un método según la reivindicación 14, comprendiendo el método las etapas de:

25 (a) proporcionar un sustrato que comprende CO a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; y

(b) fermentar el cultivo de forma anaerobia en el biorreactor para producir el uno o más de los productos, preferiblemente incluyendo etanol; o

(c) capturar el gas que contiene CO producido como resultado del procedimiento industrial, antes de liberar el gas a la atmósfera;

30 (d) la fermentación anaerobia del gas que contiene CO para producir uno o más productos, preferiblemente incluyendo etanol, por un cultivo que contiene uno o más microorganismos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;

y que comprende además opcionalmente la etapa de recuperar el uno más productos del caldo de fermentación;

35 en donde preferiblemente el sustrato comprende al menos de aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de CO en volumen.

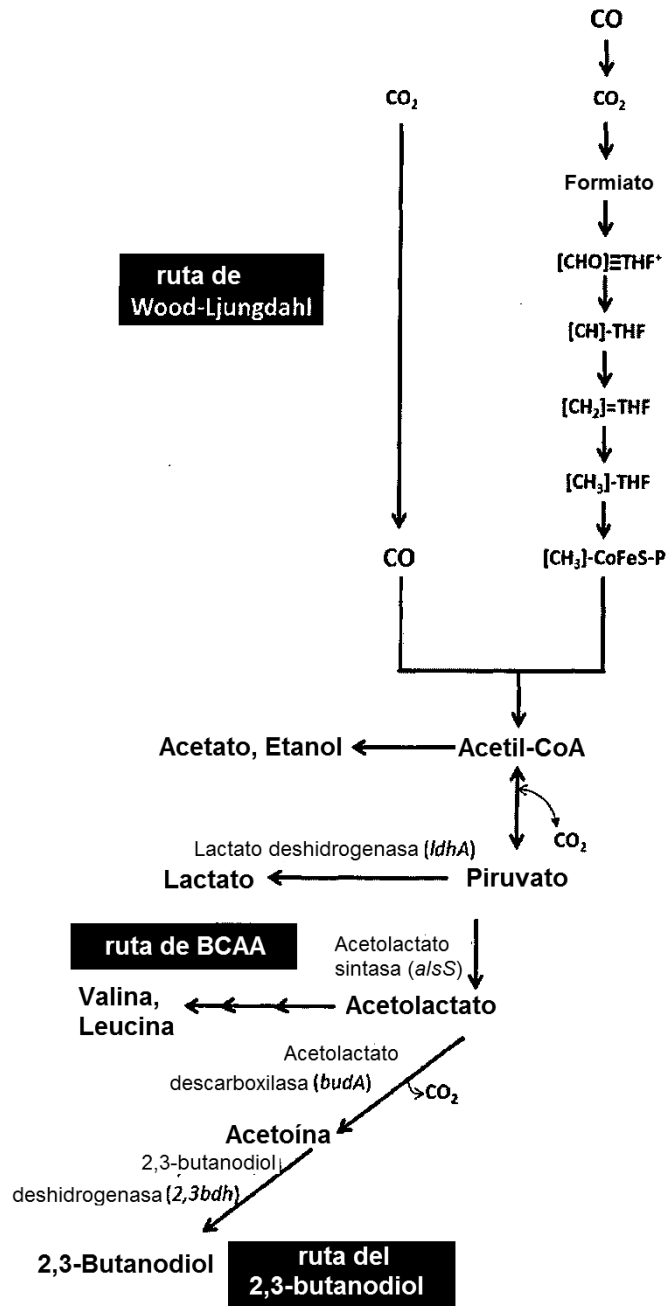


FIG 1a

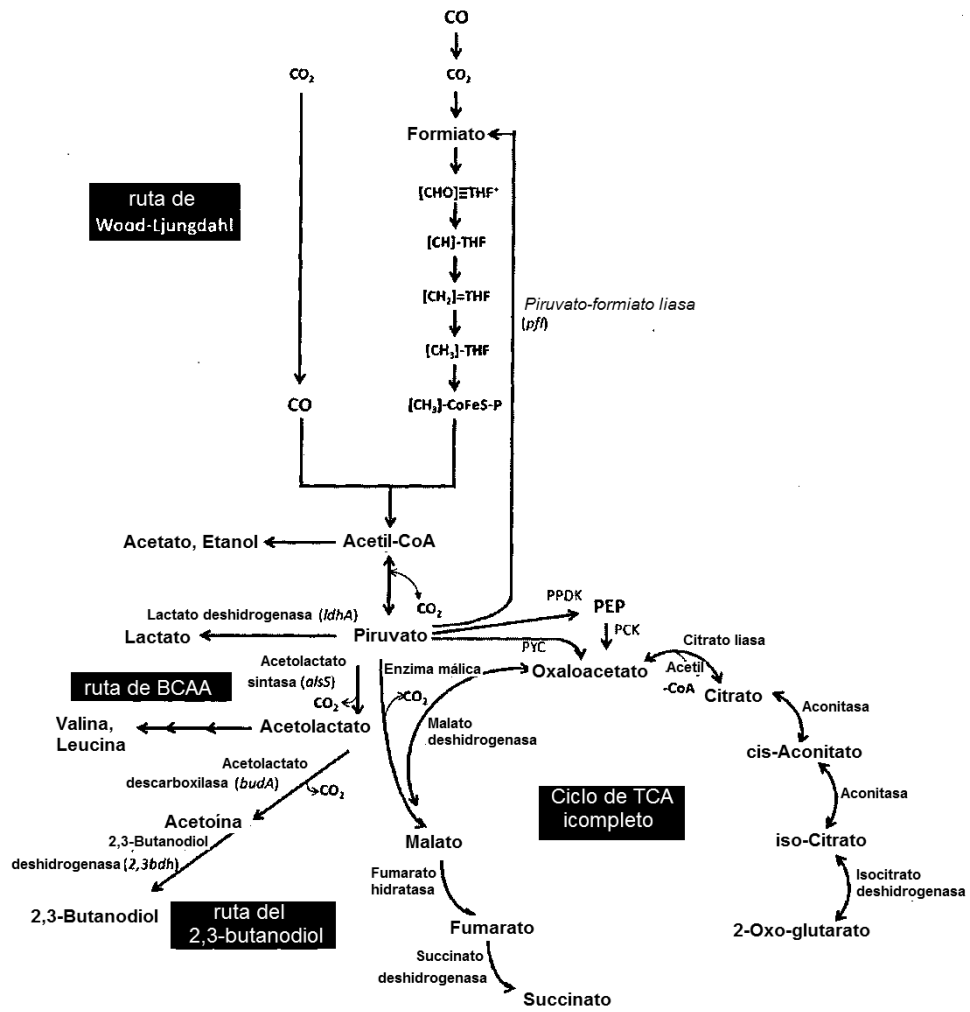


FIG 1b

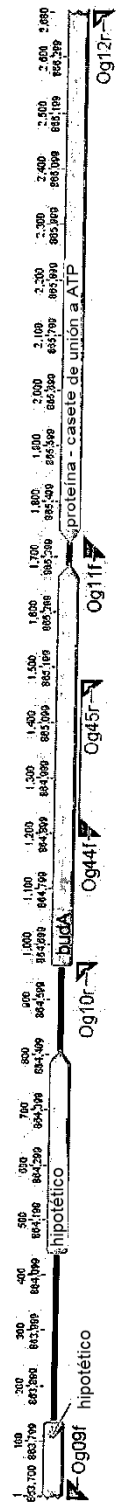


FIG 2

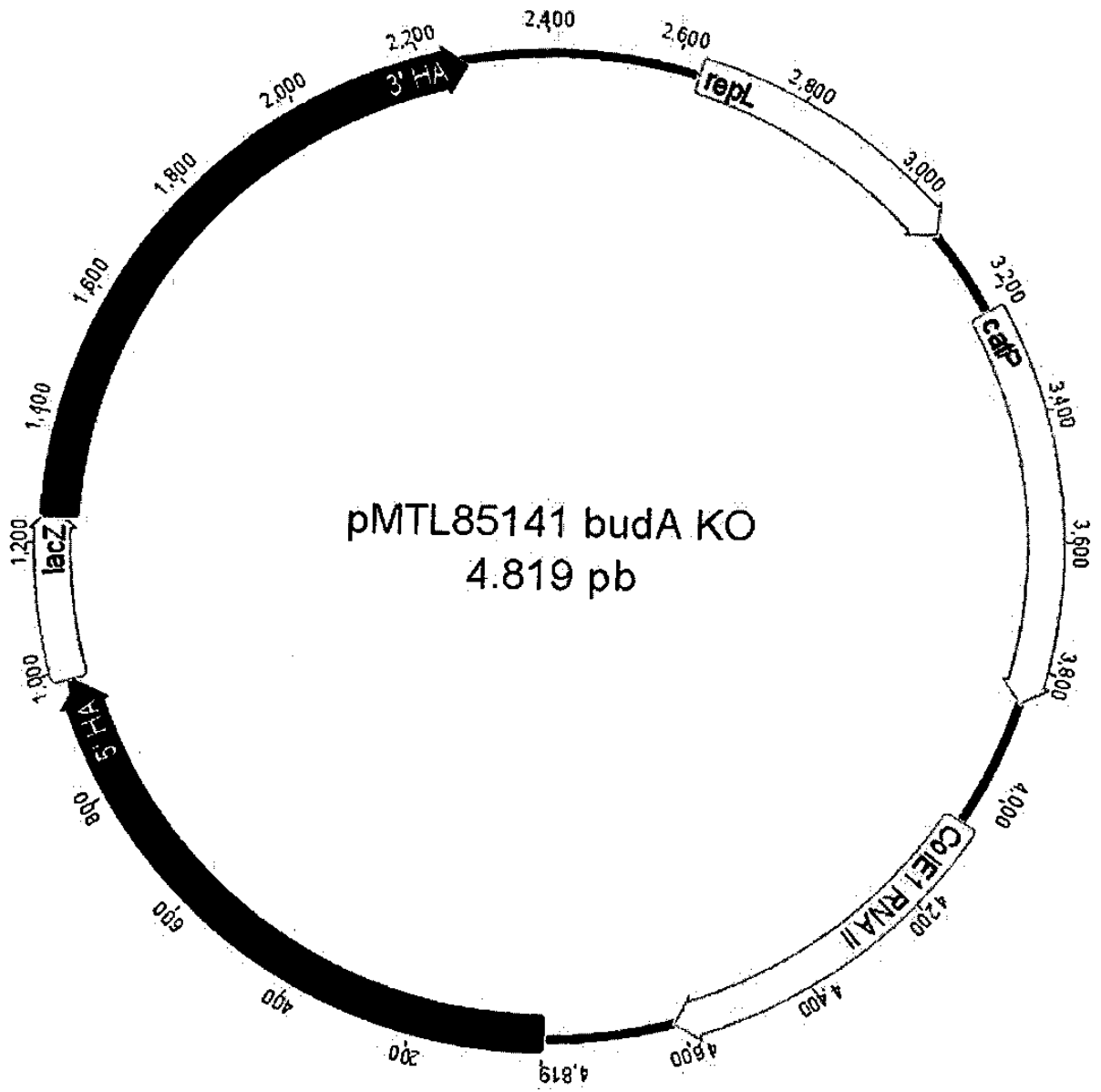


FIG 3

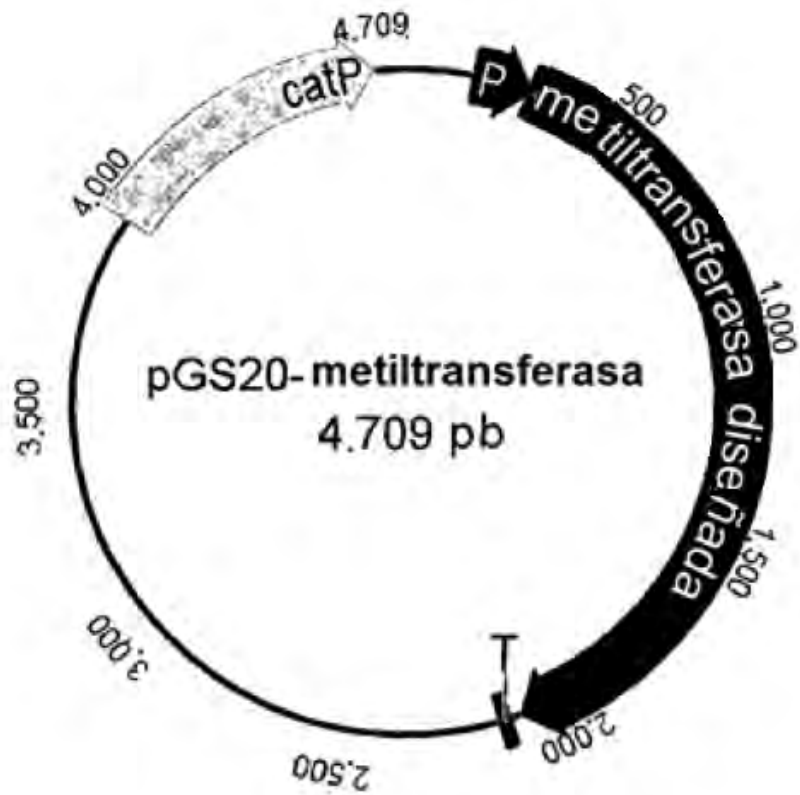


FIG 4

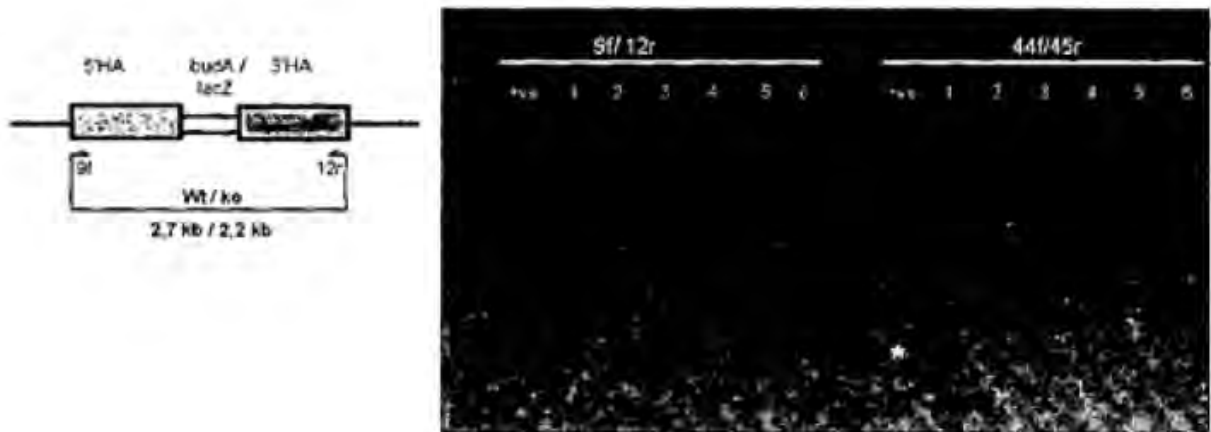


FIG 5



FIG 6

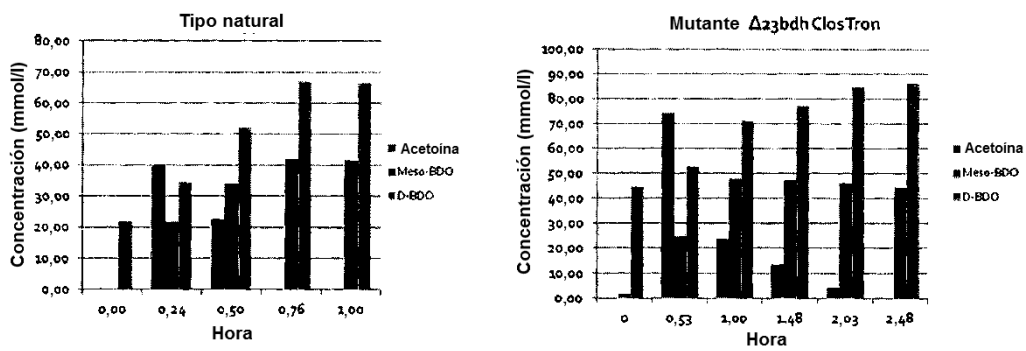


FIG 7