

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 482**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21	(2006.01)
C12P 7/04	(2006.01)
C12P 7/28	(2006.01)
C12P 19/32	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2012 PCT/JP2012/069247**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13018734**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2012 E 12819719 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2738247**

54 Título: **Microorganismo que tiene un ciclo de fijación de dióxido de carbono introducido en el mismo**

30 Prioridad:

29.07.2011 JP 2011167808

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

01.02.2017

73 Titular/es:

**MITSUI CHEMICALS, INC. (100.0%)
5-2, Higashi-Shimbashi 1-chome
Minato-ku, Tokyo 105-7117, JP**

72 Inventor/es:

**FUJII, RYOTA;
SHIRAI, TOMOKAZU;
ARAKI, TADASHI;
AMANO, KOH;
MATSUMOTO, YOSHIKO;
TATENO, TOSHIHIRO;
TAKEBAYASHI, NOZOMI;
MORISHIGE, TAKASHI;
TAKAHASHI, HITOSHI;
WADA, MITSUFUMI;
SHIMIZU, HIROSHI;
FURUSAWA, CHIKARA;
HIRASAWA, TAKASHI;
HIDESAKI, TOMONORI;
ENDO, AYAKO;
JÜRGEN-LOHMANN, DOMINIK LUKAS;
MADHAVAN, ANJALI y
CHONG, SU SUN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 599 482 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

Microorganismo que tiene un ciclo de fijación de dióxido de carbono introducido en el mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un microorganismo productor de acetil-CoA y a un método de producción de una sustancia usando el microorganismo productor de acetil-CoA.

10 **Técnica anterior**

La acetil-CoA es uno de los productos intermedios significativamente importantes en las rutas metabólicas de los microorganismos. Mediante acetil-CoA se producen diversos metabolitos. Ejemplos bien conocidos de dichas sustancias producidas mediante acetil-CoA incluyen aminoácidos tales como L-ácido glutámico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina y L-isolucina; ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido caproico, ácido cítrico, ácido 3-hidroxi-butírico, ácido 3-hidroxiisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-hidroxiisobutírico, ácido metacrílico y ácido poli-3-hidroxi-butírico; alcoholes tales como alcohol isopropílico, etanol y butanol; acetona; y ácidos poliglutámicos.

20 En la mayoría de los microorganismos la acetil-CoA se produce usando, como fuente de carbono, un azúcar tal como glucosa. El azúcar se convierte primero en piruvato mediante una ruta metabólica denominada ruta glucolítica, tal como la ruta de Embden-Meyerhof, la ruta de Entner-Doudoroff o la ruta de la pentosa fosfato. Posteriormente el piruvato se convierte en acetil-CoA por acciones de descarboxilasa, piruvato formiato-liasa y similares. En este proceso, el dióxido de carbono y el formiato se generan como subproductos, y algunos de los carbonos derivados del azúcar se perderán. Por lo tanto, se han realizado varios estudios con el objetivo de conseguir la refijación de dióxido de carbono para aumentar el rendimiento de acetil-CoA.

En microorganismos, existen varias rutas conocidas para fijar el dióxido de carbono como fuente de carbono (Appl. Environ. Microbiol. 77(6), 1925-1936, 2011). Ejemplos específicos de las rutas incluyen el ciclo de Calvin-Benson, el ciclo de TCA reductor, la ruta de Wood-Ljungdahl, el ciclo de 3-hidroxi-propionato y el ciclo de 4-hidroxi-butirato. El ciclo de Calvin-Benson es una ruta de fijación de CO₂ que existe en plantas y bacterias fotosintéticas, y contiene aproximadamente 12 tipos de enzimas. En el ciclo de Calvin-Benson, el CO₂ se fija por la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RubisCO) y, finalmente, se produce gliceraldehído 3-fosfato. El ciclo de TCA reductor se encuentra en bacterias microaerófilas y bacterias anaeróbicas incluyendo bacterias verdes del azufre, y contiene 11 tipos de enzimas. Este ciclo se caracteriza por enzimas de fijación del CO₂ (es decir, acetil-CoA carboxilasa, 2-oxoglutarato sintasa) que requiere ferredoxina como coenzima. En el ciclo de TCA reductor, se produce piruvato a partir de CO₂ por la reacción inversa del ciclo de TCA habitual. La ruta de Wood-Ljungdahl se encuentra en microorganismos anaeróbicos tales como bacterias productoras de ácido acético, y contiene 9 tipos de enzimas. En la ruta de Wood-Ljungdahl, se reducen CO₂ y formiato sobre una coenzima por la formiato deshidrogenasa, la CO deshidrogenasa, etc. y, finalmente, se convierte en acetil-CoA. El ciclo de 3-hidroxi-propionato se encuentra en bacterias *Chloroflexus* y similares, y contiene 13 tipos de enzimas. En el ciclo de 3-hidroxi-propionato, se fija CO₂ por la acción de acetil-CoA (propionil-CoA) carboxilasa y se produce acetil-CoA mediante malonil-CoA y similares. El ciclo de 4-hidroxi-butirato existe en arqueobacterias y similares. En el ciclo de 4-hidroxi-butirato, se fija CO₂ por las acciones de piruvato sintasa, acetil-CoA (propionil-CoA) carboxilasa, y fosfoenolpiruvato carboxilasa, mediante lo cual se produce acetil-CoA mediante 4-hidroxi-butiril-CoA y similares.

Para producir una sustancia útil, se ha informado de varios enfoques como idea para introducir una ruta de fijación de dióxido de carbono en un microorganismo productor de compuestos útiles. Por ejemplo, la publicación internacional (WO 2009/094485 y WO 2010/071697) describen enfoques para producir acetil-CoA a partir de dióxido de carbono, usando un microorganismo en el que se introdujo una ruta similar a la ruta de Wood-Ljungdahl de bacterias productoras de ácido acético. Como ejemplo de fijación de CO₂ para producir un compuesto útil, el documento WO 2009/046929 describe un enfoque para producir ácido láctico a partir de dióxido de carbono usando un microorganismo en que se introdujo una hidrogenasa y tetrahidrofolato liasa. El documento WO 2011/099006 propone un ciclo en que se fija CO₂ mediante una reacción de fijación de dióxido de carbono sobre acetil-CoA o una reacción de reducción de malonil-CoA. La patente alemana n.º 102007059248 propone la producción de acetil-CoA por una ruta similar al ciclo de 4-hidroxi-butirato.

Sumario de la invención60 **Problema técnico**

Sin embargo, los ciclos de fijación de dióxido de carbono conocidos no son necesariamente eficaces desde los puntos de vista de fijación de CO₂ y producción de productos químicos útiles derivados de acetil-CoA. Por ejemplo, el ciclo de Calvin-Benson es el más famoso como ciclo de fijación de dióxido de carbono encontrado en la naturaleza, pero la RubisCO implicada en la fijación de dióxido de carbono tiene una baja velocidad de reacción y causa reacciones secundarias tales como degradación oxidativa. Por lo tanto, la RubisCO es ineficaz como enzima

(Journal of Bioscience and Bioengineering 94(6) 497-505, 2002). En la ruta de Wood-Ljungdahl y las rutas descritas en los documentos WO 2009/094485, WO 2010/071697, WO 2009/046929 y similares, se incluye una ruta para reducir CO₂ en CO o formiato. Sin embargo, la reacción de reducción apenas sucede en condiciones habituales, y la enzima que cataliza este tipo de reacción fuerte de reducción a menudo actúa solamente en entorno reductor. Por lo tanto, es difícil introducir este tipo de ruta en microorganismos diferentes a microorganismos estrictamente anaeróbicos. En el ciclo de TCA reductor, una reacción de reducción por piruvato sintasa o 2-oxoglutarato sintasa requiere una fuerte energía de reducción desde ferredoxina como aceptor de electrones, y es difícil realizar la reacción. El ciclo de 4-hidroxibutirato, el ciclo de 3-hidroxipropionato y las rutas descritas en los documentos WO 2011/099006, WO 2009/046929 y similares, utilizan la reacción de reducción de ácido carboxílico y un (tio) éster del mismo, tal como la reducción de succinil-CoA o la reducción de malonil-CoA. Sin embargo, generalmente es difícil realizar este tipo de reacción como reacción enzimática, y es deseable evitarlas como rutas de fermentación en lo posible (Atsumi *et al.*, Nature, 451, (3), 86-89, 2008; Yim *et al.*, Nat. Chem. Biol., 7, 445-452, 2011). El ciclo de 4-hidroxibutirato procede a través de una reacción de deshidratación tal como deshidratación de 4-hidroxibutiril-CoA o deshidratación de 3-hidroxipropionato, pero este ciclo tiene una desventaja porque este tipo de reacción de deshidratación a menudo compite con la reacción inversa (hidratación) en agua. En el ciclo de 4-hidroxibutirato, el ciclo de 3-hidroxipropionato y el ciclo de TCA reductor, la acetil-CoA producida se convierte en otras sustancias dentro del ciclo por la acción de malonil-CoA sintasa o piruvato sintasa. Por lo tanto, estos ciclos no son necesariamente eficaces desde el punto de vista de producción de acetil-CoA.

Cuando se intenta producir una cierta sustancia introduciendo este tipo de ciclo en un microorganismo, es necesario considerar la cantidad de enzimas implicadas en el ciclo y la cantidad de actividades enzimáticas a conferir adicionalmente. Es decir, cuando la cantidad de enzimas implicadas en el ciclo o la cantidad de actividades enzimáticas a conferir adicionalmente aumenta, la regulación se vuelve más difícil y la carga sobre el microorganismo aumenta. Por ejemplo, para introducir la ruta de Wood-Ljungdahl en *Escherichia coli*, es necesario introducir al menos 9 tipos de genes. De forma práctica sería una tarea muy difícil construir una ruta productora de sustancias y también introducir y regular tantos genes. Claramente sería ventajoso construir un ciclo que incluya una cantidad pequeña de enzimas confiando una cantidad más pequeña de enzimas, en términos de construcción del ciclo y en términos de combinación con otra ruta de producción de sustancias.

Por consiguiente, para fijar el CO₂ y convertirlo en acetil-CoA, sería ideal que (A) cada enzima implicada en la ruta tenga una actividad suficientemente alta; (B) el ciclo no incluya una enzima que consuma acetil-CoA; y (C) el ciclo tenga una configuración simple y una cantidad pequeña de enzimas recién conferidas. Sin embargo, ninguno de los ciclos para producir acetil-CoA a partir de CO₂ informados hasta ahora satisface todas las condiciones (A) a (C) y, por lo tanto, la posibilidad de lograr dichos ciclos es baja. De hecho, respecto a las propuestas referentes a los ciclos existentes de fijación de dióxido de carbono, actualmente casi no ha habido ejemplos reales de conversión de CO₂ en acetil-CoA o una sustancia derivada de acetil-CoA para su uso en la fermentación confiando una actividad enzimática a un microorganismo industrialmente útil.

La presente invención proporciona un microorganismo útil para la producción eficaz de acetil-CoA usando dióxido de carbono, y un método de producción de acetil-CoA o un metabolito útil derivado de acetil-CoA usando el microorganismo.

Solución al problema

El aspecto de la invención es el siguiente.

[1] Un microorganismo productor de acetil-CoA que incluye un ciclo de producción de acetil-CoA obtenido confiando al menos un tipo de actividad enzimática seleccionada del grupo que consiste en malato tioquinasa, malil-CoA liasa, glioxilato carboligasa, 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa e hidroxipiruvato reductasa, a un microorganismo que no tiene ninguno de:

(a) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de malonil-CoA en malonato semialdehído o 3-hidroxipropionato;

(b) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de acetil-CoA y CO₂ a piruvato;

(c) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de crotonil-CoA y CO₂ a etilmalonil-CoA o glutaconil-CoA;

(d) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de CO₂ a formiato; donde el microorganismo no tiene ninguna actividad malato tioquinasa y malil-CoA liasa endógena.

[2] El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con [1], que incluye un ciclo de producción de acetil-CoA donde el fosfoenolpiruvato o piruvato se convierte en oxaloacetato, y después en 2-hidroxi-3-oxopropionato debido a acciones de malato tioquinasa, malil-CoA liasa, glioxilato carboligasa, y después en fosfoenol piruvato de nuevo mediante 2-fosfoglicerato.

[3] el microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con [1] o [2], que comprende un ciclo de producción de acetil-CoA que comprende:

(f) al menos una seleccionada del grupo de:

piruvato quinasa y piruvato carboxilasa;
 fosfoenolpiruvato carboxilasa; y
 fosfoenolpiruvato carboxiquinasa;

(g) malato deshidrogenasa;

(h) malato tioquinasa;

(i) malil-CoA liasa;

(j) glioxilato carboligasa;

(k) al menos una seleccionada del grupo que consiste en:

2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa; e
 hidroxipiruvato isomerasa e hidroxipiruvato reductasa;

(l) al menos una seleccionada del grupo que consiste en:

glicerato 2-quinasa; y
 fosfoglicerato mutasa y glicerato 3-quinasa; y

(m) enolasa.

[4] El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], donde el microorganismo es un microorganismo que pertenece a *Enterobacteriaceae* o un microorganismo que pertenece a bacterias corineformes.

[5] El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], donde el microorganismo es bacterias *Escherichia* o bacterias o *Pantoea* que pertenecen a *Enterobacteriaceae*, o el microorganismo es bacterias *Corynebacterium* que pertenecen a bacterias corineformes.

[6] El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], donde el microorganismo es una bacteria *Escherichia* en que está inactivada o reducida una actividad de lactato deshidrogenasa poseída por la bacteria *Escherichia*.

[7] El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], donde el microorganismo es una bacteria *Escherichia* en que está inactivada o reducida una actividad de al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en isocitrato liasa y malato sintasa poseída por la bacteria *Escherichia*.

[8] El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7], donde el microorganismo es una bacteria *Escherichia* en que está conferida o potenciada una actividad tiolasa, una actividad CoA transferasa y una actividad acetoacetato descarboxilasa.

[9] El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8], donde el microorganismo es una bacteria *Escherichia* en que está conferida o potenciada una actividad tiolasa, una actividad CoA transferasa, una actividad acetoacetato descarboxilasa y una actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa.

[10] El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], donde el microorganismo es una bacteria *Pantoea* en que están inactivadas o reducidas las actividades de fumarato hidratasa A y fumarato hidratasa C poseídas por la bacteria *Pantoea*.

[11] El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5] o [10], donde el microorganismo es una bacteria *Pantoea* en que está inactivada o reducida a una actividad de malato sintasa poseída por la bacteria *Pantoea*.

[12] El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11], donde la malato tioquinasa usada es una malato tioquinasa obtenida por modificación de mtkB derivado de *Methylobacterium extorquens* para alterar un aminoácido correspondiente al 144° aminoácido en isoleucina, asparagina, ácido aspártico, lisina, arginina, histidina, glutamina o prolina, y/o para alterar el 244° aminoácido en ácido glutámico, alanina, leucina, isoleucina, metionina, asparagina, tirosina, lisina o arginina.

[13] Un método de producción de acetil-CoA, que comprende producir acetil-CoA a partir de un material de fuente de carbono usando el microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [12].

[14] Un método de producción de acetona, que comprende producir acetona a partir de un material de fuente de carbono usando el microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con [9] o [12].

[15] Un método de producción de alcohol isopropílico, que comprende producir alcohol isopropílico a partir de un material de fuente de carbono usando el microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con [9] o [12].

[16] Un método de producción de glutamato, que comprende producir glutamato a partir de un material de fuente de carbono usando el microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con [5], [10], [11] o [12].

Efectos ventajosos de la invención

La invención proporciona un microorganismo útil para la conversión eficaz de dióxido de carbono en acetil-CoA, y un método de producción de acetil-CoA o un metabolito útil usando el microorganismo.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama de la ruta para ilustrar el resultado de la ruta de fijación de dióxido de carbono de acuerdo con una realización de la invención.

La Fig. 2A y Fig. 2B muestran la homología entre diversas secuencias mtkB.

La Fig. 3A y Fig. 3B muestran la homología entre diversas secuencias mtkA.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra el patrón de incorporación de ^{13}C de glutamato producido por diversas bacterias *Pantoea* de acuerdo con el Ejemplo 41.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra el patrón de incorporación de ^{13}C de glutamato producido por diversas bacterias *Corynebacterium* de acuerdo con el Ejemplo 50.

Descripción de las realizaciones

El microorganismo productor de acetil-CoA de la invención es un microorganismo productor de acetil-CoA que incluye un ciclo de producción de acetil-CoA obtenido confiriendo al menos un tipo de actividad enzimática seleccionada del grupo que consiste en malato tioquinasa, malil-CoA liasa, glioxilato carboligasa, 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa e hidroxipiruvato reductasa, a un microorganismo que no tiene ninguno de los siguientes (a), (b), (c), (d), en que ninguna de (a), (b), (c) o (d) se confiere al microorganismo, o el microorganismo no muestra ninguna de las funciones de (a), (b), (c) y (d).

(a) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de malonil-CoA en malonato semialdehído o 3-hidroxi-3-oxopropionato;

(b) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de acetil-CoA y CO_2 a piruvato;

(c) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de crotonil-CoA y CO_2 a etilmalonil-CoA o glutaconil-CoA;

(d) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de CO_2 a formiato; donde el microorganismo no tiene ninguna actividad malato tioquinasa y malil-CoA liasa endógena.

De acuerdo con la invención, confiriendo una actividad enzimática predeterminada, se puede construir un ciclo de fijación de dióxido de carbono que fija CO_2 generado durante el metabolismo de carbohidratos o CO_2 suministrado desde el exterior, y se puede proporcionar un microorganismo productor de acetil-CoA que tenga un ciclo de producción de acetil-CoA en que se convierte de forma eficaz CO_2 en acetil-CoA.

Es decir, como resultado de diversos estudios sobre la conversión de CO_2 en acetil-CoA, se descubrió que el CO_2 se convertía en acetil-CoA confiriendo al menos un tipo de actividad enzimática seleccionada del grupo que consiste en malato tioquinasa, malil-CoA liasa, glioxilato carboligasa, 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa e hidroxipiruvato reductasa, a un microorganismo que no tiene ninguno de:

(a) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de malonil-CoA en malonato semialdehído o 3-hidroxi-3-oxopropionato;

(b) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de acetil-CoA y CO_2 a piruvato;

(c) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de crotonil-CoA y CO_2 a etilmalonil-CoA o glutaconil-CoA;

(d) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de CO_2 a formiato; donde el microorganismo no tiene ninguna actividad malato tioquinasa y malil-CoA liasa endógena.

Además, usando el microorganismo productor de acetil-CoA que convierte CO_2 en acetil-CoA, o confiriendo adicionalmente una actividad enzimática predeterminada al microorganismo, se producen de forma eficaz sustancias que incluyen acetil-CoA y metabolitos útiles derivados de acetil-CoA tales como alcohol isopropílico, etanol, acetona, ácido cítrico, ácido itacónico, ácido acético, ácido butírico, (poli)ácido 3-hidroxi-3-oxobutírico, ácido 3-hidroxiisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-hidroxiisobutírico, ácido metacrílico, (poli)ácido glutámico, ácido glutámico, arginina, ornitina, citrulina, leucina, isoleucina o prolina.

La invención propone el ciclo de producción de acetil-CoA más simple y práctico que fija CO_2 y lo convierte en acetil-CoA (Fig. 1).

Las realizaciones preferibles del ciclo de producción de acetil-CoA de acuerdo con la invención incluyen el ciclo de producción de acetil-CoA mostrado en la Fig. 1 (a partir de ahora en este documento puede mencionarse como "ciclo de la Fig. 1").

El ciclo implica de 8 a 10 tipos de enzimas, es decir, al menos una seleccionada del grupo de:

5 fosfoenolpiruvato carboxilasa;
 fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, y
 piruvato carboxilasa y piruvato quinasa;
 malato deshidrogenasa;
 malato tioquinasa;
 10 malil-CoA liasa;
 glioxilato carboligasa;
 al menos una seleccionada del grupo que consiste en:

15 hidroxipiruvato isomerasa e hidroxipiruvato reductasa; y
 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa;

al menos una seleccionada del grupo que consiste en:

20 glicerato 2-quinasa; y
 fosfoglicerato mutasa y glicerato 3-quinasa; y
 enolasa.

La (fosfoenol)piruvato carboxilasa está implicada en la fijación de dióxido de carbono. La (fosfoenol)piruvato carboxilasa es una enzima fijadora de dióxido de carbono que tiene alta actividad. Por ejemplo, la RubisCO usada en la fotosíntesis en plantas o similares se sabe que tiene una actividad específica de aproximadamente 3 U/mg a 20 U/mg (J. Biol. Chem. 274(8) 5078-82(1999), Anal. Biochem. 153(1) 97-101, 1986). Por otro lado, se ha informado de que la (fosfoenol)piruvato carboxilasa tiene una actividad específica de 30 U/mg en *Escherichia coli*, o tan alta como 100 U/mg a 150 U/mg (J. Biol. Chem. 247, 5785-5792 (1972); Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 140-142 (1995); Biochim Biophys Acta. 1475(3):191-206, 2000). En términos de malato tioquinasa (mtk) que sintetiza malil-CoA, el presente estudio reveló que la malato tioquinasa de acuerdo con la invención tiene una actividad mayor en comparación con la de las enzimas convencionalmente conocidas (J. Biol. Chem. 248(21) 7295-303, 1973). El ciclo de la Fig. 1 está compuesto por 8 a 10 tipos de enzimas y, por lo tanto, el ciclo más simple entre los ciclos de producción de acetil-CoA conocidos. Es necesario conferir solamente una pequeña cantidad de enzimas al microorganismo. Además, el ciclo de la Fig. 1 no incluye una enzima que consume acetil-CoA. Por lo tanto, puede decirse que el ciclo de la Fig. 1 es un ciclo ideal para fijar CO₂ y convertirlo en acetil-CoA.

Otra ventaja del ciclo de la Fig. 1 es que, como el ciclo es independiente de las rutas glucolíticas, el ciclo puede combinarse libremente con diversas rutas glucolíticas. Por ejemplo, el ciclo de la Fig. 1 puede combinarse fácilmente, que produce NADPH con una alta tasa de producción y se usa a menudo en la producción de sustancias (publicación japonesa en fase nacional (JP-A) n.º 2007-510411), ya que el ciclo de la Fig. 1 es independiente de la ruta de pentosa fosfato.

En el ciclo de la Fig. 1, cada una de malato deshidrogenasa (mdh), 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa (glxR), e hidroxipiruvato reductasa (ycdW) consume NADH (o NADPH) como energía de reducción; cada una de malato tioquinasa (mtk), glicerato 3-quinasa (glxK), glicerato 2-quinasa (garK), y piruvato carboxilasa (pyc) consume ATP; y la piruvato quinasa (pyk) produce piruvato.

En un caso en que se usa fosfoenolpiruvato como sustancia de partida, la ecuación equilibrada para el ciclo de la Fig. 1 es: "fosfoenolpiruvato + 2CoA + CO₂ + 3NAD(P)H + 3ATP → 2acetil-CoA + 3NAD(P)⁺ + 3ADP".

En un caso en que usa piruvato como sustancia de partida, la ecuación equilibrada es: piruvato + 2CoA + CO₂ + 3NAD(P)H + 4ATP → 2acetil-CoA + 3NAD(P)⁺ + 4ADP".

Es decir, el ciclo de la Fig. 1 requiere suplementación de fosfoenolpiruvato (o piruvato), NAD(P)H, y ATP para fijar CO₂ y convertirlo en acetil-CoA.

Entre las rutas de fermentación que producen acetil-CoA como intermedio, las ecuaciones equilibradas de las rutas que consumen oxígeno durante la fermentación se enumeran en la Tabla 1. Se asume que, en estas rutas de fermentación, se produce una coenzima reducida tal como NADH durante la ruta y la coenzima reducida se convierte en la forma oxidada por la acción de oxígeno. Por lo tanto, si es posible consumir la coenzima reducida producida por el ciclo de la Fig. 1 en lugar de consumir oxígeno, puede esperarse que la energía de reducción generada en la fermentación pudiera usarse de forma eficaz en los ciclos de producción de acetil-CoA para fijar CO₂ y convertirlo en productos.

Aquí, la coenzima reducida se refiere a una coenzima en estado reducido e implicada en una reacción de oxidación-reducción, y ejemplos de la misma incluyen NADH, NADPH, FADH₂, FMNH₂, y una coenzima quinona reducida. La

coenzima reducida es preferiblemente NADH o NADPH, más preferiblemente NADH. La coenzima oxidada se refiere a la forma oxidada de una coenzima reducida, y ejemplos de la misma incluyen NAD^+ , NADP^+ , FAD, FMN, y una coenzima quinona oxidada. La coenzima oxidada es preferiblemente NAD^+ o NADP^+ , más preferiblemente NAD^+ .

5

Tabla 1

Nombre del compuesto	Ecuación de fermentación
Alcohol isopropílico	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{H}_2\text{O} + 3/2\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_3\text{H}_8\text{O} + 3\text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$
Acetona	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_3\text{H}_6\text{O} + 3\text{H}_2\text{O} + 3\text{CO}_2$
Ácido glutámico	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3/2\text{O}_2 + \text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$
Glutamina	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3/2\text{O}_2 + 2\text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{CO}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$
Arginina	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 1/2\text{O}_2 + 4\text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 + 5\text{H}_2\text{O}$
Ornitina	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 1/2\text{O}_2 + \text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$
Citrulina	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 1/2\text{O}_2 + 3\text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3 + 4\text{H}_2\text{O}$
Prolina	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 1/2\text{O}_2 + \text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2 + 3\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$
Ácido acético	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
Ácido (poli-)3-hidroxibutírico	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3/2\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3 + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
Ácido itacónico	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 1/2\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_5\text{H}_6\text{O}_4 + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$
Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3/2\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 + 2\text{H}_2\text{O}$
Ácido butírico	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 3\text{CO}_2$
Leucina (Isoleucina)	$3/2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3/2\text{O}_2 + \text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2 + 4\text{H}_2\text{O} + 3\text{CO}_2$
Ácido 4-aminobutírico	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3/2\text{O}_2 + \text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2 + 3\text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2$
Ácido 4-hidroxibutírico	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3/2\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2$

Como se muestra en la Tabla 1, la fermentación en que está presente oxígeno en el lado izquierdo de la ecuación de fermentación a menudo requiere una gran cantidad de oxígeno. En dichos casos, puede requerirse aireación extensiva y/o agitación vigorosa, que provoca aumento en los costes del equipo y los costes de energía eléctrica. Por lo tanto, introduciendo el ciclo de la Fig. 1, puede consumirse el exceso de energía de reducción y puede moderarse la aireación/agitación excesiva, y puede esperarse que se reduzca el coste de la producción fermentativa.

Para suministrar la energía de reducción al ciclo de acuerdo con la invención, la energía de reducción puede proporcionarse añadiendo una sustancia que puede generar una energía de reducción, o conferir energías desde el exterior. Ejemplos específicos de lo mismo incluyen usar una sustancia que tiene un alto grado de reducción (por ejemplo, hidrógeno, sulfito, alcoholes o parafina) como sustrato; suministrar energías de reducción directamente por cultivo eléctrico; y suministrar una energía de reducción por una reacción fotoquímica en un organismo. Diferente a la fermentación mostrada en la Tabla 1, siempre que la energía de reducción pueda suministrarse desde el exterior, es posible dirigir la ruta de fijación de dióxido de carbono pretendida incluso en fermentación en que no se produce una coenzima reducida.

Los aspectos de la presente invención se describen a continuación.

La "fijación de CO_2 " en la invención se refiere a la conversión de CO_2 generado en el metabolismo de carbohidratos o CO_2 suministrado desde el exterior en un compuesto orgánico. El CO_2 puede ser HCO_3^- . Aquí, "fijación de CO_2 " también puede mencionarse como "fijación de dióxido de carbono".

El término "proceso" en la presente memoria descriptiva abarca un proceso independiente, así como un proceso que obtiene un efecto pretendido del proceso, aunque no puede distinguirse claramente de otro proceso. En la presente memoria descriptiva, un intervalo numérico indicado usando "a" significa un intervalo que incluye valores numéricos dados antes y después de "a" como un valor mínimo y un valor máximo, respectivamente.

En la invención, en la referencia a la cantidad de cada ingrediente en la composición, cuando la composición incluye múltiples sustancias correspondientes a cada ingrediente, la cantidad de cada ingrediente significa la cantidad total de las múltiples sustancias salvo que se especifique de otro modo.

Como se usa en este documento, el término "inactivación" se refiere a una condición en que la actividad de la enzima (aquí, un factor que no muestra actividad enzimática por sí mismo y también se incluye el alcance de "enzima", salvo que se indique específicamente excluido) medida por cualquier sistema existente de medición es no mayor de 1/10 de la actividad en el microorganismo antes de la inactivación, asumiendo que la actividad en el microorganismo antes de la inactivación es 100.

La "reducción" de una actividad enzimática en la invención significa una condición en que la actividad de la enzima se reduce significativamente por una técnica de recombinación genética para un gen que codifica la enzima en comparación con antes de dicho tratamiento.

La "potenciación" de una "actividad" en la invención significa ampliamente que una actividad enzimática en los microorganismos se vuelve mayor después de la potenciación en comparación con la actividad enzimática antes de la potenciación.

5 Los métodos para la potenciación no están particularmente restringidos siempre que la actividad de una enzima poseída por los microorganismos esté potenciada. Ejemplos de los mismos incluyen potenciación por un gen de enzima introducido desde el exterior de la célula, potenciación por expresión aumentada de un gen de enzima dentro de la célula o cualquier combinación de los mismos.

10 Ejemplos específicos de potenciación por un gen de enzima introducido desde el exterior de la célula incluyen: introducir un gen que codifica una enzima activa que tiene una actividad mayor que la enzima del hospedador desde el exterior de la célula del microorganismo hospedador por la técnica de recombinación genética, añadiendo de ese modo la actividad enzimática del gen de enzima introducido; sustituir la actividad enzimática introducida por una actividad enzimática intrínseca que el hospedador posee originalmente; aumentar el número de copias de un gen de enzima del hospedador o un gen de enzima introducido desde el exterior de la célula a dos o más; y cualquier combinación de los mismos.

15 Ejemplos específicos de potenciación por expresión aumentada de un gen de enzima en el microorganismo incluyen: introducir una secuencia de bases que potencie la expresión de un gen de enzima desde el exterior del microorganismo hospedador al interior del microorganismo; sustituir otro promotor por el promotor de un gen de enzima que el microorganismo hospedador posee en su genoma, potenciando de ese modo la expresión del gen de enzima; y cualquier combinación de los mismos.

20 "Conferir" una "actividad" en la invención significa ampliamente proporcionar la actividad de una enzima pretendida introduciendo, desde el exterior, un gen que codifica la enzima en un organismo que no posee un gen que codifica la enzima pretendida. El método de conferir una actividad no está particularmente limitado siempre que la actividad de una enzima pretendida puede conferirse a un microorganismo, y ejemplos del mismo incluyen transformación un plásmido que alberga un gen de enzima, introducción de un gen de enzima en el genoma, y cualquier combinación de los mismos.

25 El promotor a usarse para "potenciar" o "conferir" una "actividad" no está particularmente limitado siempre que el promotor permita la expresión génica, y ejemplos del mismo incluyen promotores constitutivos y promotores inducibles.

30 Si el microorganismo tiene el gen de enzima pretendido o no, puede determinarse, con referencia a, por ejemplo, la información génica de cepas respectivas registradas en KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>) o NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). En la invención, solamente se usa la información génica de las cepas respectivas registradas en KEGG o NCBI.

35 En la invención, la actividad enzimática puede conferirse introduciendo, desde el exterior, un gen que codifica la enzima en la célula usando la técnica de recombinación genética. En este caso, el gen de enzima ha introducirse puede ser homólogo o heterólogo a la célula hospedadora.

40 Los métodos para la preparación de un ADN genómico necesario para introducir un gen desde el exterior a la célula en la célula, la escisión y ligamiento del ADN, la transformación, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), el diseño y síntesis de oligonucleótidos a usarse como cebadores, etc., puede realizarse por métodos habituales bien conocidos para los expertos en la materia. Estos métodos se describen en Sambrook, J., et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Segunda Edición", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), etc.

45 La expresión "por la técnica de recombinación genética" en la invención abarca cualquier alternación a la secuencia de bases causada por la inserción de otro ADN en la secuencia de bases de un gen nativo, sustitución o delección de un cierto sitio de un gen, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, la alternación puede resultar de una mutación.

50 En la invención, el microorganismo en que la actividad de un factor o enzima se inactiva se refiere a un microorganismo en que la actividad nativa está alterada por un cierto método aplicado desde el exterior de la célula al interior de la célula. Dicho microorganismo puede generarse por, por ejemplo, alteración de un gen que codifica la proteína o enzima (alteración génica).

55 Ejemplos de la alteración génica en la invención incluyen introducción de una mutación en la secuencia de bases de un gen, inserción de otro ADN en la secuencia de bases o delección de una cierta parte de un gen, que se realizan con el propósito de evitar que se realice la función del gen. Como resultado de la alteración génica, por ejemplo, el gen se vuelve incapaz de transcribirse en ARNm, y el gen estructural deja de traducirse. Como alternativa, debido al carácter incompleto del ARNm transcrito, la secuencia de aminoácidos de la proteína estructural traducida, se muta o deleciona y, por lo tanto, las funciones intrínsecas de la proteína estructural se hacen incapaces de lograr.

La variante de alteración génica puede prepararse usando cualquier método siempre que pueda obtenerse una variante de alteración en que la enzima o proteína diana no se exprese. Se ha informado de diversos métodos para alteración génica (cruce natural, adición de un mutágeno, irradiación UV, irradiación por radiación, mutagénesis aleatoria, transposones, alteración génica dirigida al sitio). En vista de la alteración de un gen específico, es preferible la alteración génica por recombinación homóloga. Los métodos de alteración génica por recombinación homóloga se describen en J. Bacteriol., 161, 1219-1221 (1985), J. Bacteriol., 177, 1511-1519 (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 97, 6640-6645 (2000), y similares, y los expertos en la materia pueden realizar fácilmente recombinación homóloga usando estos métodos o aplicando estos métodos.

El "hospedador" en la invención significa un microorganismo en un estado que el efecto de la invención puede ejercerse como resultado de la introducción de uno o más genes desde el exterior del microorganismo.

Más específicamente, el "hospedador" en la invención significa un microorganismo que puede hacerse que posea la capacidad de producir acetil-CoA desde un material de fuente de carbono usando ciertos medios, independientemente de si el microorganismo tiene de forma intrínseca o no la capacidad innata de producir acetil-CoA a partir de un material de fuente de carbono.

El "hospedador" en la invención puede tener una ruta para producir un metabolito útil. El "metabolito útil" en la invención se usa como nombre genérico para metabolitos principales en las rutas metabólicas de microorganismos, tales como alcoholes, aminoácidos, ácidos orgánicos y terpenos. El microorganismo puede ser cualquier microorganismo siempre que pueda hacerse que posea la capacidad de producir un metabolito útil usando cualquier medio, independientemente de si el microorganismo tiene de forma intrínseca o no la capacidad innata de producir el metabolito útil.

El "metabolito útil derivado de acetil-CoA" en la invención se refiere a cualquiera de los diversos metabolitos producidos mediante acetil-CoA en rutas metabólicas. Ejemplos de los mismos incluyen alcoholes tales como alcohol isopropílico, etanol o butanol; aminoácidos tales como ácido L-glutámico, ácido L-glutámico, L-arginina, L-ornitina, L-citrulina, L-leucina, o L-prolina; ácidos orgánicos tales como ácido 3-hidroxi-butírico, ácido poli-3-hidroxi-butírico, ácido poliglutámico, ácido 3-hidroxiisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-hidroxiisobutírico, ácido metacrílico, ácido cítrico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido caproico, o ácido mevalónico; y terpenos tales como isopreno, escualeno, esteroide, o carotenoide. Otros ejemplos de los mismos incluyen acetona. El microorganismo puede ser cualquier microorganismo siempre que pueda hacerse que posea la capacidad de producir un metabolito útil derivado de acetil-CoA usando un cierto medio, independientemente de si el microorganismo tiene de forma intrínseca o no la capacidad innata de producir el metabolito útil derivado de acetil-CoA.

La "producción de acetil-CoA" en la invención se refiere a la conversión de cualquier sustancia en acetil-CoA en una ruta metabólica. Como el acetil-CoA es un intermedio metabólico y se convierte rápidamente en diversas sustancias en rutas metabólicas, la cantidad aparente de acetil-CoA no aumenta necesariamente. Sin embargo, el efecto puede confirmarse indirectamente por detección de un marcador derivado de CO₂ en una sustancia derivada de acetil-CoA, por un aumento en el rendimiento de una sustancia derivada de acetil-CoA respecto al consumo de azúcar o similares. Como varios factores (por ejemplo, la cantidad de una coenzima, la cantidad de un sustrato o un cambio en el metabolismo causado por una inhibición por retroalimentación) están implicados en la conversión, la cantidad de producción de acetil-CoA no siempre es proporcional a la cantidad de cada una de las sustancias derivadas de acetil-CoA. Sin embargo, en un caso en que una ruta para producir una sustancia específica a partir de acetil-CoA está potenciada o un caso en que dicha ruta está potenciada de forma intrínseca (por ejemplo, en el caso de un microorganismo productor de alcohol isopropílico o un microorganismo productor de glutamato descrito a continuación), la eficacia de conversión a partir de acetil-CoA está poco afectada por factores externos y, por lo tanto, la eficacia de producción de la sustancia específica puede considerarse como un índice de la eficacia de producción de acetil-CoA.

El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con la invención incluye un ciclo de producción de acetil-CoA obtenido confiriendo a menos un tipo de actividad enzimática seleccionada del grupo que consiste en malato tioquinasa, malil-CoA liase, glioxilato carboligasa, 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa, e hidroxipiruvato reductasa, a un microorganismo que no tiene ninguno de:

- (a) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de malonil-CoA a malonato semialdehído o 3-hidroxi-propionato;
- (b) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de acetil-CoA y CO₂ a piruvato;
- (c) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de crotonil-CoA y CO₂ a etilmalonil-CoA o glutaconil-CoA;
- (d) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de CO₂ a formiato; donde el microorganismo no tiene ninguna actividad malato tioquinasa y malil-CoA liasa endógena.

En vista de la eficacia de producción de acetil-CoA, el microorganismo productor de acetil-CoA se confiere preferiblemente con las actividades enzimáticas de malato tioquinasa y malil-CoA liasa, más preferiblemente se

confiere con las actividades enzimáticas de malato tioquinasa, malil-CoA liasa y glioxilato carboligasa, aún más preferiblemente se confiere con las actividades enzimáticas de malato tioquinasa, malil-CoA liasa, glioxilato carboligasa y 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa y/o hidroxipiruvato reductasa.

5 La expresión "no tiene (de forma natural)" en este documento significa que el microorganismo hospedador no posee de forma intrínseca un atributo en la naturaleza.

Aquí, el "ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de malonil-CoA a malonato semialdehído o 3-hidroxipropionato" se refiere a los siguientes ciclos (1) a (7):

- 10 (1) el ciclo mostrado en la Fig. 1 del documento WO 2011/099006, en que se convierte acetil-CoA en malonil-CoA, 3-hidroxipropionato, propionil-CoA, malato y malil-CoA, que se convierten de nuevo en acetil-CoA;
- (2) el ciclo mostrado en la Fig. 4A del documento WO 2011/099006, en que se convierte acetil-CoA en malonil-CoA, malonato semialdehído, β -alanina, malato, y malil-CoA, que se convierten de nuevo en acetil-CoA;
- 15 (3) el ciclo mostrado en la Fig. 4B, 16, o 18 del documento WO 2011/099006, en que se convierte acetil-CoA en malonil-CoA, hidroxipropionato, (R)-lactato o (S)-lactato, malato, y malil-CoA, que se convierten de nuevo en acetil-CoA;
- (4) el ciclo mostrado en la Fig. 8 del documento WO 2011/099006, en que se convierte acetil-CoA en malonil-CoA, malonato semialdehído o hidroxipropionato, piruvato, malato, y malil-CoA, que se convierten de nuevo en acetil-CoA;
- 20 (5) el ciclo mostrado en la Fig. 9A, 9B, o 9C del documento WO 2011/099006, en que se convierte acetil-CoA en malonil-CoA, hidroxipropionato, 2-cetoglutarato, malato, y malil-CoA, que se convierten de nuevo en acetil-CoA;
- (6) el ciclo mostrado en la Fig. 9D o 9F del documento WO 2011/099006, en que se convierte acetil-CoA en malonil-CoA, hidroxipropionato, metilmalonil-CoA, malato, y malil-CoA, que se convierten de nuevo en acetil-CoA;
- 25 (7) el ciclo mostrado en la Fig. 17 del documento WO 2011/099006, en que se convierte acetil-CoA en malonil-CoA, malonato semialdehído o hidroxipropionato, metilmalonil-CoA, piruvato, oxaloacetato, malato, y malil-CoA, que se convierten de nuevo en acetil-CoA.

30 Todos los ciclos de fijación de dióxido de carbono (1) a (7) descritos anteriormente tienen una reacción enzimática de malonil-CoA a malonato semialdehído o de malonil-CoA a 3-hidroxipropionato. Este tipo de reacción está catalizada por malonato semialdehído deshidrogenasa o malonil-CoA reductasa (documento WO 2011/099006). Se cree que la reacción de reducción de ácido carboxílico o un (tio)éster del mismo, tal como reducción de succinil-CoA o reducción de malonil-CoA, es generalmente difícil de realizar como reacciones enzimáticas y deben evitarse como rutas de fermentación en lo posible (Atsumi et al., *Nature*, 451,(3), 86-89, 2008; Yim et al., *Nat. Chem. Biol.*, 7, 445-452, 2011).

El "ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de acetil-CoA y CO₂ a piruvato" en la presente memoria descriptiva se refiere a los siguientes ciclos (8) a (10):

- 40 (8) el ciclo mostrado en la Fig. 1 del documento WO 2011/099006, en que se convierte acetil-CoA en piruvato, fosfoenolpiruvato, oxaloacetato, malato, y malil-CoA, que se convierten de nuevo en acetil-CoA;
- (9) el ciclo mostrado en la Fig. 7C, 7D o 7E del documento WO 2011/099006, en que se convierte acetil-CoA en piruvato, malato, y malil-CoA, que se convierten de nuevo en acetil-CoA; y
- 45 (10) el ciclo mostrado en la Fig. 9M del documento WO 2011/099006, en que se convierte acetil-CoA en piruvato, 2-cetoglutarato, malato, y malil-CoA, que se convierten de nuevo en acetil-CoA.

50 Todos los ciclos de fijación de dióxido de carbono (8) a (10) tienen una reacción enzimática que convierte acetil-CoA y CO₂ en piruvato. Esta reacción se cataliza por la piruvato sintasa (documento WO 2011/099006). La reacción sintética de piruvato por la piruvato sintasa requiere una fuerte energía de reducción de ferredoxina y procede lentamente, y procede solamente en condiciones estrictamente anaeróbicas porque la reacción es sensible a oxígeno.

55 El "ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de crotonil-CoA y CO₂ a etilmalonil-CoA o glutaconil-CoA" en la presente memoria descriptiva se refiere al ciclo mostrado en la Fig. 9H o 9J del documento WO 2011/099006, en que se convierte acetil-CoA en crotonil-CoA, etilmalonil-CoA o glutaconil-CoA, oxaloacetato, malato y malil-CoA, que se convierten de nuevo en acetil-CoA.

60 La conversión de crotonil-CoA y CO₂ en etilmalonil-CoA o glutaconil-CoA se cataliza por la crotonil-CoA carboxilasa-reductasa o metilcrotonil-CoA carboxilasa. Como el valor de Km de la crotonil-CoA carboxilasa-reductasa para carbonatos es alto (14 mM; PNAS 104(25) 10631-10636, 2007), no puede esperarse actividad suficiente a baja concentración de sustrato. El crotonil-CoA, que es un sustrato de la crotonil-CoA carboxilasa-reductasa, se produce a partir de 3-hidroxibutiril-CoA por una reacción de deshidratación. En general, una enzima implicada en la reacción de deshidratación cataliza predominantemente la reacción inversa (es decir, reacción de hidratación) en un entorno acuoso. Por lo tanto, no puede esperarse una tasa de producción suficientemente alta de crotonil-CoA. Además, la actividad específica informada de la metilcrotonil-CoA carboxilasa no es tan alta (0,2 U/mg a 0,6 U/mg; Arch

Biochem Biophys. 310(1) 64-75, 1994) y no puede esperarse una tasa de producción suficientemente alta de crotonil-CoA como sustrato por la misma razón.

5 El "ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de CO₂ a formiato" en la presente memoria descriptiva se refiere al ciclo mostrado en las Fig. 5, 6, 13 o 14 del documento WO 2009/046929, es decir, un ciclo que tiene una ruta en que la reacción procede desde CO₂ a través de formiato y serina, y se convierte oxaloacetato en malato, malil-CoA y glicerato, que se convierten de nuevo en oxaloacetato.

10 La reacción enzimática de CO₂ en formiato requiere una fuerte energía de reducción, procede lentamente y procede solamente en condiciones estrictamente anaeróbicas porque la reacción es sensible a oxígeno.

15 En la presente memoria descriptiva, "no muestra ninguna de las funciones" del ciclo de fijación de dióxido de carbono "aunque conferidas" significa que el ciclo de fijación de dióxido de carbono no muestra función incluso cuando la actividad de la enzima pretendida está conferida por la introducción de un gen que codifica la enzima que tiene la actividad que se introduce en un microorganismo que no posee el gen que codifica la enzima pretendida. El hecho de que "el ciclo de fijación de dióxido de carbono no funciona" puede confirmarse indirectamente, por ejemplo, mediante la no detección de un marcador derivado de CO₂ en un metabolito en el ciclo o una sustancia derivada del metabolito en un ensayo usando un CO₂ marcado, o mediante la ausencia de aumento en el rendimiento de una sustancia derivada de un metabolito en el ciclo respecto al consumo de azúcar.

20 El ciclo de producción de acetil-CoA a construirse en el microorganismo productor de acetil-CoA incluye malato tioquinasa, malil-CoA liasa, hidroxipiruvato reductasa, glioxilato carboligasa o 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa. Un ejemplo del ciclo de producción de acetil-CoA se muestra en la Fig. 1. El ciclo de producción de acetil-CoA no incluye una enzima que consume acetil-CoA, tal como acetil-CoA carboxilasa o piruvato sintasa.

25 En el ciclo de producción de acetil-CoA de la Fig. 1, primero se une el dióxido de carbón a fosfoenol piruvato o piruvato por la acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc), piruvato carboxilasa (pyc) o fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (pck), y se convierte en oxaloacetato. El oxaloacetato se convierte en malato por la acción de la malato deshidrogenasa (mdh). El malato se convierte en malil-CoA (malato-CoA) por la acción de la malato tioquinasa (mtk). La malil-CoA (malato-CoA) se convierte en acetil-CoA y glioxilato por la acción de la malil-CoA liase (Mcl). El glioxilato se convierte en 2-hidroxi-3-oxopropionato por la acción de la glioxilato carboligasa (gcl). El 3-hidroxi-2-oxopropionato se convierte en glicerato por la acción de la 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa (glxR) o, como alternativa, se convierte en hidroxipiruvato por la acción de hidroxipiruvato isomerasa (hyi) y después en glicerato por la acción de la hidroxipiruvato reductasa (ycdW). El glicerato se convierte 3-fosfoglicerato por la acción de la glicerato 3-quinasa (glxK) o se convierte en 2-fosfoglicerato por la acción de la glicerato 2-quinasa (garK). El 3-fosfoglicerato se convierte en 2-fosfoglicerato por la acción de la fosfoglicerato mutasa (gpm). El 2-fosfoglicerato se convierte en fosfoenolpiruvato por la acción de la enolasa (eno). En un caso en que se incluye la piruvato carboxilasa en el ciclo, el fosfoenolpiruvato se convierte en piruvato por la acción de la piruvato quinasa (pyk).

40 La actividad enzimática a conferir al microorganismo productor de acetil-CoA no está particularmente limitada siempre que el ciclo de producción de acetil-CoA pueda construirse de forma funcional por la misma, y puede seleccionarse apropiadamente dentro del alcance descrito en la presente memoria descriptiva dependiendo del microorganismo hospedador.

45 En un microorganismo en que no puede formarse un ciclo cerrado con ninguna de las rutas en la Fig. 1 a causa de la ausencia parcial de las enzimas en el ciclo de la Fig. 1, la enzima o enzimas perdidas tienen que suministrarse. Por ejemplo, entre bacterias *Escherichia*, *Escherichia coli* no posee malato tioquinasa y malil-CoA liasa, de modo que tienen que conferirse al menos estas dos enzimas.

50 Las bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis* no poseen malato tioquinasa, malil-CoA liasa y glioxilato carboligasa, de modo que tienen que conferirse al menos la malato tioquinasa, malil-CoA liasa y glioxilato carboligasa.

55 Entre las bacterias corineformes, por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum* no posee malato tioquinasa, malil-CoA liase, glioxilato carboligasa, 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa, e hidroxipiruvato reductasa, de modo que necesitan conferirse al menos la malato tioquinasa, malil-CoA liase, glioxilato carboligasa, y 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa, y/o hidroxipiruvato reductasa.

60 La enzima que consume acetil-CoA como se ha descrito anteriormente, se refiere a una enzima, diferente de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y piruvato carboxilasa usada en el ciclo de acuerdo con la invención que usa acetil-CoA como sustrato y cataliza la conversión de acetil-CoA en otra sustancia. Ejemplos de la misma incluyen acetil-CoA carboxilasa, que se clasifica como el número de código de enzima: 6.4.1.2 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.) y cataliza una reacción de conversión de acetil-CoA en malonil-CoA; y la piruvato sintasa, que se clasifica como el número de código de enzima: 1.2.7.1 y cataliza una reacción de conversión de acetil-CoA en piruvato.

65

El ciclo que incluye una enzima que consume acetil-CoA como se ha descrito anteriormente se refiere a un ciclo cerrado en que se convierte acetil-CoA, a través del ciclo en acetil-CoA de nuevo por la acción de una enzima que consume acetil-CoA. En un caso en que una sustancia producida por la reacción de conversión de una enzima que consume acetil-CoA se convierta adicionalmente en otro producto sin convertirse en acetil-CoA de nuevo (por ejemplo, en un caso en que la sustancia se convierte a través de una ruta de producción de alcohol isopropílico en el producto final, alcohol isopropílico), el ciclo no está cerrado y, por lo tanto, el ciclo se excluye del "ciclo que incluye una enzima que consume acetil-CoA".

El ciclo cerrado se refiere a una ruta que parte de una sustancia arbitraria en el ciclo, en que la sustancia se convierte mediante el ciclo en otra sustancia y, finalmente, se convierte en la misma sustancia que la sustancia inicial.

La malato tioquinasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 6.2.1.9 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de unión de malato a CoA y convierte el malato en malil-CoA. En esta reacción, se consume una molécula de ATP y se produce una molécula de ADP y una molécula de fosfato. La malato tioquinasa tiene una subunidad grande de aproximadamente 400 aminoácidos y una subunidad pequeña de 300 aminoácidos. En el gen, la subunidad grande habitualmente va seguida por la subunidad pequeña. Aquí, por conveniencia, la subunidad grande se menciona como mtkB, y la subunidad pequeña se menciona como mtkA. Se informa de que la actividad específica de la malato tioquinasa purificada es, por ejemplo, 2,5 U/mg (Anal Biochem. 227(2), 363-367, 1995).

La malato tioquinasa se encuentra principalmente en una ruta de asimilación para fuentes de carbono C1 tales como metano (J. Bacteriol. 176(23), 7398-7404, 1994) y la ruta de 3-hidroxiacetil-CoA (Arch. Microbiol., 151, 252-256, 1989), y se caracteriza porque está presente la malil-CoA liasa en sus cercanías en el genoma. Dicha enzima puede usarse adecuadamente. Un ejemplo de evaluación de la actividad de una malato tioquinasa purificada se conoce en malato tioquinasa derivada de *Methylobacterium extorquens*, pero existen solamente unos pocos ejemplos de comparación de una actividad con una secuencia real. El único ejemplo de evaluación de una actividad junto con una secuencia se conoce en una enzima derivada de *Methylobacterium extorquens* AM1 (números de acceso a GenBank AAA62654 y AAA62655) (J. Bacteriol. 176(23), 7398-7404, 1994). En este documento, se clonó el gen de la malato tioquinasa y el gen clonado se introdujo en la misma cepa de *Methylobacterium extorquens* para evaluar la actividad. Sin embargo, cuando los presentes inventores sintetizaron realmente la secuencia y la evaluaron, no pudo detectarse ninguna actividad. En vista de esto, se comparó la secuencia de AAA62655 con la secuencia de la malato tioquinasa derivada de *Methylobacterium extorquens* recién adquirida en la invención (SEQ ID NO: 70). Como resultado, se descubrió que AAA62655 tiene una delección grande (36 aminoácidos) en el extremo carboxi, y es anormalmente corta en comparación con secuencias de otras malato tioquinasas (por ejemplo, en la Fig. 3). Por lo tanto, se cree que se describe una secuencia de tipo inactivo incorrecta en la bibliografía anterior.

Esta invención es, de hecho, un primer ejemplo presentado en que la malato tioquinasa realmente se clona y se expresa por un microorganismo de otra especie, y la actividad está correlacionada con la secuencia.

Ejemplos de malato tioquinasa incluyen aquellos derivados de *Methylobacterium* tales como *Methylobacterium extorquens* (SEQ ID NO: 70 y 71), los derivados de *Hyphomicrobium* tales como *Hyphomicrobium methylovorum* o *Hyphomicrobium denitrificans*, los derivados de *Rhizobium* tales como *Rhizobium* sp. NGR234, los derivados de *Granulibacter* tales como *Granulibacter bethesdensis* (SEQ ID NO: 107 y 108), los derivados de *Nitrosomonas* tales como *Nitrosomonas europaea*, los derivados de *Methylococcus* tales como *Methylococcus capsulatus*, y los derivados de Gammaproteobacterias.

En vista de la eficacia de producción de sustancias útiles producidas a través de acetil-CoA, ejemplos específicos de la secuencia preferible de aminoácidos incluyen las secuencias de aminoácidos derivadas de *Hyphomicrobium* (SEQ ID NO: 73, 74, 110, y 111), secuencias de aminoácidos derivadas de *Rhizobium* (SEQ ID NO: 75 y 76), secuencia de aminoácidos derivadas de *Nitrosomonas* (SEQ ID NO: 113 y 114), secuencias de aminoácidos derivadas de *Methylococcus* (SEQ ID NO: 116 y 117) y secuencias de aminoácidos derivadas de Gammaproteobacterias (por ejemplo, SEQ ID NO: 118 y 119).

La malato tioquinasa derivada de *Hyphomicrobium* (SEQ ID NO: 73, 74, 110, y 111), la malato tioquinasa derivada de *Rhizobium* (SEQ ID NO: 75 y 76) y la malato tioquinasa derivada de *Nitrosomonas* (SEQ ID NO: 113 y 114) comparten de un 65 % a un 80 % de homología de secuencia entre sí. La malato tioquinasa derivada de *Methylococcus* (SEQ ID NO: 116 y 117) tiene de un 70 % a un 80 % de homología de secuencia con la malato tioquinasa derivada de Gammaproteobacterias (por ejemplo, SEQ ID NO: 118 y 119).

Las malato tioquinasas que tienen al menos un 70 % de homología de secuencia de aminoácidos con cada una de las secuencias de aminoácidos de la malato tioquinasa derivada de *Hyphomicrobium*, la malato tioquinasa derivada de *Rhizobium*, la malato tioquinasa derivada de *Nitrosomonas*, la malato tioquinasa derivada de *Methylococcus* y la malato tioquinasa derivada de Gammaproteobacterias descritas en este documento, y que tienen la actividad malato tioquinasa pueden usarse adecuadamente para la producción de acetil-CoA o la producción de un producto útil derivado de acetil-CoA de acuerdo con la invención.

El resultado de alineación de las malato tioquinasas mostradas en los Ejemplos se muestra en la Fig. 2A y Fig. 2B (MtkB: subunidad grande de mtk; Fig. 2A y Fig. 2B se mencionan de forma colectiva a continuación en este documento como "Fig. 2") y Fig. 3A y Fig. 3B (MtkA: subunidad pequeña de mtk; Fig. 3A y Fig. 3B se mencionan de forma colectiva a continuación en este documento como "Fig. 3"). Como se muestra en la Fig. 2 y Fig. 3, se descubrió que las malato tioquinasas comparten secuencias comunes altamente homólogas sobre la longitud completa, en que están conservados aminoácidos idénticos u homólogos.

Respecto a los aminoácidos, la malato tioquinasa derivada de *Methylobacterium extorquens* (indicada por Me en la Fig. 2 y Fig. 3), y las malato tioquinasas que tienen alta actividad enzimática derivadas de *Rhizobium sp.* (indicadas por Rh en la Fig. 2 y Fig. 3), *Hyphomicrobium methylovorum* (indicadas por Hme en la Fig. 2 y Fig. 3), *Hyphomicrobium denitrificans* (indicadas por Hd en la Fig. 2 y Fig. 3), *Nitrosomonas europaea* (indicadas por Ne en la Fig. 2 y Fig. 3), *Methylococcus capsulatus* (indicadas por Mc en la Fig. 2 y Fig. 3), y Gammaproteobacterias (indicadas por gam en la Fig. 2 y Fig. 3) se clasificaron en 4 grupos compuestos del primer a cuarto grupo descritos a continuación. En la Fig. 2 y Fig. 3 estos grupos se indicaron por 4 tipos de símbolos, ". + # *", respectivamente.

El primer grupo incluye los sitios en que *Rhizobium sp.*, *Hyphomicrobium methylovorum*, *Hyphomicrobium denitrificans*, *Nitrosomonas europaea*, *Methylococcus capsulatus*, y Gammaproteobacterias, que tienen altas actividades enzimáticas, tienen diferentes secuencias de la de *Methylobacterium extorquens*, y se indica por el símbolo "." en la Fig. 2 y Fig. 3. La posición de las secuencias se describe de acuerdo con la posición en la secuencia de aminoácidos de *Methylobacterium extorquens*.

El primer grupo en MtkB (Fig. 2) incluye histidina, prolina o lisina en la posición 18; arginina, ácido glutámico, ácido aspártico o alanina en la posición 21; tirosina o histidina en la posición 26; ácido glutámico, alanina o arginina en la posición 29; arginina o valina en la posición 34; arginina, serina o ácido glutámico en la posición 36; arginina, treonina, valina o glicina en la posición 42; valina en la posición 44; ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, isoleucina o leucina en la posición 66; histidina, lisina o ácido glutámico en la posición 67; ácido aspártico o ácido glutámico en la posición 74; serina, fenilalanina, alanina o ácido glutámico en la posición 75; treonina, lisina o histidina en la posición 80; histidina o prolina en la posición 84; glutamina, alanina, glicina o lisina en la posición 89; leucina o valina en la posición 92; ácido glutámico, alanina o glutamina en la posición 100; metionina, treonina, serina o valina en la posición 102; ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, histidina o serina en la posición 103; isoleucina o prolina en la posición 104; alanina, ácido aspártico, lisina o glutamina en la posición 105; fenilalanina o leucina en la posición 112; isoleucina en la posición 121; metionina, valina o treonina en la posición 122; serina o alanina en la posición 127; serina, alanina, glutamina o ácido glutámico en la posición 128; alanina, serina, treonina, ácido glutámico o arginina en la posición 139; isoleucina en la posición 144; arginina o lisina en la posición 146; glicina o alanina en la posición 166; ácido aspártico, ácido glutámico, lisina o arginina en la posición 170; asparagina, prolina, ácido aspártico o glicina en la posición 171; isoleucina o leucina en la posición 173; glicina, asparagina, prolina o alanina en la posición 175; arginina, lisina, histidina o glutamina en la posición 176; glicina, alanina o arginina en la posición 183; cisteína o isoleucina en la posición 184; tirosina, leucina o lisina en la posición 191; alanina en la posición 193; arginina, ácido glutámico, asparagina o serina en la posición 206; glicina, lisina, asparagina, ácido glutámico o prolina en la posición 207; ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, serina o lisina en la posición 208; ácido glutámico en la posición 231; arginina en la posición 233; lisina, asparagina o leucina en la posición 235; ácido glutámico o isoleucina en la posición 238; treonina, isoleucina o valina en la posición 243; tirosina, alanina o ácido glutámico en la posición 244; glicina en la posición 249; ácido aspártico en la posición 256; asparagina o ácido aspártico en la posición 258; isoleucina, leucina o fenilalanina en la posición 278; lisina o asparagina en la posición 300; treonina, arginina, alanina, ácido glutámico o glutamina en la posición 307; leucina, valina, cisteína o tirosina en la posición 336; glicina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina o arginina en la posición 340; arginina o leucina en la posición 358; alanina o ácido aspártico en la posición 375; ácido aspártico, lisina, ácido glutámico o alanina en la posición 379; y triptófano, alanina, arginina o valina en la posición 385.

El primer grupo en MtkA (Fig. 3) incluye fenilalanina en la posición 16; lisina, arginina, ácido glutámico o glutamina en la posición 19; isoleucina o histidina en la posición 20; arginina o ácido aspártico en la posición 30; glutamina, treonina o serina en la posición 46; alanina, serina, lisina o arginina en la posición 47; leucina o prolina en la posición 49; metionina, arginina o leucina en la posición 51; ácido aspártico o ácido glutámico en la posición 67; alanina o valina en la posición 68; valina o isoleucina en la posición 71; prolina en la posición 74; isoleucina en la posición 90; cisteína, alanina o isoleucina en la posición 93; valina en la posición 94; ácido aspártico, alanina o serina en la posición 119; metionina, serina o cisteína en la posición 121; isoleucina, treonina o leucina en la posición 124; alanina o cisteína en la posición 137; arginina, valina o asparagina en la posición 151; valina en la posición 155; alanina, arginina o lisina en la posición 171; lisina, arginina o valina en la posición 193; metionina, valina o isoleucina en la posición 195; ácido glutámico, glutamina, arginina o lisina en la posición 197; alanina o glicina en la posición 223; leucina o arginina en la posición 224; alanina en la posición 226; metionina en la posición 230; fenilalanina, alanina o ácido glutámico en la posición 259; valina o metionina en la posición 267; ácido glutámico o lisina en la posición 271; alanina, cisteína o leucina en la posición 273; treonina o asparagina en la posición 280; serina o alanina en la posición 282; alanina, lisina, glutamina, glicina o ácido glutámico en la posición 294; y metionina, glutamina, arginina, leucina o histidina en la posición 295.

Las malato tioquinasas que tienen una o más de estas secuencias de aminoácidos son más preferibles en vista de la actividad enzimática.

5 El segundo grupo incluye secuencias comunes características a todos de *Rhizobium sp.*, *Hyphomicrobium methylovorum*, *Hyphomicrobium denitrificans*, *Nitrosomonas europaea*, *Methylococcus capsulatus*, y Gammaproteobacterias, y se indica por el símbolo "+" en la Fig. 2 y Fig. 3. Las posiciones de las secuencias características se describen de acuerdo con las posiciones en la secuencia de aminoácidos de *Hyphomicrobium methylovorum*.

10 El segundo grupo en MtkB (Fig. 2) incluye valina en la posición 43; isoleucina en la posición 120; isoleucina en la posición 143; alanina en la posición 192; ácido glutámico en la posición 230; arginina en la posición 232; glicina en la posición 248; y ácido aspártico en la posición 255.

15 El segundo grupo en MtkA (Fig. 3) incluye fenilalanina en la posición 16; prolina en la posición 74; isoleucina en la posición 90; valina en la posición 94; valina en la posición 155; alanina en la posición 226; y metionina en la posición 230.

20 La región que no tiene homología, es decir, la región diferente a estas secuencias comunes características y las secuencias comunes conservadas entre todas las secuencias, pueden tener una mutación. Las malato tioquinasas que tienen cualquiera de estas secuencias de aminoácidos y son más preferibles, en vista de la actividad enzimática.

25 El tercer grupo incluye secuencias comunes características a *Rhizobium sp.*, *Hyphomicrobium methylovorum*, *Hyphomicrobium denitrificans*, y *Nitrosomonas europaea*, y se indica por el símbolo "#" en la Fig. 2 y Fig. 3. Las posiciones de las secuencias comunes características se describen de acuerdo con las posiciones en la secuencia de aminoácidos de *Hyphomicrobium methylovorum*.

30 El tercer grupo en las MthB (Fig. 2) incluye ácido glutámico en la posición 29; arginina en la posición 34; isoleucina en la posición 68; histidina en la posición 83; leucina en la posición 91; leucina en la posición 95; isoleucina en la posición 103; fenilalanina en la posición 111; ácido aspártico en la posición 141; glicina en la posición 182; cisteína en la posición 183; valina en la posición 252; lisina en la posición 299; valina en la posición 345; ácido glutámico en la posición 354; arginina en la posición 357; y alanina en la posición 374.

35 En tercer grupo en las MtkA (Fig. 3) incluye isoleucina en la posición 20; alanina en la posición 68; cisteína en la posición 93; metionina en la posición 121; leucina en la posición 123; alanina en la posición 137; leucina en la posición 224; alanina en la posición 236; tirosina en la posición 237; isoleucina en la posición 238; ácido glutámico en la posición 261; valina en la posición 267; leucina en la posición 270; lisina en la posición 271; valina en la posición 275; isoleucina en la posición 277; treonina en la posición 280; y serina en la posición 282.

40 La región que no tiene homología, es decir, la región diferente a estas secuencias comunes características y las secuencias comunes conservadas entre todas las secuencias, pueden tener una mutación. Las malato tioquinasas que tienen cualquiera de estas secuencias de aminoácidos son más preferibles en vista de la actividad enzimática.

45 El cuarto grupo incluye secuencias comunes características a *Methylococcus capsulatus* y Gammaproteobacterias, y se indican por el símbolo "*" en la Fig. 2 y Fig. 3. Las posiciones de las secuencias comunes características se describen de acuerdo con las posiciones en la secuencia de aminoácidos de *Methylococcus capsulatus*.

50 El cuarto grupo en las MtkB (Fig. 2) incluye asparagina en la posición 2; tirosina en la posición 15; prolina en la posición 18; tirosina en la posición 26; ácido aspártico en la posición 28; valina en la posición 34; ácido glutámico en la posición 36; isoleucina en la posición 38; glicina en la posición 53; valina en la posición 60; alanina en la posición 63; serina en la posición 65; ácido glutámico en la posición 67; ácido aspártico en la posición 74; metionina en la posición 76; isoleucina en la posición 114; glutamina en la posición 119; treonina en la posición 122; ácido glutámico en la posición 128; ácido glutámico en la posición 132; valina en la posición 136; lisina en la posición 143; valina en la posición 145; ácido glutámico en la posición 147; isoleucina en la posición 153; cisteína en la posición 160; lisina en la posición 162; valina en la posición 163; alanina en la posición 166; isoleucina en la posición 167; leucina en la posición 173; metionina en la posición 174; glutamina en la posición 176; arginina en la posición 179; leucina en la posición 180; metionina en la posición 181; isoleucina en la posición 184; leucina en la posición 194; glutamina en la posición 195; isoleucina en la posición 203; valina en la posición 204; glicina en la posición 205; leucina en la posición 211; fenilalanina en la posición 218; asparagina en la posición 219; leucina en la posición 237; ácido glutámico en la posición 239; ácido glutámico en la posición 240; valina en la posición 245; ácido glutámico en la posición 246; glicina en la posición 249; asparagina en la posición 253; alanina en la posición 256; alanina en la posición 277; histidina en la posición 281; ácido glutámico en la posición 298; lisina en la posición 299; asparagina en la posición 302; cisteína en la posición 304; isoleucina en la posición 306; isoleucina en la posición 330; leucina en la posición 334; glutamina en la posición 336; serina en la posición 340; leucina en la posición 341; fenilalanina en la posición 370; asparagina en la posición 375; ácido aspártico en la posición 377; ácido aspártico en la posición 378; alanina en la posición 381; e isoleucina en la posición 386.

El cuarto grupo en las MtkA (Fig. 3) incluye fenilalanina en la posición 4; valina en la posición 5; asparagina en la posición 6; histidina en la posición 8; serina en la posición 9; valina en la posición 11; isoleucina en la posición 12; histidina en la posición 20; alanina en la posición 28; arginina en la posición 30; treonina en la posición 33; leucina en la posición 56; ácido aspártico en la posición 60; ácido aspártico en la posición 72; valina en la posición 73; isoleucina en la posición 91; arginina en la posición 96; valina en la posición 97; alanina en la posición 102; valina en la posición 107; isoleucina en la posición 111; glutamina en la posición 114; arginina en la posición 117; glicina en la posición 119; ácido aspártico en la posición 121; treonina en la posición 129; prolina en la posición 130; treonina en la posición 134; ácido glutámico en la posición 137; cisteína en la posición 138; lisina en la posición 139; valina en la posición 140; asparagina en la posición 163; ácido glutámico en la posición 168; leucina en la posición 175; treonina en la posición 191; ácido aspártico en la posición 192; valina en la posición 194; treonina en la posición 195; valina en la posición 196; alanina en la posición 199; valina en la posición 210; valina en la posición 221; alanina en la posición 222; alanina en la posición 224; arginina en la posición 225; alanina en la posición 227; ácido glutámico en la posición 260; treonina en la posición 263; alanina en la posición 266; metionina en la posición 268; ácido aspártico en la posición 269; alanina en la posición 270; ácido glutámico en la posición 272; leucina en la posición 274; tirosina en la posición 277; arginina en la posición 280; asparagina en la posición 281; alanina en la posición 283; isoleucina en la posición 285; leucina en la posición 290; arginina en la posición 291; alanina en la posición 292; y ácido glutámico en la posición 295.

La región que no tiene homología, es decir, la región diferente a estas secuencias comunes características y las secuencias comunes conservadas entre todas las secuencias pueden tener una mutación.

Las malato tioquinasas que tiene cualquiera de estas secuencias de aminoácidos son más preferibles en vista de la actividad enzimática.

Como un gen de la malato tioquinasa (mtk), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la malato tioquinasa obtenida de cada uno de los organismos de origen de enzima mencionados anteriormente, o una secuencia de ADN sintética que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen.

Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Methylobacterium* tal como *Methylobacterium extorquens* (SEQ ID NO: 67 y 68), *Hyphomicrobium* tal como *Hyphomicrobium methylovorum* o *Hyphomicrobium denitrificans*, *Rhizobium* tal como *Rhizobium* sp. NGR234, *Granulibacter* tal como *Granulibacter bethesdensis*, *Nitrosomonas* tal como *Nitrosomonas europaea*, *Methylococcus* tal como *Methylococcus capsulatus*, o Gammaproteobacterias.

En vista de la eficacia de producción de acetil-CoA, es preferible un ADN que tenga la secuencia de bases de un gen derivado de *Hyphomicrobium* (SEQ ID NO: 61, 62, 86, y 87), *Rhizobium* (por ejemplo, SEQ ID NO: 63), *Granulibacter* (SEQ ID NO: 81 y 82), *Nitrosomonas* (SEQ ID NO: 91 y 92), *Methylococcus* (SEQ ID NO: 96 y 97), o Gammaproteobacterias (SEQ ID NO: 102 y 103).

En particular, es preferible la secuencia de bases de un gen derivado de *Hyphomicrobium* (SEQ ID NO: 61, 62, 86, y 87), *Rhizobium* cuyo uso de codines está optimizado (por ejemplo, SEQ ID NO: 63), *Nitrosomonas* (SEQ ID NO: 91 y 92), *Methylococcus* (SEQ ID NO: 96 y 97), o Gammaproteobacterias (SEQ ID NO: 102 y 103).

La malil-CoA liasa es una enzima que se clasifica con el número de enzima: 4.1.3.24 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de producción de glioxilato y acetil-CoA a partir de malil-CoA. Ejemplos de malil-CoA liasa incluyen las derivadas de *Methylobacterium* tales como *Methylobacterium extorquens*, *Hyphomicrobium* tales como *Hyphomicrobium methylovorum* o *Hyphomicrobium denitrificans*, *Chloroflexus* tales como *Chloroflexus aurantiacus*, *Nitrosomonas* tales como *Nitrosomonas europaea*, o *Methylococcus* tales como *Methylococcus capsulatus*.

En vista de la eficacia de producción de acetil-CoA, ejemplos específicos de las secuencias de aminoácidos preferibles incluyen una secuencia de aminoácidos derivada de *Methylobacterium* (SEQ ID NO: 69), *Hyphomicrobium* (SEQ ID NO: 72 y 109), *Nitrosomonas* (SEQ ID NO: 112), o *Methylococcus* (SEQ ID NO: 115).

Se informa que la actividad específica de malil-CoA liasa purificada en *Methylobacterium extorquens* es, por ejemplo, de 28,1 U/mg (Biochem. J. 139, 399-405, 1974).

Como gen de la malil-CoA liasa (mcl), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la malil-CoA liasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Methylobacterium* tales como *Methylobacterium extorquens*, *Hyphomicrobium* tales como *Hyphomicrobium methylovorum* o *Hyphomicrobium denitrificans*, o *Chloroflexus* tales como *Chloroflexus aurantiacus*. En vista de la eficacia de producción de acetil-CoA, ejemplos más preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Methylobacterium* y un gen que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de

Hyphomicrobium.

Ejemplos específicos de la secuencia de bases preferible del gen derivado de *Methylobacterium* incluyen la secuencia de bases de un gen derivado de *Methylobacterium extorquens* (SEQ ID NO: 66). Ejemplos específicos de la secuencia de bases preferible de un gen derivado de *Hyphomicrobium* incluyen la secuencia de bases de un gen derivado de *Hyphomicrobium methylovorum* (SEQ ID NO: 60) o *Hyphomicrobium denitrificans* (SEQ ID NO: 85). Ejemplos específicos de la secuencia de bases preferible de un gen derivado de *Nitrosomonas* incluyen la secuencia de bases de un gen derivado de *Nitrosomonas europaea* (SEQ ID NO: 90). Ejemplos específicos de la secuencia de bases preferible del gen derivado de *Methylococcus* incluyen la secuencia de bases de un gen derivado de *Methylococcus capsulatus* (SEQ ID NO: 95).

La acetil-CoA carboxilasa es un nombre general para enzimas que clasifican con el número de código de enzima: 6.4.1.2 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de acetil-CoA y CO₂ en malonil-CoA.

La malonato semialdehído deshidrogenasa se clasifica con el número de código de enzima:

1.2.1.18 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de malonil-CoA en malonato semialdehído.

La malonil-CoA reductasa es un nombre genérico para enzimas que catalizan una reacción de conversión de malonil-CoA en malonato semialdehído o 3-hidroxi propionato.

La crotonil-CoA carboxilasa-reductasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el número de código de enzima: 1.3.1.85 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza la conversión de crotonil-CoA en etilmalonil-CoA.

La metilcrotonil-CoA carboxilasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el número de enzima: 6.4.1.4 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de crotonil-CoA en glutaconil-CoA.

La piruvato sintasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el número de enzima: 1.2.7.1 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de acetil-CoA en piruvato.

Es preferible que, en el microorganismo productor de acetil-CoA, la actividad de al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en lactato deshidrogenasa, malato sintasa y fumarato hidratasa esté inactivada o reducida. Como resultado, puede producirse acetil-CoA de forma más eficaz.

Entre la lactato deshidrogenasa, malato sintasa y fumarato hidratasa mencionadas anteriormente, cada una de las cuales es una enzima diana cuya actividad puede inactivarse o reducirse, la malato sintasa cataliza una reacción de conversión de acetil-CoA y glioxilato en malato. Esta reacción es la reacción inversa de una reacción catalizada por la malato tioquinasa y malil-CoA liasa. Por lo tanto, es preferible inactivar o reducir la actividad de la malato sintasa, ya que la reacción de conversión de acetil-CoA y glioxilato en malato de nuevo puede bloquearse o reducirse y el rendimiento de acetil-CoA se mejora.

Entre la lactato deshidrogenasa, malato sintasa y fumarato hidratasa, cuya actividad puede inactivarse o reducirse, es preferible inactivar la fumarato hidratasa en vista de la eficacia de producción de acetil-CoA. La inactivación de la fumarato hidratasa evita una conversión de malato en otras sustancias incluyendo fumarato y una reducción en la cantidad de malato, y por tanto mejora el rendimiento de acetil-CoA.

La lactato deshidrogenasa (ldhA) es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el número de enzima: 1.1.1.28 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de piruvato en lactato, o la conversión de lactato en piruvato.

La isocitrato liasa (aceA) se clasifica con el número de código de enzima: 4.1.3.1 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y es un nombre genérico para enzimas que catalizan una reacción de conversión de isocitrato en succinato y gliosilato.

La malato sintasa (aceB y glcB) es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el número de código de enzima: 2.3.3.9 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de acetil-CoA y glioxilato en malato y CoA. Dependiendo de los microorganismos, se codifican múltiples isómeros de malato sintasa en el genoma. La mayoría de las cepas de *Escherichia coli* poseen dos genes denominados aceB y glcB, respectivamente, y ambos se describen en la presente memoria descriptiva. Cada uno de *Pantoea ananatis* y *Corynebacterium glutamicum* posee un único tipo de gen correspondiente a aceB o glcB, y el gen se describe de forma colectiva como aceB en la presente memoria

descriptiva, por conveniencia.

La fumarato hidratasa (fum) es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el código de enzima: 4.2.1.2 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de malato en fumarato. Dependiendo de los microorganismos, se codifican múltiples isómeros de fumarato hidratasa en el genoma. Por ejemplo, *Escherichia coli* tiene tres tipos de fumarato hidratasa, fumA, fumB y fumC. *Pantoea ananatis* tiene fumA y fumC, y *Corynebacterium glutamicum* tiene fumC.

La fosfoenolpiruvato carboxilasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el código de enzima: 4.1.1.31 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de fosfoenolpiruvato y dióxido de carbono en oxaloacetato y fosfato. Ejemplos de fosfoenolpiruvato carboxilasa incluyen las derivadas de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*, bacterias *Hyphomicrobium* tales como *Hyphomicrobium methylovorum*, bacterias *Starkeya* tales como *Starkeya novella*, bacterias *Rhodopseudomonas* tales como *Rhodopseudomonas* sp., o bacterias *Streptomyces* tales como *Streptomyces coelicolor*.

Como gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*, bacterias *Hyphomicrobium* tales como *Hyphomicrobium methylovorum*, bacterias *Starkeya* tales como *Starkeya novella*, bacterias *Rhodopseudomonas* tales como *Rhodopseudomonas* sp., o bacterias *Streptomyces* tales como *Streptomyces coelicolor*.

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el código de enzima: 4.1.1.32, el número de código de enzima: 4.1.1.38, o el número de código de enzima: 4.1.1.49 basados en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que catalizan una reacción de conversión de fosfoenolpiruvato y dióxido de carbono en oxaloacetato. Entre los números de código de enzima, las enzimas clasificadas con el número de código de enzima: 4.1.1.32 están implicadas en una reacción de conversión de GDP en GTP; las enzimas clasificadas con el número de código de enzima: 4.1.1.38 están implicadas en una reacción de conversión de fosfato en pirofosfato; y las enzimas clasificadas con el número de código de enzima: 4.1.1.49 están implicadas en una reacción de conversión de ADP en ATP. Ejemplos de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa incluyen las derivadas de bacterias *Actinobacillus* tales como *Actinobacillus succinogenes*, bacterias *Mycobacterium* tales como *Mycobacterium smegmatis*, o bacterias *Trypanosoma* tales como *Trypanosoma brucei*.

Como gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (pck), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un que codifica la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Actinobacillus* tales como *Actinobacillus succinogenes*, bacterias *Mycobacterium* tales como *Mycobacterium smegmatis*, o bacterias *Trypanosoma* tales como *Trypanosoma brucei*.

La piruvato carboxilasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el número de código de enzima: 6.4.1.1 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de piruvato y dióxido de carbono en oxaloacetato. La reacción consume ATP y produce ADP y fosfato. Ejemplos de piruvato carboxilasa incluyen las derivadas de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, o bacterias *Mycobacterium* tales como *Mycobacterium smegmatis*.

Como gen de la piruvato carboxilasa (pyc), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un que codifica la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, o bacterias *Mycobacterium* tales como *Mycobacterium smegmatis*.

La malato deshidrogenasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el número de código de enzima: 1.1.1.37 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que usa NADH como coenzima y cataliza una reacción de producción de malato a partir de oxaloacetato. Ejemplos de malato deshidrogenasa incluyen las derivadas de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, o bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*.

Como gen de la malato deshidrogenasa (mdh), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un que codifica la malato deshidrogenasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases

conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli* o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

5 La glioxilato carboligasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 4.1.1.47 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de dos moléculas de glioxilato en una molécula de 2-hidroxi-3-oxopropionato. Esta reacción está acompañada por descarboxilación de una molécula de dióxido de carbono. Ejemplos de glioxilato carboligasa incluyen las derivadas de bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o
10 bacterias *Rhodococcus* tales como *Rhodococcus jostii*.

Como gen de la glioxilato carboligasa (gcl), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la glioxilato carboligasa obtenida de cualquiera de los organismos que originan la enzima enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de las mismas incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Rhodococcus* tal como *Rhodococcus jostii* o bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*.

La 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 1.1.1.60 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que usa NADH como coenzima y cataliza una reacción de conversión de 2-hidroxi-3-oxopropionato en glicerato. Ejemplos de 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa incluyen las derivadas de bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*.

Como gen de 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa (glxR), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases un gen que codifica 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*.

30 La hidroxipiruvato isomerasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 5.3.1.22 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de isomerización de 2-hidroxi-3-oxopropionato en hidroxipiruvato. Ejemplos de hidroxipiruvato isomerasa incluyen los derivados de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

35 Como gen de la hidroxipiruvato isomerasa (hyi), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la hidroxipiruvato isomerasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

La hidroxipiruvato reductasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 1.1.1.81 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que usa NADH o NADPH como coenzima y cataliza una reacción de conversión de hidroxipiruvato en glicerato.

45 Ejemplos de hidroxipiruvato reductasa incluyen los derivados de bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

50 Como gen para la hidroxipiruvato reductasa (ycdW), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica hidroxipiruvato reductasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente o una secuencia de ADN sintética sintetizada basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la se secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

55 La glicerato 3-quinasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 2.7.1.31 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de glicerato en 3-fosfoglicerato. En esta reacción, se consume una molécula de ATP, y se produce una molécula de ADP y una molécula de fosfato. Ejemplos de la glicerato 3-quinasa incluyen los derivados de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, o bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*.

60 Como gen de la glicerato 3-quinasa (glxK) de acuerdo con la invención, puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la glicerato 3-quinasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente o un secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de
65

bases de un gen derivado de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

La glicerato 2-quinasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 2.7.1.165 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de glicerato en 2-fosfoglicerato. En esta reacción, se consume una molécula de ATP, y se produce una molécula de ADP y una molécula de fosfato. Ejemplos de glicerato 2-quinasa incluyen las derivas de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, o bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*.

Como gen de glicerato 2-quinasa (garK) de acuerdo con la invención, puede usarse un ADN que tienen la secuencia de bases de un gen que codifica la glicerato 2-quinasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

La fosfoglicerato mutasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 5.4.2.1 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato. Ejemplos de la fosfoglicerato mutasa incluyen las derivas de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

Como gen de la fosfoglicerato mutasa (gpm), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la fosfoglicerato mutasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en la secuencia de bases conocidas del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

La enolasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 4.2.1.11 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato. Ejemplos de enolasa incluyen las derivadas de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

Como gen de enolasa (eno), puede usarse un ADN que tiene una secuencia de bases de un gen que codifica la enolasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

La piruvato quinasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 2.7.1.40 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de conversión de fosfoenolpiruvato y ADP en piruvato y ATP. Ejemplos de piruvato quinasa incluyen las derivadas de bacterias *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

Como gen de piruvato quinasa (pyk), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la piruvato quinasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocidas del gen. Ejemplos preferibles de la mismas incluye un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium glutamicum*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, o bacterias *Pantoea* tales como *Pantoea ananatis*.

El microorganismo productor de acetil-CoA puede ser un microorganismo que tiene, además de la ruta para convertir acetil-CoA en un metabolito útil, una ruta que produce otro metabolito usando acetil-CoA como materia prima, o puede ser un microorganismo cuya actividad enzimática implicada en una ruta que produce otro metabolito está potenciada. Como resultado, los metabolitos útiles derivados de acetil-CoA pueden producirse a partir de un material de fuente de carbono y dióxido de carbono, y puede aumentarse la productividad del metabolito útil derivado de acetil-CoA.

El microorganismo usado en la invención no está particularmente limitado siempre que el microorganismo no tenga ninguno de:

- (a) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tienen una reacción enzimática de malonil-CoA o malonato semialdehído o 3-hidroxi propionato;
- (b) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de acetil-CoA y CO₂ a piruvato;
- (c) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de crotonil-CoA y CO₂ a etilmalonil-CoA o glutaconil-CoA;
- (d) un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de CO₂ a formiato; donde el microorganismo no tiene ninguna actividad malato tioquinasa o malil-CoA liasa endógena.

Ejemplos del microorganismo incluyen microorganismos que pertenecen a *Enterobacteriaceae* y microorganismos que pertenecen a bacterias corineformes. Ejemplos específicos del microorganismo incluyen microorganismos que pertenecen a *Enterobacteriaceae* tales como bacterias *Escherichia* y bacterias *Pantoea*; microorganismos que pertenecen a bacterias corineformes tales como bacterias *Corynebacterium* y bacterias *Brevibacterium*; hongos filamentosos; y actinomicetes.

Ejemplos específicos de los microorganismos que pertenecen a *Enterobacteriaceae* incluyen bacterias que pertenecen a *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Morganella*, o *Erwinia*. Entre estos, los microorganismos que pertenecen a *Escherichia* y los microorganismos que pertenecen a *Pantoea* son preferibles desde el punto de vista de producción eficaz de metabolitos útiles.

Ejemplos de las bacterias *Corynebacterium* incluyen *Corynebacterium glutamicum*.

Las bacterias *Escherichia* no están particularmente limitadas, y ejemplos de las mismas incluyen *Escherichia coli*. Ejemplos específicos de *Escherichia coli* incluyen *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325) y *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076), derivadas de la cepa K12 de tipo silvestre prototipo, y *Escherichia coli* B (ATCC 11303), derivada de la cepa B de tipo silvestre prototipo.

Tanto las bacterias *Escherichia* como las bacterias *Pantoea* pertenecen a *Enterobacteriaceae*, y están muy relacionadas entre sí (J. Gen. Appl. Microbiol. 43(6) 355-361 (1997); International Journal of Systematic Bacteriology, pág. 1061-1067, 1997).

En los últimos años, algunas bacterias que pertenecen a *Enterobacter* se han vuelto a clasificar en *Pantoea agglomerans*, *Pantoea disperse* o similares (International Journal of Systematic Bacteriology, julio 39(3) 337-345, 1989).

Además, algunas bacterias que pertenecen a *Erwinia* se han vuelto a clasificar en *Pantoea ananas* o *Pantoea stewartii* (International Journal of Systematic Bacteriology, 43(1), 162-173, 1993).

Ejemplos de las bacterias *Enterobacter* incluyen *Enterobacter agglomerans* y *Enterobacter aerogenes*. Más específicamente, pueden usarse cepas ejemplificadas en la patente europea abierta inspección pública n.º 952221. Ejemplos de cepas representativas de *Enterobacter* incluyen *Enterobacter agglomerans* ATCC 12287.

Ejemplos de cepas representativas de las bacterias *Pantoea* incluyen *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, *Pantoea agglomerans*, y *Pantoea citrea*. Ejemplos específicos de las cepas incluyen las siguientes:

- *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614) (patente europea abierta inspección pública n.º 0952221)
- *Pantoea ananatis* AJ13356 (FERM BP-6615) (patente europea abierta inspección pública n.º 0952221)

Aunque estas cepas se describen como *Enterobacter agglomerans* en la patente europea abierta inspección pública n.º 0952221, las cepas se volvieron a clasificar en *Pantoea ananatis* como se ha descrito anteriormente basándose en el análisis de secuencia de bases del ARNr 16S y similares.

Las "bacterias corineformes" en la invención se refieren a los microorganismos que pertenecen a *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, o *Microbacterium*, como se define en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8, 599 (1974).

Ejemplos de las bacterias corineformes incluyen adicionalmente microorganismos que se habían clasificado en *Brevibacterium* pero que se volvieron a clasificar posteriormente en *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255, 1991), y bacterias relacionadas tales como microorganismos que pertenecen a *Brevibacterium*. Ejemplos de las bacterias corineformes se enumeran a continuación.

Es decir, ejemplos de las mismas incluyen *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium alkanolyticum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium melassecola*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium herculis*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium saccharolyticum*, *Brevibacterium thiogenitalis*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium album*, *Brevibacterium cerinum*, y *Microbacterium ammoniaphilum*.

Ejemplos específicos de las mismas incluyen las siguientes cepas.

5 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511, *Corynebacterium callunae* ATCC 15991, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13020, ATCC 13032 y ATCC 13060, *Corynebacterium lilium* ATCC 15990, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12340 (FERM BP-1539), *Corynebacterium herculis* ATCC 13868, *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020, *Brevibacterium flavum* ATCC 13826, ATCC 14067 y AJ 12418 (FERM BP-2205), *Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068, *Brevibacterium lactofermentum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13869, *Brevibacterium roseum* ATCC 13825, *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066, 10 *Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 19240, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6871 y ATCC 6872, *Brevibacterium album* ATCC 15111, *Brevibacterium cerinum* ATCC 15112 y *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354.

15 En un caso en el que la bacteria *Escherichia* se usa como microorganismo, como ejemplos preferibles del microorganismo productor de acetil-CoA en la invención se incluyen una bacteria *Escherichia* que produce acetil-CoA en que la actividad tiolasa, la actividad CoA transferasa y la actividad acetoacetato descarboxilasa está conferida o potenciada.

20 En un caso en el que la bacteria *Escherichia* se usa como microorganismo, como ejemplos preferibles del microorganismo productor de acetil-CoA en la invención se incluyen adicionalmente una bacteria *Escherichia* que produce acetil-CoA en que la actividad tiolasa, la actividad CoA transferasa, la actividad acetoacetato descarboxilasa y la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa están conferidas o potenciadas.

25 La tiolasa en un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 2.3.1.9 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de producción de acetoacetil-CoA a partir de acetil-CoA.

30 Ejemplos de tiolasa incluyen los derivados de bacterias *Clostridium* tales como *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium beijerinckii*, bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, *Halobacterium sp.*, bacterias *Zoogloea* tales como *Zoogloea ramigera*, *Rhizobium sp.*, bacterias *Bradyrhizobium* tales como *Bradyrhizobium japonicum*, *Candida* tales como *Candida tropicalis*, bacterias *Caulobacter* tales como *Caulobacter crescentus*, bacterias *Streptomyces* tales como *Streptomyces collinus*, o bacterias *Enterococcus* tales como *Enterococcus faecalis*.

35 Como gen de tiolasa, puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica una tiolasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Clostridium* tal como *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium beijerinckii*; bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, *Halobacterium sp.*, bacterias *Zoogloea* tales como *Zoogloea ramigera*, *Rhizobium sp.*, bacterias *Bradyrhizobium* tales como *Bradyrhizobium japonicum*, *Candida* tales como *Candida tropicalis*, bacterias *Caulobacter* tales como *Caulobacter crescentus*, bacterias *Streptomyces* tales como *Streptomyces collinus*, o bacterias *Enterococcus* tales como *Enterococcus faecalis*. Ejemplos más preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de un procarionta tal como bacterias *Clostridium* o bacterias *Escherichia*, y un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli* es particularmente 45 preferible.

50 La acetoacetato descarboxilasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 4.1.1.4 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de producción de acetona a partir de acetoacetato.

Ejemplos de acetoacetato descarboxilasa incluyen aquellos derivados de bacterias *Clostridium* tales como *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium beijerinckii*; o bacterias *Bacillus* tales como *Bacillus polymyxa*.

55 Como gen de acetoacetato descarboxilasa, puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica acetoacetato descarboxilasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerado anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Clostridium* o bacterias *Bacillus*. Ejemplos específicos de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Clostridium acetobutylicum* o *Bacillus polymyxa*. El ADN es más 60 preferiblemente un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Clostridium acetobutylicum*.

65 Como gen de acetoacetato descarboxilasa, puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica acetoacetato descarboxilasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de base de un gen derivado de bacterias *Clostridium* o bacterias *Bacillus*. Ejemplos específicos de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Clostridium acetobutylicum* o *Bacillus polymyxa*. El ADN es más

preferiblemente un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Clostridium acetobutylicum*.

La alcohol isopropílico deshidrogenasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 1.1.1.80 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de producción de alcohol isopropílico a partir de acetona.

Ejemplos de alcohol isopropílico deshidrogenasa incluyen las derivadas de bacterias *Clostridium* tales como *Clostridium beijerinckii*.

Como gen de la, alcohol isopropílico deshidrogenasa, puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la, alcohol isopropílico deshidrogenasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Clostridium*, tal como *Clostridium beijerinckii*.

La CoA transferasa es un nombre genérico para enzimas que se clasifican como el número de código de enzima: 2.8.3.8 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de producción de acetoacetato a partir de acetoacetil-CoA.

Ejemplos de CoA transferasa incluyen las derivadas de bacterias *Clostridium* tales como *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium beijerinckii*; bacteria *Roseburia* tales como *Roseburia intestinalis*; bacteria *Faecalibacterium* tales como *Faecalibacterium prausnitzii*; bacterias *Coprococcus*; *trypanosomes* tales como *Trypanosoma brucei*; o bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*.

Como gen de la CoA transferasa, puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases de un que codifica la CoA transferasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Clostridium* tales como *Clostridium acetobutylicum*, bacterias *Roseburia* tales como *Roseburia intestinalis*, bacterias *Faecalibacterium* tales como *Faecalibacterium prausnitzii*, bacterias *Coprococcus*, *trypanosomes* tales como *Trypanosoma brucei*, o bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*. Ejemplos más preferidos de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Clostridium* o bacterias *Escherichia*, y un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli* es aún más preferible.

Desde el punto de vista de la actividad enzimática, es preferible que cada uno de los cuatro tipos de enzima sea una enzima derivada de al menos una selecciona del grupo que consiste en bacterias *Clostridium*, bacterias *Bacillus* y bacterias *Escherichia*. En particular, es más preferible un caso en que la aceto acetato descarboxilasa y la alcohol isopropílico deshidrogenasa se obtiene de bacterias *Clostridium*, y en que la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen de bacterias *Escherichia*.

En particular, desde el punto de vista de la actividad enzimática, es preferible que cada uno de los cuatro tipos de enzima se obtenga de cualquiera de *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, o *Escherichia coli*. Es más preferible que la aceto acetato descarboxilasa sea una enzima derivada de *Clostridium acetobutylicum* y que cada una de la CoA transferasa y la tiolasa se obtenga de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli*, y que la alcohol isopropílico deshidrogenasa se obtenga de *Clostridium beijerinckii*. Respecto a los cuatro tipos de enzima, es preferible que la actividad aceto acetato descarboxilasa se obtenga de *Clostridium acetobutylicum*, y que la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa se obtenga de *Clostridium beijerinckii*, y que la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtengan de *Escherichia coli*, desde el punto de vista de la actividad enzimática.

Los genes de CoA transferasa (atoD y atoA) y el gen de la tiolasa (atoB) derivados de *Escherichia coli* forman un operón en el genoma de *Escherichia coli* en el orden de atoD, atoA y atoB (Journal of Bacteriology Vol. 169 pág. 42-52 Lauren Sallus Jenkins et al.). Por lo tanto, la expresión de los genes de CoA transferasa y el gen de la tiolasa pueden controlarse simultáneamente modificando el promotor de atoD.

En vista de lo anterior, cuando la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa son las obtenidas de los genes genómicos del hospedador *Escherichia coli*, es preferible potenciar la expresión de ambos genes enzimáticos por, por ejemplo, remplazo del promotor responsable de la expresión de ambos genes enzimáticos por otro promotor, desde el punto de vista de obtener suficiente capacidad de producción de alcohol isopropílico. Ejemplos del promotor a usarse para potenciar la expresión de la actividad CoA transferasa y de la actividad tiolasa incluyen el promotor de GAPDH derivado de *E. coli* descrito anteriormente.

Ejemplos del microorganismo productor de acetyl-CoA que produce otro metabolito usando acetyl-CoA como materia prima incluyen un microorganismo obtenido confiriendo o potenciando, o inactivando o reduciendo, cualquiera de las actividades enzimáticas descritas anteriormente, usando *Escherichia coli* que tiene un sistema de producción de alcohol isopropílico (a partir de ahora en este documento mencionado como "*Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico") como hospedador.

La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico puede ser cualquier *Escherichia coli* siempre que los genes respectivos para conferir la capacidad de producción de alcohol isopropílico puedan introducirse o modificarse.

5 La *Escherichia coli* es más preferiblemente *Escherichia coli* a la que se ha conferido capacidad de producción de alcohol isopropílico por anticipado. Usando dicha *Escherichia coli*, puede producirse de forma eficaz alcohol isopropílico.

10 Un ejemplo de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico es una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico a la que se ha conferido la actividad aceto acetato carboxilasa, la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa para que sea capaz de producir alcohol isopropílico a partir de una materia prima derivada de plantas, y que se describe en, por ejemplo, el documento WO 2009/008377. Otros ejemplos de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico incluyen microorganismos descritos en los documentos WO 2009/094485, WO 2009/094485, WO 2009/046929, o WO 2009/046929.

15 La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico es *Escherichia coli* que tiene un sistema de producción de alcohol isopropílico y tiene una capacidad de producción de alcohol isopropílico que se introduce por una técnica de recombinación genética. El sistema de producción de alcohol isopropílico puede ser cualquier sistema que cause que la *Escherichia coli* de interés produzca alcohol isopropílico.

20 En la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención, preferiblemente, se confieren cuatro actividades enzimáticas - una actividad aceto acetato descarboxilasa, una actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, una actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa mencionada anteriormente - desde el exterior de la célula.

25 En la invención, ejemplos de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que tiene un sistema de producción de alcohol isopropílico incluyen una variante pIPA/B y una variante plaaa/B descritas en el documento WO 2009/008377. Ejemplos de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico incluyen adicionalmente una variante en que, entre las enzimas implicadas en la producción de alcohol isopropílico, la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa están potenciadas potenciando la expresión de los genes respectivos en el genoma de *Escherichia coli*, y en que la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa y la actividad aceto acetato descarboxilasa están potenciadas potenciando la expresión de los genes respectivos usando un plásmido o plásmidos (mencionado a veces como "variante pla/B::atoDAB").

35 En la invención, la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico puede ser una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que incluya un sistema de producción de alcohol isopropílico, en que la actividad del represor transcripcional GntR está inactivada, y la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico incluye un grupo de enzimas auxiliares que tienen un patrón de actividad enzimática con que se mantiene o potencia la capacidad de producción de alcohol isopropílico conseguida por la inactivación de la actividad GntR. Por consiguiente, puede aumentarse adicionalmente la producción de alcohol isopropílico.

40 La expresión "un grupo de enzimas auxiliares" en la invención se refiere a una enzima o dos o más enzimas, que afectan a la capacidad de producción de alcohol isopropílico. Además, la actividad de enzimas incluidas en el grupo de enzimas auxiliares se inactiva, activa o potencia. La expresión "el patrón de actividad enzimática del grupo de enzimas auxiliares" como se usa en este documento, se refiere al patrón de actividad enzimática de las enzimas que es capaz de mantener o aumentar la cantidad mejorada de producción de alcohol isopropílico conseguida por la inactivación de la actividad GntR en solitario, y abarca una enzima de una combinación de dos o más enzimas.

45 Ejemplos de patrones de actividad enzimática preferibles del grupo de enzimas auxiliares incluyen los siguientes patrones:

- 50
- (1) mantenimiento de las actividades de tipo silvestre de la glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi), glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf), y la fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd);
 - (2) inactivación de la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) y potenciación de la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf); y
 - 55 (3) inactivación de la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi), potenciación de la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) e inactivación de la actividad fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd).

60 Entre estas, el patrón de actividad enzimática del grupo de enzimas auxiliares descrito en el punto (3) anterior es más preferible desde el punto de vista de la capacidad de producción de alcohol isopropílico.

El grupo de enzimas auxiliares y el patrón de actividad enzimática de las mismas no están limitados a los descritos anteriormente. Cualquier grupo de enzimas auxiliares y patrón de actividad enzimática del mismo que incluya la inactivación de la actividad GntR, y con el que pueda aumentarse la cantidad de producción de alcohol isopropílico en una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico, están dentro del alcance de la invención. El grupo de enzimas auxiliares no está necesariamente constituido por múltiples enzimas, y puede estar constituido por una enzima.

GntR se refiere a un factor de transcripción que regula negativamente un operón implicado en el metabolismo de gluconato mediante la ruta de Entner-Doudoroff. GntR es un nombre genérico para represores transcripcionales GntR que suprimen las funciones de dos grupos de genes (GntI y GntII), que son responsables de la captación y metabolismo de ácido glucónico.

5 La glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el número de código de enzima: 5.3.1.9 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de producción de D-fructosa-6-fosfato a partir de D-glucosa-6-fosfato.

10 La glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) se clasifica con el número de código de enzima: 1.1.1.49 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción para producir D-glucono-1,5-lactona-6-fosfato a partir de D-glucosa-6-fosfato. Ejemplos de glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa incluyen los derivados de bacterias *Deinococcus* tales como *Deinococcus radiophilus*, hongos *Aspergillus* tales como *Aspergillus niger* o *Aspergillus aculeatus*; bacterias *Acetobacter* tales como *Acetobacter hansenii*, bacterias *Thermotoga* tales como *Thermotoga maritima*, hongos *Cryptococcus* tales como *Cryptococcus neoformans*, hongos *Dictyostelium* tales como *Dictyostelium discoideum*, *Pseudomonas* tales como *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces* tales como *Saccharomyces cerevisiae*, bacterias *Bacillus* tales como *Bacillus megaterium*, o bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*.

20 Como gen de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf), puede usarse un ADN que tiene la secuencia de bases del que codifica la tiolasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de enzima enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Ejemplos preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de bacterias *Deinococcus* tales como *Deinococcus radiophilus*, hongos *Aspergillus* tales como *Aspergillus niger* o *Aspergillus aculeatus*; bacterias *Acetobacter* tales como *Acetobacter hansenii*, bacterias *Thermotoga* tales como *Thermotoga maritima*, hongos *Cryptococcus* tales como *Cryptococcus neoformans*, hongos *Dictyostelium* tales como *Dictyostelium discoideum*, *Pseudomonas* tales como *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces* tales como *Saccharomyces cerevisiae*, bacterias *Bacillus* tales como *Bacillus megaterium*, o bacterias *Escherichia* tales como *Escherichia coli*. Ejemplos más preferibles de la misma incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de un procarionta tal como bacterias *Deinococcus* bacteria, hongos *Aspergillus*, bacterias *Acetobacter*, bacterias *Thermotoga*, *Pseudomonas*, bacterias *Bacillus*, o bacterias *Escherichia*. El ADN es más preferible un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Escherichia coli*.

35 La fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd) es un nombre genérico para enzimas que se clasifican con el número de código de enzima: 1.1.1.44 basado en el informe de la Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), y que cataliza una reacción de producción de D-ribulosa-5-fosfato y CO₂ a partir de 6-fosfo-D-gluconato.

40 Cada una de las actividades de estas enzimas en la invención puede ser una actividad introducida desde el exterior de la célula en la célula, o una actividad obtenida por la sobreexpresión del gen de la enzima que la bacteria hospedadora posee en su genoma mediante potenciación de la actividad promotora para el gen de la enzima o remplazo del promotor con otro promotor.

45 La *Escherichia coli* que tiene actividad enzimática potenciada en la invención se refiere a *Escherichia coli* en que está potenciada la actividad enzimática por un cierto método. Este tipo de *Escherichia coli* puede construirse introduciendo un gen que codifica la enzima o proteína desde el exterior de la célula en la célula usando un plásmido por la tecnología de recombinación génica descrita anteriormente; o por sobreexpresión del gen de la enzima que la bacteria hospedadora posee en su genoma mediante potenciación de la actividad promotora para el gen de la enzima o remplazando el promotor con otro promotor; o la combinación de estos métodos.

50 El promotor del gen aplicable a la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico puede ser cualquier promotor capaz de controlar la expresión de cualquiera de los genes descritos anteriormente. El promotor del gen es preferiblemente un promotor potente que trabaje de forma constitutiva en el microorganismo, y que no es susceptible a represión de la expresión incluso en presencia de glucosa. Ejemplos específicos del mismo incluye el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (a veces mencionada a partir de ahora en este documento como "GAPDH") o el promotor de la serina hidroximetiltransferasa.

60 El promotor en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico significa una región en que la ARN polimerasa que tiene un factor sigma se une para iniciar la transcripción. Por ejemplo, un promotor de GAPDH derivado de *Escherichia coli* se describe en los números de base 397 a 440 en la información de secuencia de bases del número de acceso a GenBank X02662.

65 En la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico, puede alterarse la lactato deshidrogenasa (LdhA). La alteración de la lactato deshidrogenasa suprime la producción de lactato incluso en condiciones de cultivo en que el suministro de oxígeno está restringido, como resultado de lo cual puede producirse de forma eficaz alcohol isopropílico. Las "condiciones en que el suministro de oxígeno está restringido" generalmente significa condiciones: 0,02 vvm hasta 2,0 vvm (vvm: volumen de aireación [ml]/volumen de líquido [ml]/tiempo [min]) a una velocidad de

agitación de 200 a 600 rpm, cuando solamente se usa aire como gas.

La lactato deshidrogenasa (LdhA) se refiere a una enzima que produce D-lactato y NAD a partir de piruvato y NADH.

5 El microorganismo productor de acetil-CoA para producir acetona puede ser uno que tiene solamente actividad tiolasa, actividad CoA transferasa y actividad aceto acetato descarboxilasa entre la actividad en el sistema de producción de alcohol isopropílico. Es decir, cuando se produce acetona usando el microorganismo productor de acetil-CoA, puede usarse el microorganismo que no tiene actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa.

10 Otros ejemplos de la ruta para producir otro metabolito usando acetil-CoA como materia prima incluyen una ruta que produce glutamato a partir de acetil-CoA. Un ejemplo preferible del microorganismo que tiene una ruta que produce otro metabolito o el microorganismo cuya actividad enzimática implicada en una ruta que produce otro metabolito está potenciada incluye un microorganismo obtenido confiriendo o potenciando, o inactivando o reduciendo cualquiera de las actividades enzimáticas descritas anteriormente usando un microorganismo que tiene una ruta que produce de forma eficaz glutamato (a veces a partir de ahora en este documento mencionado como "microorganismo productor de glutamato") como hospedador.

Ejemplos del microorganismo productor de glutamato incluyen los microorganismos mencionados anteriormente que tienen una capacidad de producir L-aminoácidos.

20 Ejemplos específicos del microorganismo productor de glutamato incluyen, aunque sin limitación, bacterias *Enterobacteriaceae* tales como bacterias *Escherichia* o bacterias *Pantoea*, y bacterias corineformes tales como *Corynebacterium glutamicum*.

25 El microorganismo productor de glutamato puede ser cualquier microorganismo que permita la introducción o modificación de un gen para conferir la capacidad de producción de glutamato. El más preferible que el microorganismo productor de glutamato sea una bacteria *Pantoea* o bacteria corineforme a la que se ha conferido capacidad de producción de glutamato por anticipado. Usando este tipo de microorganismo, puede producirse de forma más eficaz glutamato.

30 Ejemplos de un método para conferir la capacidad de producción de glutamato a un microorganismo incluyen modificar el microorganismo de modo que se aumente y/o se sobreexpresen la expresión de un gen que codifica una enzima implicada en la biosíntesis de L-glutamato. Ejemplos de la enzima implicada en la biosíntesis de L-glutamato incluyen la glutamato deshidrogenasa, glutamina sintetasa, glutamato sintetasa, isocitrato deshidrogenasa, aconitato hidratasa, citrato sintasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, piruvato carboxilasa, piruvato deshidrogenasa, piruvato quinasa, fosfoenolpiruvato sintasa, enolasa, fosfogliceromutasa, fosfoglicerato quinasa, gliceraldehído-3-deshidrogenasa, triosa-fosfato isomerasa, fructosa-bifosfato aldolasa, fosfofructoquinasa y glucosa-fosfato isomerasa. Entre estas enzimas, es preferible que una o más de la citrato sintasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa y glutamato deshidrogenasa tenga una actividad aumentada, y es más preferible que las tres enzimas tengan actividades potenciadas.

Ejemplos del microorganismo productor de glutamato incluyen un microorganismo productor de glutamato descrito en la solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública (JP-A) n.º 2005-278643.

45 El microorganismo productor de L-glutamato a usarse puede ser un microorganismo que tiene una capacidad de acumular L-glutamato en una cantidad que excede la concentración de saturación de L-glutamato en un medio líquido cuando el microorganismo se cultivó en condiciones ácidas (a partir de ahora en este documento mencionado como "capacidad de acumulación de L-glutamato en condiciones ácidas"). Por ejemplo, puede obtenerse una variante que tiene resistencia aumentada a L-glutamato en un entorno de bajo pH por un método descrito en la patente europea abierta a inspección pública n.º 1078989, mediante lo cual se confiere la capacidad de acumular L-glutamato en una cantidad que excede la concentración de saturación.

Ejemplos específicos del microorganismo que tiene una capacidad intrínseca de acumulación de L-glutamato en condiciones ácidas incluyen *Pantoea ananatis* AJ13356 (FERM BP-6615) y AJ13601 (FERM BP-7207) (véase la patente europea abierta a inspección pública n.º 0952221). *Pantoea ananatis* AJ13356 se depositó en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (nombre actual: International Patent Organism Depository, National Institute of Technology and Evaluation (IPOD, NITE); dirección: Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japón) con el número de acceso FERM P-16645 el 19 de febrero de 1998, y después se transfirió a la autoridad de depósito internacional según el Tratado de Budapest con el número de acceso FERM BP-6615 el 11 de enero de 1999. Esta cepa se identificó como *Enterobacter agglomerans* y se depositó como *Enterobacter agglomerans* AJ13355 cuando se aisló por primera vez, pero de acuerdo con el reciente análisis de secuencia de bases de ARNr 16S y similares, la cepa se volvió a clasificar como *Pantoea ananatis* (véanse los Ejemplos a continuación). Asimismo, AJ13356 y AJ13601 mencionados a continuación inducidos a partir de AJ13355 se depositaron en el depósito anterior como *Enterobacter agglomerans*, pero estas cepas se describen como *Pantoea ananatis* en la presente memoria descriptiva. AJ13601 se depositó en el National Institute of Bioscience and Human-Technology,

Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (nombre actual: International Patent Organism Depository, National Institute of Technology and Evaluation (IPOD, NITE) con el número de acceso FERM P-17156 el 18 de agosto de 1999, y después se transfirió a una autoridad de depósito internacional según el Tratado de Budapest con el número de acceso FERM BP-7207 el 6 de julio de 2000.

Otros ejemplos del método para conferir o potenciar la capacidad de producción de L-glutamato incluyen un método para conferir resistencia a un análogo de ácido orgánico o un inhibidor de la respiración, y un método para conferir sensibilidad a un inhibidor de la síntesis de pared celular. Ejemplos específicos del método incluyen conferir resistencia a ácido monofluoroacético (JP-A n.º S50-113209), conferir resistencia a adenina o resistencia a timina (JP-A n.º S57-065198), debilitar la ureasa (JP-A n.º S52-038088), conferir resistencia a ácido malónico (JP-A n.º S52-038088), conferir resistencia a benzopirona o naftoquinonas (JP-A n.º S56-001889), conferir resistencia a HOQNO (JP-A n.º S56-140895 A), conferir resistencia a ácido α -cetomalónico (JP-A n.º S57-002689 A), conferir resistencia a guanidina (JP-A n.º S56-035981), y un método para conferir resistencia a penicilina (JP-A n.º H04-088994).

Ejemplos específicos de los microorganismos resistentes incluyen las siguientes cepas.

- *Brevibacterium flavum* AJ3949 (FERM BP-2632; véase JP-A n.º S50-113209)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11628 (FERM P-5736; véase JP-A n.º S57-065198)
- *Brevibacterium flavum* AJ11355 (FERM P-5007; véase JP-A n.º S56-001889)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11368 (FERM P-5020; véase JP-A n.º S56-001889)
- *Brevibacterium flavum* AJ11217 (FERM P-4318; véase JP-A n.º S57-002689)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11218 (FERM P-4319; véase JP-A n.º S57-002689)
- *Brevibacterium flavum* AJ11564 (FERM P-5472; véase JP-A n.º S56-140895)
- *Brevibacterium flavum* AJ11439 (FERM P-5136; véase JP-A n.º S56-035981)
- *Corynebacterium glutamicum* H7684 (FERM BP-3004; véase JP-A n.º H04-088994)
- *Brevibacterium lactofermentum* AJ11426 (FERM P-5123; véase JP-A n.º S56-048890)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11440 (FERM P-5137; véase JP-A n.º S56-048890)
- *Brevibacterium lactofermentum* AJ11796 (FERM P-6402; véase JP-A n.º S58-158192)

Ejemplos preferibles del microorganismo que tiene una capacidad de producción de L-glutamina incluyen un microorganismo en que está potenciada la actividad glutamato deshidrogenasa, un microorganismo en que está potenciada la actividad glutamina sintetasa (glnA) y un microorganismo en que está alterado el gen de la glutaminasa (patentes europeas abiertas a inspección pública n.º 1229121 y 1424398). La potenciación de la actividad glutamina sintetasa también puede conseguirse alterando la glutamina adenilil transferasa (glnE) o alterando la proteína de regulación de PII (glnB). Otros ejemplos preferibles del microorganismo productor de L-glutamina incluyen una variante que pertenece al género *Escherichia*, y la variante alberga una glutamina sintetasa mutante en que el resto de tirosina en la posición 397 en la glutamina sintetasa está remplazado por otro resto de aminoácido (solicitud publicada de patente de Estado Unidos n.º 2003-0148474).

Otro método de conferir o potenciar la capacidad de producción de L-glutamina incluye conferir resistencia a 6-diazo-5-oxo-norleucina (JP-A n.º H03-232497), conferir resistencia a un análogo de purina y resistencia a sulfóxido de metionina (JP-A n.º S61-202694) y conferir resistencia a ácido α -cetomaleico (JP-A n.º S56-151495). Ejemplos específicos de bacterias corineformes que tienen la capacidad de producción de L-glutamina incluyen los siguientes microorganismos.

- *Brevibacterium flavum* AJ11573 (FERM P-5492; JP-A n.º S56-161495)
- *Brevibacterium flavum* AJ11576 (FERM BP-10381; JP-A n.º S56-161495)
- *Brevibacterium flavum* AJ12212 (FERM P-8123; JP-A n.º S61-202694)

Ejemplos específicos de microorganismos que producen prolina, leucina, isoleucina, valina, arginina, citrulina, ornitina y/o ácido poliglutámico incluyen un microorganismo descrito en JP-A n.º 2010-41920. Los microorganismos que producen ácido acético, (poli)ácido 3-hidroxibutírico, ácido itacónico, ácido cítrico y/o ácido butírico se describen en Fermentation Handbook (Kyoritsu Shuppan Co., Ltd.).

Ejemplos de microorganismos que producen ácido 4-aminobutírico incluyen un microorganismo en que se introduce glutamato descarboxilasa en un microorganismo productor de glutamato, tal como los descritos en JP-A n.º 2011-167097.

Ejemplos de microorganismos que producen ácido 4-hidroxibutírico incluyen un microorganismo en que se introduce glutamato descarboxilasa, transaminasa y/o aldehído deshidrogenasa en un microorganismo productor de glutamato, tal como los descritos en JP-A n.º 2009-171960.

Ejemplos de microorganismos que producen ácido 3-hidroxiisobutírico incluyen un microorganismo en que se introdujo una ruta descrita en el documento WO 2009/135074 o documento WO 2008/145737.

Ejemplos de microorganismos que producen ácido 2-hidroxiisobutírico incluyen un microorganismo en que se introdujo una ruta descrita en el documento 2009/135074 o documento WO 2009/156214.

5 Ejemplos de microorganismos que producen ácido 3-aminoisobutírico o ácido metacrílico incluyen un microorganismo en que se introdujo una ruta descrita en el documento WO 2009/135074.

10 El microorganismo en la invención es un microorganismo que se construye para que tenga el ciclo de producción de acetil-CoA de la Fig. 1 confiriendo al menos malato tioquinasa y malil-CoA liasa. Por lo tanto, los microorganismos que tienen de forma intrínseca malato tioquinasa y malil-CoA liasa no se incluyen en el microorganismo productor de acetil-CoA de la invención.

15 Ejemplos de los microorganismos que tienen de forma intrínseca Mtk y mcl incluyen microorganismos metanotróficos tales como *Methylobacterium extorquens*. Como no se han desarrollado sistemas de vector adecuados para microorganismos metanotróficos o técnicas para la modificación de genes genómicos de microorganismos metanotróficos, la manipulación genética de microorganismos es más difícil que los microorganismos industriales tales como *Escherichia coli* y *Corynebacterium*. Además, estos microorganismos crecen lentamente en muchos casos y, por lo tanto, no son adecuados para producir metabolitos útiles.

20 El método de producción de acetil-CoA, acetona, alcohol isopropílico o glutamato de acuerdo con la invención incluye producir acetil-CoA, acetona, alcohol isopropílico o glutamato como el producto de interés a partir de un material de fuente de carbono usando el microorganismo productor de acetil-CoA descrito anteriormente. Es decir, el método de producción de acetil-CoA incluye: cultivar el microorganismo productor de acetil-CoA en un estado en que el microorganismo productor de acetil-CoA entra en contacto con un material de fuente de carbono (a partir de ahora en este documento, proceso de cultivo) y recoger el producto de interés (acetil-CoA, acetona, alcohol isopropílico o glutamato) obtenido por el contacto (a partir de ahora en este documento, proceso de recogida).

25 De acuerdo con el método de producción de acetil-CoA, como el microorganismo productor de acetil-CoA se cultiva en un estado en que el microorganismo productor de acetil-CoA entra en contacto con un material de fuente de carbono, el material de fuente de carbono se asimila por el microorganismo productor de acetil-CoA, y el producto de interés puede producirse de forma eficaz mientras se fija dióxido de carbono.

30 El material de fuente de carbono no está restringido siempre que el material contenga una fuente de carbono que pueda asimilarse por el microorganismo, y el material es preferiblemente una materia prima derivada de plantas.

35 En la invención, la materia prima derivada de plantas se refiere a órganos tales como raíces, tallos, troncos, ramas, hojas, flores y semillas; cuerpos vegetales que contienen los órganos; y productos de descomposición de los órganos vegetales, y además abarca fuentes de carbono que pueden usarse como fuentes de carbono por microorganismos durante el cultivo entre fuentes de carbono obtenidas de los cuerpos vegetales, los órganos vegetales y los productos de descomposición de los mismos.

40 Ejemplos generales de las fuentes de carbono en la materia prima derivada de plantas incluyen azúcares tales como almidón, sacarosa, glucosa, fructosa, xilosa y arabinosa; productos de descomposición vegetal herbáceos y leñosos o hidrolizados de celulosa, cada uno de los cuales contiene los ingredientes anteriores en grandes cantidades; y combinaciones de los mismos. La fuente de carbono en la invención puede incluir adicionalmente glicerina derivada de aceite vegetal y ácidos grasos.

45 Ejemplos preferibles de la materia prima derivada de plantas incluyen cultivos agrícolas tales como cereal, maíz, arroz, trigo, soja, caña de azúcar, remolacha, algodón y similares, y combinaciones de los mismos. La forma de los mismos como materias primas no está específicamente limitada, y puede ser un producto en bruto, zumo exprimido, un producto machacado, o similares. Como alternativa, la materia prima derivada de plantas puede estar en una forma que consiste solamente en la fuente de carbono descrita anteriormente.

50 En el proceso de cultivo, el contacto entre el microorganismo productor de acetil-CoA y la materia prima derivada de plantas generalmente se hace cultivando el microorganismo productor de acetil-CoA en un medio de cultivo que contiene la materia prima derivada de plantas.

55 La densidad de contacto entre la materia prima derivada de plantas y el microorganismo productor de acetil-CoA puede variarse dependiendo de la actividad del microorganismo productor de acetil-CoA. En general, la concentración de la materia prima derivada de plantas en el medio de cultivo puede ser tal que la concentración inicial de azúcar en términos de glucosa puede establecerse al 20 % en masa o inferior respecto a la masa total de la mezcla. Desde el punto de vista de tolerancia del azúcar del microorganismo productor de acetil-CoA, la concentración inicial de azúcar se establece preferiblemente al 15 % en masa o inferior. Pueden añadirse otros componentes en cantidades de adición habituales para medios de cultivo de microorganismos, sin limitación particular.

65

5 El contenido del microorganismo productor de acetil-CoA en el medio de cultivo puede variarse con el tipo y la actividad del microorganismo y la cantidad de un líquido bacteriano de precultivo (DO 660 nm = 4 a 8) a añadirse cuando se comience inicialmente el cultivo puede establecerse generalmente al 0,1 % en masa hasta el 30 % en masa respecto al líquido de cultivo, y se establece preferiblemente al 1 % en masa hasta el 10 % en masa respecto al líquido de cultivo desde el punto de vista del control de las condiciones de cultivo.

10 El medio a usarse para el cultivo del microorganismo productor de acetil-CoA puede ser cualquier medio de cultivo empleado habitualmente que incluye una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y un ion inorgánico, y además un elemento traza inorgánico, un ácido nucleico, y una vitamina, etc., necesarios para que los microorganismos produzcan el producto interés, sin limitación particular.

15 Las condiciones de cultivo para el proceso de cultivo no están particularmente restringidas, y el cultivo puede realizarse, por ejemplo, en condiciones aeróbicas a un pH y temperatura apropiadamente controlados dentro de un intervalo de pH 4 a 9, preferiblemente pH 6 a 8 y dentro de un intervalo de 20 °C a 50 °C, preferiblemente de 25 °C a 42 °C.

20 El volumen de aireación de gas en la mezcla descrita anteriormente no está particularmente restringido. Cuando se usa solamente aire como gas, el volumen de aireación es generalmente de 0,02 vvm a 2,0 vvm (vvm: volumen de aireación [ml]/volumen de líquido [ml]/tiempo [min]) a 50 hasta 600 r.p.m. Desde el punto de vista de supresión del daño físico *Escherichia coli*, la aireación se realiza preferiblemente a 0,1 vvm a 2,0 vvm, más preferiblemente a 0,1 vvm a 1,0 vvm.

25 El proceso de cultivo puede continuarse desde el inicio del cultivo hasta que se agota el material de fuente de carbono en la mezcla, o hasta que desaparece la actividad del microorganismo productor de acetil-CoA. La duración del proceso de cultivo puede variarse con la cantidad y la actividad del microorganismo productor de acetil-CoA en la mezcla y la cantidad del material de fuente de carbono. En general, la duración puede ser de al menos una hora, y preferiblemente de al menos cuatro horas. La duración del proceso de cultivo puede continuarse de forma ilimitada por una nueva adición del material de fuente de carbono o el microorganismo productor de acetil-CoA. Sin embargo, desde el punto de vista de eficacia del proceso, la duración puede establecerse generalmente a 5 días o menos, preferiblemente 72 horas o menos. Con respecto a otras condiciones, pueden emplearse las condiciones empleadas para cultivo habitual tal cual son.

35 Los métodos de recogida del producto de interés acumulado en el medio de cultivo no están particularmente restringidos. Por ejemplo, puede emplearse un método que incluye retirar las células del microorganismo del medio de cultivo por, por ejemplo, separación por centrifugación y, después de ello, separación del producto de interés usando un método de separación habitual tal como destilación o separación en membrana en condiciones adecuadas para el tipo del producto de interés.

40 El método de producir acetil-CoA de acuerdo con la invención puede incluir adicionalmente, antes del proceso de cultivo, un proceso de precultivo para conseguir una cantidad apropiada de células y/o un estado activado apropiado del microorganismo productor de acetil-CoA a usar. El proceso de precultivo puede ser cualquier cultivo realizado en condiciones empleadas habitualmente adecuadas para el tipo de microorganismo productor de acetil-CoA.

45 El microorganismo productor de acetil-CoA usado en el método de producción de acetona es preferiblemente el microorganismo productor de acetil-CoA que tiene la actividad tiolasa, la actividad CoA transferasa y la actividad acetoacetato descarboxilasa, descritas anteriormente como un aspecto preferible del microorganismo productor de acetil-CoA, desde el punto de vista de la eficacia de producción de acetona.

50 El microorganismo productor de acetil-CoA usado en el método de producción de alcohol isopropílico es preferiblemente el microorganismo productor de acetil-CoA que tiene la actividad tiolasa, la actividad CoA transferasa, la actividad acetoacetato descarboxilasa y la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, descritas anteriormente como un aspecto preferible del microorganismo productor de acetil-CoA, desde el punto de vista de la eficacia de producción de alcohol isopropílico.

55 El método de producción de alcohol isopropílico o el método de producción de acetona preferiblemente incluye un proceso de cultivo en que el microorganismo productor de acetil-CoA se cultiva mientras se suministra gas a la mezcla que contiene el microorganismo productor de acetil-CoA y el material de fuente de carbono; y un proceso de recogida para recoger el producto de interés, en que el alcohol isopropílico o la acetona producida por el cultivo se separa y se recoge de la mezcla.

60 De acuerdo con el método de producción de alcohol isopropílico o el método de producción de acetona, el microorganismo productor de acetil-CoA se cultiva mientras se suministra gas a la mezcla (cultivo de aireación). En este cultivo de aireación, el alcohol isopropílico o la acetona producida se libera en la mezcla y se evapora de la mezcla. Como resultado, el alcohol isopropílico producido o la acetona producida puede separarse fácilmente de la mezcla. Además, como el alcohol isopropílico producido o la acetona producida se separa de forma continua de la mezcla, puede suprimirse un aumento en la concentración del alcohol isopropílico o la acetona en la mezcla. Por lo

tanto, no es necesario poner atención particular a la tolerancia del microorganismo productor de acetil-CoA frente al alcohol isopropílico o la acetona.

5 La mezcla en este método puede estar principalmente compuesta de un medio básico generalmente usado en cultivo del microorganismo hospedador. Con respecto a las condiciones de cultivo, se aplicarán las descritas anteriormente tal cual son.

10 En el proceso de recogida, se recoge el alcohol isopropílico o la acetona producida en el proceso de cultivo y separada de la mezcla. El método de recogida puede ser cualquier método capaz de recoger alcohol isopropílico o acetona en estado gaseoso o de gotas evaporado de la mezcla por cultivo habitual. Ejemplos del mismo incluyen un método de recogida en un miembro de recogida tal como un recipiente hermético empleado habitualmente. En particular, el método incluye preferiblemente poner en contacto una solución de atrapamiento para atrapar el alcohol isopropílico o la acetona con el alcohol isopropílico o la acetona separada de la mezcla, desde el punto de vista de recogida de solamente el alcohol isopropílico o la acetona con alta pureza.

15 En el método de producción de alcohol isopropílico o el método de producción de acetona, el alcohol isopropílico o la acetona puede recogerse en un estado en que el alcohol isopropílico o la acetona esta disuelta en una solución de atrapamiento o la mezcla. Ejemplos del método de recogida incluyen un método descrito en el documento WO 2009/008377. El alcohol isopropílico o la acetona recogida puede confirmarse usando un medio de detección habitual tal como HPLC. El alcohol isopropílico recogido puede purificarse adicionalmente, si fuera necesario. Ejemplos del método de purificación incluyen destilación, etc.

20 En un caso en que el alcohol isopropílico o la acetona recogida está en el estado de solución acuosa, el método de producción de alcohol isopropílico o el método de producción de acetona puede incluir adicionalmente un proceso de deshidratación además del proceso de recogida. La deshidratación de alcohol isopropílico o acetona puede realizarse por un método habitual.

25 Ejemplos de aparatos aplicables al método de producción de alcohol isopropílico o acetona en que puede recogerse alcohol isopropílico o acetona en el estado disuelto en la solución de atrapamiento o la mezcla incluyen el aparato de producción mostrado en la Fig. 1 del documento WO 2009/008377.

30 En este aparato de producción, se conecta un conducto de inyección para inyectar un gas desde el exterior del aparato al tanque de cultivo que contiene un medio de cultivo que incluye un microorganismo a usarse y una materia prima derivada de plantas, posibilitando de ese modo la aireación del medio de cultivo.

35 Un tanque de atrapamiento que contiene una solución de atrapamiento como líquido de atrapamiento se conecta al tanque de cultivo mediante un conducto de conexión. Un gas o líquido que se ha movido hasta el tanque de atrapamiento contacta con la solución de atrapamiento y aparecen burbujas.

40 Como resultado, el alcohol isopropílico o la acetona, que se ha producido en el tanque de cultivo por cultivo en aireación, se evapora debido a la aireación y, por lo tanto, se separa fácilmente del medio de cultivo, y se atrapa en la solución de atrapamiento y en el tanque de atrapamiento. Como resultado, el alcohol isopropílico o la acetona puede producirse en un estado más purificado de un modo simple y continuo.

45 Un método de producción de glutamato de acuerdo con la invención incluye producir glutamato como producto de interés a partir de un material de fuente de carbono usando el microorganismo productor de acetil-CoA descrito anteriormente. Específicamente, el método de producción de glutamato incluye cultivar el microorganismo productor de acetil-CoA en un estado en que el microorganismo productor de acetil-CoA entra en contacto con un material de fuente de carbono (a partir de ahora en este documento, proceso de cultivo) y recoger el producto de interés (glutamato) obtenido por el contacto (a partir de ahora en este documento proceso de recogida).

50 De acuerdo con el método de producción de glutamato como el microorganismo productor de acetil-CoA se cultiva en un estado en que el microorganismo productor de acetil-CoA entra en contacto con un material de fuente de carbono, el material de fuente de carbono se asimila por el microorganismo productor de acetil-CoA y el producto de interés puede producirse de forma eficaz mientras se fija dióxido de carbono.

55 El medio de cultivo a usarse para el cultivo puede ser cualquier medio de cultivo empleado habitualmente que incluye una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una sal inorgánica; y un nutriente traza orgánico tal como un aminoácido o vitaminas según lo necesario. Puede usarse un medio de cultivo sintético o un medio de cultivo natural. La fuente de carbono y la fuente de nitrógeno usada en el medio de cultivo puede ser de cualquier tipo que pueda utilizarse por los microorganismos a cultivarse.

60 Ejemplos del material de fuente de carbono que puede usarse incluyen azúcares tales como glucosa, glicerol, fructosa, sacarosa, maltosa, manosa, galactosa, hidrolizados de almidón y melazas; y ácidos orgánicos tales como ácido acético o ácido cítrico, y alcoholes tales como etanol pueden usarse individualmente o en combinación con otras fuentes de carbono.

65

Ejemplos de la fuente de nitrógeno que puede usarse incluyen amoníaco, sales de amonio tales como sulfato de amonio, carbonato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio o acetato de amonio, y sales de ácido nítrico.

5 Ejemplos del micronutriente orgánico que puede usarse incluyen aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos y ácidos nucleicos; y peptonas, casaminoácidos, extractos de levadura e hidrolizados de proteína de soja, cada uno de los cuales contiene los ingredientes anteriores. En un caso en que se usa un mutante auxotrófico que requiere un aminoácido y similar para su crecimiento, es preferible suministrar un nutriente que es necesario.

10 Ejemplos de la sal inorgánica que puede usarse incluyen sales de ácido fosfórico, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro y sales de manganeso.

15 El cultivo se realiza preferiblemente a una temperatura de fermentación de 20 °C a 45 °C a un pH de 3 a 9 en aireación. Para ajustar el pH, puede usarse una sustancia ácida o alcalina, inorgánica u orgánica, gas amoníaco, etc. Se acumula L-aminoácido en el medio de cultivo o en las células cultivando el microorganismo preferiblemente durante 10 horas hasta 120 horas en estas condiciones.

20 En un caso en que el L-aminoácido de interés es L-glutamato, el cultivo puede realizarse de modo que el L-glutamato producido se precipite y acumule en el medio de cultivo, usando un medio líquido cuyas condiciones se ajustan para precipitar L-glutamato. Por ejemplo, las condiciones para precipitar L-glutamato pueden ser un pH de 5,0 a 4,0, preferiblemente un pH de 4,5 a 4,0, más preferiblemente un pH de 4,3 a 4,0, aún más preferiblemente un pH de 4,0. Para conseguir tanto un crecimiento aumentado en condiciones ácidas como una precipitación eficaz de L-glutamato, el pH es preferiblemente de 5,0 a 4,0, más preferiblemente de 4,5 a 4,0, aún más preferiblemente de 4,3 a 4,0. El cultivo al pH descrito anteriormente puede realizarse a través del período de cultivo completo o durante una parte del período de cultivo.

25 El L-aminoácido puede recogerse del líquido de cultivo después de completarse el cultivo de acuerdo con un método de recogida conocido. Por ejemplo, la recogida puede realizarse por un método en que se realiza la cristalización por concentración después de la retirada de las células bacterianas de un medio de cultivo, o por cromatografía de intercambio iónico. En un caso en que el cultivo se realizó en condiciones que permite la precipitación de L-glutamato en un medio de cultivo, el L-glutamato precipitado en el medio de cultivo puede recogerse por separación por centrifugación, filtración o similares. En dichos casos, el L-glutamato que permanece disuelto en el medio de cultivo puede cristalizarse y el L-glutamato cristalizado puede aislarse en conjunto.

35 Ejemplos de métodos para producir prolina, leucina, isoleucina, valina, arginina, citrulina, ornitina, ácido acético, (poli)ácido 3-hidroxi-butírico, ácido itacónico, ácido cítrico, ácido butírico o ácido poliglutámico incluyen métodos descritos en Fermentation Handbook (Kyoritsu Shuppan Co., Ltd.).

40 Ejemplos de métodos para producir ácido 4-aminobutírico incluyen un método de producción usando un microorganismo obtenido introduciendo glutamato descarboxilasa en un microorganismo productor de glutamato, y que se describe en, por ejemplo, JP-A n.º 2011-167097.

45 Ejemplos de métodos para producir ácido 4-hidroxi-butírico incluyen un método de producción usando un microorganismo obtenido introduciendo glutamato descarboxilasa, aminotransferasa y aldehído deshidrogenasa a un microorganismo productor de glutamato, y que se describe en, por ejemplo, JP-A n.º 2009-171960.

Ejemplos de métodos para producir ácido 3-hidroxiisobutírico incluyen un método de producción usando un microorganismo en que se introdujo la ruta descrita en, por ejemplo, el documento WO 2009/135074 o el documento WO 2008/145737.

50 Ejemplos de métodos para producir ácido 2-hidroxiisobutírico incluyen un método de producción usando un microorganismo en que se introdujo la ruta descrita en, por ejemplo, el documento WO 2009/135074 o el documento WO 2009/156214.

55 Ejemplos de métodos para producir ácido 3-aminoisobutírico o ácido metacrílico incluyen un método de producción usando un microorganismo en que se introdujo la ruta descrita en, por ejemplo, el documento WO 2009/135074.

Ejemplos

60 A partir de ahora en este documento, se describen en detalle ejemplos de la presente invención. Sin embargo, la invención de ningún modo limita estos ejemplos.

[Ejemplo 1]

<Preparación de variante de *Escherichia coli* B, de genoma atoD potenciado>

65

Se conoce la secuencia completa del ADN genómico de *Escherichia coli* MG1655 (número de acceso a GenBank U00096), y también se ha informado de la secuencia de bases de un gen que codifica la subunidad α de la CoA transferasa (a veces mencionada a partir de ahora en este documento abreviado como "atoD") de *Escherichia coli* MG1655. Es decir, atoD se describe en 2321469 a 2322131 de la secuencia genómica de *Escherichia coli* MG1655, que se describe en el número de acceso a GenBank U00096.

Como secuencia de bases de un promotor necesario para expresar el gen mencionado anteriormente, puede usarse la secuencia promotora de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (a partir de ahora en este documento mencionada a veces como "GAPDH") derivada de *Escherichia coli*, que se describe en 397 a 440 en la información de secuencia de bases con el número de acceso a GenBank X02662. Para obtener el promotor de GAPDH, se realizó amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando CGCTCAATTGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO: 1) y ACAGAATTCGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO: 2) como cebadores y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *MfeI* y *EcoRI*, obteniendo de ese modo un fragmento de ADN de aproximadamente 100 pb que codifica el promotor de GAPDH. El fragmento de ADN obtenido y un fragmento obtenido por digestión del plásmido pUC19 (número de acceso a GenBank X02514) con la enzima de restricción *EcoRI* seguido por tratamiento con fosfatasa alcalina se mezclaron, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (DNA-903, fabricado por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Se cultivaron individualmente diez de las colonias obtenidas a 37 °C durante una noche en un medio líquido LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina, y se recuperaron los plásmidos, y se seleccionaron los plásmidos de los cuales no se cortó el promotor de GAPDH cuando se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*. Además, se comprobó la secuencia de ADN de los mismos, y un plásmido en que se insertó apropiadamente el promotor de GAPDH se llamó pUCgapP. El pUCgapP obtenido se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*.

Además, para obtener atoD, se realizó amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando CGAATTCGCTGGTGGAAACATATGAAAACAAAATTGATGACATTACAAGAC (SEQ ID NO: 3) y GCGGTACCTTATTTGCTCTCCTGTGAAACG (SEQ ID NO: 4) como cebadores, y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*, obteniendo de ese modo un fragmento atoD de aproximadamente 690 pb. Este fragmento de ADN se mezcló con pUCgapP que se había digerido previamente con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*. Los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (DNA-903, fabricado por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que atoD estaba insertado apropiadamente. El plásmido obtenido se llamó pGAPatoD.

Aquí, *Escherichia coli* MG1655 está disponible en la American Type Culture Collection.

Como se ha descrito anteriormente, también se ha informado de la secuencia de bases de atoD en el ADN genómico de *Escherichia coli* MG1655. Se realizó PCR usando ADN genómico de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando GCTCTAGATGCTGAAATCCACTAGTCTTGTC (SEQ ID NO: 5) y TACTGCAGCGTTCCAGCACCTTATCAACC (SEQ ID NO: 6) como cebadores, que se prepararon basándose en la información génica de la región flanqueante 5' de atoD de *Escherichia coli* MG1655, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,1 kpb.

Además, se realizó PCR usando el vector de expresión pGAPatoD preparado anteriormente como molde, y usando GGTCTAGAGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO: 7) preparada basándose en la información de secuencia del promotor de GAPDH de *Escherichia coli* MG1655 y un cebador de la SEQ ID NO: 4 preparado basándose en la información de secuencia de atoD de *Escherichia coli* MG1655, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 790 pb que tenía el promotor de GAPDH y atoD.

Los fragmentos obtenidos de lo anterior se digirieron con las enzimas de restricción *PstI* y *XbaI*, y *XbaI* y *KpnI*, respectivamente, y los fragmentos resultantes se mezclaron con un fragmento obtenido digiriendo un plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 (número de acceso a GenBank AB019610) [Hashimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)] con *PstI* y *KpnI*, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células DH5 α con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol a 30 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante una noche en un medio líquido LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, y se recuperaron plásmidos de las células bacterianas obtenidas. Se transformó *Escherichia coli* B (ATCC 11303) con el plásmido, y se cultivó a 30 °C durante una noche en una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en medio líquido LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Las células bacterianas cultivadas obtenidas se aplicaron a una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 42 °C, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias. Las colonias obtenidas se cultivaron en un medio líquido LB que no contenía

antibiótico a 30 °C durante 2 horas, y el cultivo resultante después se aplicó a una placa de agar LB que no contenía antibiótico, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se picaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una se cultivó individualmente en una placa de agar LB libre de antibiótico y también en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron las colonias sensibles a cloranfenicol. Además, se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 790 pb que contenía el promotor de GAPDH y atoD, a partir del ADN cromosómico de estos clones, y se seleccionó una variante en que una región promotora de atoD estaba remplazada por el promotor de GAPDH. Después, un clon que satisfacía las condiciones anteriores se llamó variante de *Escherichia coli* B, de genoma atoD potenciado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante B::atoDAB").

Aquí, *Escherichia coli* B (ATCC 11303) está disponible en la American Type Culture Collection, que es un banco de células, microorganismos y genes.

[Ejemplo 2]

<Preparación de variante de *Escherichia coli* B, de genoma atoD potenciado, gen pgi deletado>

Se conoce la secuencia completa del ADN genómico de *Escherichia coli* MG1655 (número de acceso a GenBank U00096), y también se ha informado de la secuencia de bases de un gen que codifica la fosfoglucoisomerasa (a partir de ahora en este documento a veces mencionada como "pgi") de *Escherichia coli* (número de acceso a GenBank C15196). Para clonar una región que flanquea la secuencia de bases del gen que codifica pgi (1.650 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por CAGGAATTCGCTATATCTGGCTCTGCACG (SEQ ID NO: 8), CAGTCTAGAGCAATACTCTTCTGATTTTGGAG (SEQ ID NO: 9), CAGTCTAGATCATCGTCGATATGTAGGCC (SEQ ID NO: 10), y GACCTGCAGATCATCCGTCAGCTGTACGC (SEQ ID NO: 11). El cebador de la SEQ ID NO: 8 tiene un sitio de reconocimiento de *EcoRI* en el lado del extremo 5' del mismo, cada uno de los cebadores de las SEQ ID NO: 9 y 10 tienen un sitio de reconocimiento de *XbaI* en el lado del extremo 5' del mismo, y el cebador de la SEQ ID NO: 11 tiene un sitio de reconocimiento de *PstI* en el lado del extremo 5' del mismo.

Se preparó el ADN genómico de *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 700926) y se realizó PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento pgi-L"). Además, se realizó PCR usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento pgi-R"). Estos fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron. El fragmento pgi-L se digirió con *EcoRI* y *XbaI* y el fragmento pgi-R se digirió con *XbaI* y *PstI*. Los dos tipos de fragmento digeridos y un fragmento obtenido por digestión de un plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 (número de acceso a GenBank AB019610) con *EcoRI* y *PstI* se mezclaron, y se permitió que reaccionaran usando ADN ligasa T4. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol a 30 °C. El plásmido se recuperó de los transformantes obtenidos y se confirmó que los dos fragmentos - el fragmento de la región flanqueante cadena arriba 5' y el fragmento de la región flanqueante cadena abajo 3' del gen que codifica pgi - estaban insertados apropiadamente en pTH18cs1. El plásmido obtenido se digirió con *XbaI* y después se sometió a tratamiento de extremos romos con la ADN polimerasa T4. El fragmento de ADN resultante se mezcló con un gen de resistencia a kanamicina obtenido por digestión del plásmido pUC4K (número de acceso a GenBank X06404) (Pharmacia) con *EcoRI* y sometiendo el producto resultante a tratamiento de extremos romos con ADN polimerasa T4, y los fragmentos mezclados se ligaron usando la ADN ligasa T4. Posteriormente, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de kanamicina a 30 °C. Se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos, y se confirmó que el gen de resistencia a kanamicina estaba apropiadamente insertado entre el fragmento de la región flanqueante cadena arriba 5' y el fragmento de la región flanqueante cadena abajo 3' del gen que codifica pgi. El plásmido obtenido se llamó pTH18cs1-pgi.

Aquí, *Escherichia coli* MG1655 puede obtenerse de la American Type Culture Collection.

Las variantes B::atoDAB preparadas en el Ejemplo 1 se transformaron con el plásmido así obtenido pTH18cs1-pgi, y se cultivó a 30 °C durante una noche en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de kanamicina, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina, y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Posteriormente, parte del líquido de cultivo resultante se aplicó a una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina, y se aplicaron a una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se picaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una se cultivó individualmente en una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron los clones sensibles a cloranfenicol que crecieron solamente en la placa de agar LB que contenía kanamicina. Además, se amplificaron los ADN cromosómicos de estos clones diana por PCR, y se seleccionó una variante de la cual podía amplificarse un fragmento de aproximadamente 3,3 kpb, que indica

5 remplazo del gen *pgi* por el gen de resistencia a kanamicina. La variante obtenida se llamó variante de *Escherichia coli* B, de genoma *atoD* potenciado, gen *pgi* deleciónado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante B::*atoDABApgi*").

10 Aquí, *Escherichia coli* MG1655 y *Escherichia coli* B están disponibles en la American Type Culture Collection.

[Ejemplo 3]

15 <Preparación de variante de *Escherichia coli* B :: de genoma *atoD* potenciado, gen *pgi* deleciónado, gen *gntR* deleciónado>

Se conoce la secuencia completa del ADN genómico de *Escherichia coli* B (número de acceso a GenBank CP000819), y la secuencia de bases que codifica *GntR* se describe en 3509184 a 3510179 de la secuencia genómica de *Escherichia coli* B, que se describe en el número de acceso a GenBank CP000819. Para clonar una región que flanquea la secuencia de bases del gen que codifica *GntR* (*gntR*), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por GGAATTCGGGTCAATTTTCACCCCTCTATC (SEQ ID NO: 12), GTGGGCCGTCCTGAAGGTACAAAAGAGATAGATTCTC (SEQ ID NO: 13), CTCTTTTGTACCTTCAGGACGGCCCAAAATTTGAAG (SEQ ID NO: 14), y GGAATTCAGCCCGCAAGGCCGATGGC (SEQ ID NO: 15). Cada uno de los cebadores de las SEQ ID NO: 12 y 13 tienen un sitio de reconocimiento de *EcoRI* en el lado del extremo 5' del mismo.

Se preparó el ADN genómico de *Escherichia coli* B (número de acceso a GenBank CP000819) y se realizó PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y un par de cebadores de la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 13, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (mencionado a veces a partir de ahora en este documento como "fragmento *gntR-L*"). Además, se realizó PCR usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 15, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento *gntR-R*"). Estos fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron. Se realizó PCR usando los fragmentos *gntR-L* y *gntR-R* como moldes y usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 15, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,0 kpb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento *gntR-LR*"). Este fragmento *gntR-LR* se separó por electroforesis en agarosa, se recuperó, se digirió con *EcoRI* y se mezcló con un fragmento obtenido por digestión de un plásmido sensible a temperatura *pTH18cs1* (número de acceso a GenBank AB019610) con *EcoRI*. Se permitió que los fragmentos mezclados reaccionaran usando ADN ligasa T4. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol a 30 °C. Se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos, y se confirmó que el fragmento *gntLR* estaba insertado apropiadamente en *pTH18cs1*. El plásmido obtenido se llamó *pTH18cs1-gntR*.

45 La variante de *Escherichia coli* B::*atoDABApgi* preparada en el Ejemplo 2 se transformó con el plásmido así obtenido *pTH18cs1-gntR*, y se cultivó a 30 °C durante una noche en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Posteriormente, parte del líquido de cultivo se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB, y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se picaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una se cultivó individualmente en una placa de agar LB y en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones sensibles a cloranfenicol. Además, se amplificaron los ADN cromosómicos de estos clones diana por PCR, y se seleccionó una variante de la cual podía amplificarse un fragmento de aproximadamente 2.0 kpb, que indica deleción del gen *gntR*. La variante obtenida se llamó variante de *Escherichia coli* B, de genoma *atoD* potenciado, gen *pgi* deleciónado, gen *gntR* deleciónado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante B::*atoDABApgiΔgntR*").

[Ejemplo 4]

65 <Preparación de variante de *Escherichia coli* B, de genoma *atoD* potenciado, gen *pgi* deleciónado, gen *gntR* deleciónado, gen *gnd* deleciónado>

Para clonar una región que flanquea la secuencia de bases del gen que codifica la fosfogluconato deshidrogenasa (gnd), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por CGCCATATGAATGGCGCGGGCGGGGCCGGTGG (SEQ ID NO: 16), TGGAGCTCTGTTTACTCCTGTCAGGGGG (SEQ ID NO: 17), TGGAGCTCTCTGATTTAATCAACAATAAAATTG (SEQ ID NO: 18), y CGGGATCCACCACCATAACCAAACGACGG (SEQ ID NO: 19). El cebador de la SEQ ID NO: 16 tiene un sitio de reconocimiento de *NdeI* en el lado del extremo 5' del mismo, y cada uno de los cebadores de las SEQ ID NO: 17 y 18 tienen un sitio de reconocimiento de *SacI* en el lado del extremo 5' del mismo. Además, el cebador de la SEQ ID NO: 19 tiene un sitio de reconocimiento de *BamHI* en el lado del extremo 5' del mismo.

Se preparó el ADN genómico de *Escherichia coli* B (número de acceso a GenBank CP000819) y se realizó PCR usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 17, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (mencionado a veces a partir de ahora en este documento como "fragmento gnd-L"). Además, se realizó PCR usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento gnd-R"). Estos fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron. El fragmento gnd-L se digirió con *NdeI* y *SacI*, y el fragmento gnd-R se digirió con *SacI* y *BamHI*. Estos dos tipos de fragmentos digeridos se mezclaron con un fragmento obtenido digiriendo un plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 (número de acceso a GenBank AB019610) con *NdeI* y *BamHI*, y se permitió que los fragmentos mezclados reaccionaran usando la ADN ligasa T4. Después de ello, se transformaron células competentes (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en la placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol a 30 °C. Los plásmidos se recuperaron de los transformantes obtenidos, y se confirmó que los dos fragmentos - el fragmento de la región flanqueante cadena arriba 5' y el fragmento de la región flanqueante cadena abajo 3' del gen que codifica gnd - estaban insertados apropiadamente en pTH18cs1. El plásmido obtenido se llamó pTH18cs1-gnd.

La variante *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgntR preparada en el Ejemplo 3 se transformó con el plásmido así obtenido pTH18cs1-gnd, y se cultivó a 30 °C durante una noche en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante una noche. A continuación, parte de este líquido de cultivo se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de kanamicina, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB, y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron se picaron aleatoriamente 100 colonias y cada una se cultivó individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron los clones sensibles a cloranfenicol. Además, se amplificaron por PCR los ADN cromosómicos de estos clones diana y se seleccionó una variante de la cual se podía amplificar un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb, que indica delección del gen gnd. La variante obtenida se llamó variante de *Escherichia coli* B, de genoma atoD potenciado, gen pgi deleccionado, gen gntR deleccionado, gen gnd deleccionado (variante B::atoDABΔpgiΔgntRΔgnd).

[Ejemplo 5]

<Preparación de variante de *Escherichia coli* B, de genoma atoD potenciado, gen pgi deleccionado, gen gntR deleccionado, gen gnd deleccionado, gen ldhA deleccionado>

Para clonar una región que flanquea la secuencia de bases del gen que codifica la D-lactato deshidrogenasa (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "ldhA") (990 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por GGAATTCGACCATCGCTTACGGTCAATTG (SEQ ID NO: 20), GAGCGGCAAGAAAGACTTTCTCCAGTGATGTTG (SEQ ID NO: 21), GGAGAAAGTCTTTCTTGCCGCTCCCCTGCAAC (SEQ ID NO: 22) y GGAATCTTTAGCAAATGGCTTTCTTC (SEQ ID NO: 23). Cada uno de los cebadores de las SEQ ID NO: 20 y 23 tiene un sitio de reconocimiento de *EcoRI* en el lado del extremo 5' del mismo.

Se preparó el ADN genómico de *Escherichia coli* B (número de acceso a GenBank CP000819) y se realizó PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y un par de cebadores de la SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento ldhA-L"). Además, se realizó PCR usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 23, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento ldhA-R"). Estos fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron. Se realizó PCR usando los fragmentos ldhA-L e ldhA-R como moldes y usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 23, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,0 kpb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento ldhA-LR"). Este fragmento ldhA-LR se separó por electroforesis en agarosa, se recuperó, se digirió con *EcoRI* y se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 (número de acceso a GenBank AB019610) con *EcoRI*. Se permitió que los fragmentos

mezclados reaccionaran usando la ADN ligasa T4. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol a 30 °C. Se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos y se confirmó que el fragmento de *ldhA*-LR estaba apropiadamente insertado en pTH18cs1. El plásmido obtenido se llamó pTH18cs1-*ldhA*.

La variante de *Escherichia coli* B::atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd preparada en el Ejemplo 4 se transformó con el plásmido así obtenido pTH18cs1-*ldhA* y se cultivó a 30 °C durante una noche en una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Posteriormente, parte del líquido de cultivo se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB, y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron se picaron aleatoriamente 100 colonias y cada una se cultivó individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron los clones sensibles a cloranfenicol. Además, se amplificaron por PCR los ADN cromosómicos de estos clones diana, y se seleccionó una variante de la cual podía amplificarse un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb, que indica delección del gen *ldhA*. La variante obtenida se llamó variante de *Escherichia coli* B, de genoma atoD potenciado, gen *pgi* deleccionado, gen *gntR* deleccionado, gen *gnd* deleccionado, gen *ldhA* deleccionado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante B::atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd Δ ldhA").

[Ejemplo 6]

<Preparación de variante de *Escherichia coli* B, de genoma atoD potenciado, gen *pgi* deleccionado, gen *gntR* deleccionado, gen *gnd* deleccionado, gen *ldhA* deleccionado, gen *aceBA* deleccionado>

Para clonar una región que flanquea la secuencia de bases del gen que codifica la isocitrato liasa y el gen que codifica la malato sintasa (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "aceBA") (2936 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representador por GGAATTCATTCAGCTGTTGCGCATCGATTC (SEQ ID NO: 24), CGGTTGTTGTTGCCGTGCAGCTCCTCGTCATGGATC (SEQ ID NO: 25), GGAGCTGCACGGCAACAACCGTTGCTGACTG (SEQ ID NO: 26) y GGAATTCAGGCAGGTATCAATAAATAAC (SEQ ID NO: 27). Cada uno de los cebadores de las SEQ ID NO: 24 y 27 tienen un sitio de reconocimiento de *EcoRI* en el lado del extremo 5' del mismo.

Se preparó el ADN genómico de *Escherichia coli* B (número de acceso a GenBank CP000819) y se realizó PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y un par de cebadores de la SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento aceBA-L"). Además, se realizó PCR usando un par de cebadores de las SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento aceBA-R"). Estos fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron. Se realizó PCR usando los fragmentos aceBA-L y aceBA-R como moldes y usando un par de cebadores de las SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 27, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,0 kpb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento aceBA-LR"). Este fragmento aceBA-LR se separó por electroforesis en agarosa, se recuperó, se digirió con *EcoRI* y se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo un plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 (número de acceso a GenBank AB019610) con *EcoRI*. Se permitió que los fragmentos mezclados reaccionaran usando la ADN ligasa T4. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol a 30 °C. Se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos y se confirmó que el fragmento aceBA-LR estaba apropiadamente insertado en pTH18cs1. El plásmido obtenido se llamó pTH18cs1-aceBA.

La variante de *Escherichia coli* B::atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd Δ ldhA preparada en el Ejemplo 5 se transformó con el plásmido así obtenido pTH18cs1-aceBA y se cultivó a 30 °C durante una noche en una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Posteriormente, parte del líquido de cultivo se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron se picaron aleatoriamente 100 colonias y cada una se cultivó individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones

sensibles a cloranfenicol. Además, se amplificaron por PCR los ADN cromosómicos de estos clones diana, y se seleccionó una variante de la cual podía amplificarse un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb, que indica delección del gen *aceBA*. La variante obtenida se llamó variante de *Escherichia coli* B, de genoma *atoD* potenciado, gen *pgi* deleccionado, gen *gntR* deleccionado, gen *gnd* deleccionado, gen *ldhA* deleccionado, gen *aceBA* deleccionado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante B::*atoDABΔpgiΔgntRΔgndΔldhAΔaceBA*").

[Ejemplo 7]

<Preparación de variante de *Escherichia coli* B, de genoma *atoD* potenciado, gen *pgi* deleccionado, gen *gntR* deleccionado, gen *gnd* deleccionado, gen *ldhA* deleccionado, gen *aceBA* deleccionado, gen *glcB* deleccionado>

Para clonar una región que flanquea la secuencia de bases del gen que codifica la malato sintasa G (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como " *glcB*") (723 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por GGAATTCCAGGAGAAAGGGCTGGCAGGG (SEQ ID NO: 28), CTTTTTGACGCTATGTTTATCTCCTCGTTTTCGC (SEQ ID NO: 29), GAGATAAACATAGCGTCAAAAAGCCCGGC (SEQ ID NO: 30) y GGAATTCCGTCCATCATTGCTACCAGCC (SEQ ID NO: 31). Cada uno de los cebadores de las SEQ ID NO: 28 y 31 tiene un sitio de reconocimiento de *EcoRI* en el lado del extremo 5' del mismo.

Se preparó el ADN genómico de *Escherichia coli* B (número de acceso a GenBank CP000819) y se realizó PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y un par de cebadores de la SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento *glcB-L* "). Además, se realizó PCR usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento *glcB-R*"). Estos fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron. Se realizó PCR usando los fragmentos *glcB-L* y *glcB-R* como moldes y usando un par de cebadores de la of SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 31, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,0 kpb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento *glcB-LR* "). Este fragmento *glcB-LR* se separó por electroforesis en agarosa, se recuperó, se digirió con *EcoRI* y se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo un plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 (número de acceso a GenBank AB019610) con *EcoRI*. Se permitió que los fragmentos mezclados reaccionaran usando ADN ligasa T4. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 μg/ml de cloranfenicol a 30 °C. Se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos, y se confirmó que el fragmento *glcB-LR* estaba apropiadamente insertado en pTH18cs1. El plásmido obtenido se llamó pTH18cs1-*glcB*.

La variante de *Escherichia coli* B::*atoDABΔpgiΔgntRΔgndΔldhAΔaceB* preparada en el Ejemplo 6 se transformó con el plásmido así obtenido pTH18cs1-*glcB* y se cultivó a 30 °C durante una noche en una placa de agar LB que contenía 10 μg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 μg/ml de cloranfenicol, y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Posteriormente, parte del líquido de cultivo se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 μg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB, y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se picaron aleatoriamente 100 colonias y cada una se cultivó individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 μg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron los clones sensibles a cloranfenicol. Además, se amplificaron por PCR los ADN cromosómicos de estos clones diana, y se seleccionó una variante de la cual podía amplificarse un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb, que indica delección del gen *glcB*. La variante obtenida se llamó variante de *Escherichia coli* B, de genoma *atoD* potenciado, gen *pgi* deleccionado, gen *gntR* deleccionado, gen *gnd* deleccionado, gen *ldhA* deleccionado, gen *aceBA* deleccionado, gen *glcB* deleccionado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante B::*atoDABΔpgiΔgntRΔgndΔldhAΔaceBAΔglcB*").

[Ejemplo 8]

<Preparación de variante de *Escherichia coli* B, de genoma *atoD* potenciado, gen *pgi* deleccionado, gen *gntR* deleccionado, gen *gnd* deleccionado, gen *ldhA* deleccionado, gen *aceBA* deleccionado, gen *glcB* deleccionado, gen *fumAC* deleccionado>

Para clonar una región que flanquea la secuencia de bases del gen que codifica la fumarato hidratasa A y el gen que codifica la fumarato hidratasa C (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "fumAC") (3193 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por CGCCATATGATCGCCAGCGCGGGATTTTTTC (SEQ ID NO: 32), CGAGCTCTGTTCTCTCACTTACTGCCTGG (SEQ ID NO: 33), ATGAGCTCTCTGCAACATACAGGTGCAG (SEQ ID NO: 34) y

CGGGATCCACTACGCGCACGATGGTCAAG (SEQ ID NO: 35). El cebador de la SEQ ID NO: 32 tiene un sitio de reconocimiento de *NdeI* en el lado del extremo 5' del mismo. Cada uno de los cebadores de las SEQ ID NO: 33 y 34 tienen un sitio de reconocimiento de *SacI* en el lado del extremo 5' del mismo. El cebador de la SEQ ID NO: 35 tiene un sitio de reconocimiento de *BamHI* en el lado del extremo 5' del mismo.

Se preparó el ADN genómico de *Escherichia coli* B (número de acceso a GenBank CP000819) y se realizó PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y un par de cebadores de la SEQ ID NO: 32 y la SEQ ID NO: 33, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento fumA-L"). Además, se realizó PCR usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento fumC-R"). Estos fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron. El fragmento fumA-L se digirió con *NdeI* y *SacI*, y el fragmento fumC-R se digirió con *SacI* y *BamHI*. Estos fragmentos digeridos se mezclaron con un fragmento obtenido digiriendo un plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 (número de acceso a GenBank AB019610) con *NdeI* y *BamHI*. Se permitió que los fragmentos mezclados reaccionaran usando ADN ligasa T4. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol a 30 °C. Se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos, y se confirmó que el fragmento fumA-L y el fragmento fumC-R estaban apropiadamente insertados en pTH18cs1. El plásmido obtenido se llamó pTH18cs1-fumAC.

La variante de *Escherichia coli* B::atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd Δ ldhA Δ aceBA Δ glcB preparada en el Ejemplo 7 se transformó con el plásmido así obtenido pTH18cs1-fumAC, y se cultivó a 30 °C durante una noche en una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Posteriormente, parte del líquido de cultivo se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se picaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una se cultivó individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones sensibles a cloranfenicol. Además, se amplificaron por PCR los ADN cromosómicos de estos clones diana, y se seleccionó una variante de la cual podría amplificarse un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb, que indica delección del gen fumAC. La variante obtenida se llamó variante de *Escherichia coli* B, de genoma atoD potenciado, gen pgi deleccionado, gen gntR deleccionado, gen gnd deleccionado, gen ldhA deleccionado, gen aceBA deleccionado, gen glcB deleccionado, gen fumAC deleccionado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante B::atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd Δ ldhA Δ aceBA Δ glcB Δ fumAC").

[Ejemplo 9]

<Preparación del plásmido plaz>

La acetoacetato descarboxilasa de bacterias *Clostridium* se describen en el número de acceso a GenBank M55392, y la alcohol isopropílico deshidrogenasa de bacterias *Clostridium* se describen en el número de acceso a GenBank AF157307.

Como secuencia de bases de un promotor necesario para expresar el grupo génico mencionado anteriormente, puede usarse la secuencia promotora de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (a partir de ahora en este documento a veces mencionada como " GAPDH") de *Escherichia coli*, que se describe en 397 a 440 en la información de secuencia de bases con un número de acceso a GenBank X02662.

Para obtener el promotor de GAPDH, se realizó amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando CGAGCTACATATGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO: 36) y CGCGCGCATGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO: 37), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *SphI*, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 110 pb correspondiente al promotor de GAPDH. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pBR322 (número de acceso a GenBank J01749) con las enzimas de restricción *NdeI* y *SphI*, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante una noche en un medio líquido LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina, y se recuperó el plásmido pBRgapP de las células bacterianas obtenidas.

Para obtener el gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa, se realizó amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 como molde y usando

AATATGCATGCTGGTGGAAACATATGAAAGTTTTGCAATGCTAGG (SEQ ID NO: 38) y ACGCGTCGACTTATAATACTACTGCTTTAATTAAGTC (SEQ ID NO: 39), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *SphI* y *SaI*, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de la alcohol isopropílico deshidrogenasa de aproximadamente 1,1 kpb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pUC119 con las enzimas de restricción *SphI* y *SaI*, y estos fragmentos se ligaron juntos usando ligasa. Después de ello se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante una noche en un medio líquido LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina y se recuperaron los plásmidos de las células bacterianas obtenidas. Se confirmó la inserción correcta de IPAdh y el plásmido obtenido se llamó pUC-I.

El fragmento que tiene IPAdh obtenido digiriendo el plásmido pUC-I con las enzimas de restricción *SphI* y *EcoRI* se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pBRgapP con las enzimas de restricción *SphI* y *EcoRI*, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante una noche en un medio líquido LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina, y se recuperaron plásmidos de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que IPAdh estaba apropiadamente insertado. El plásmido obtenido se llamó pGAP-I.

Para obtener el gen de la aceto acetato descarboxilasa, se realizó amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 como molde y usando ACGCGTCGACGCTGGTGGAAACATATGTTAAAGGATGAAGTAATTAACAAATTAGC (SEQ ID NO: 40) y GCTCTAGAGGTACCTTAAGATAATCATATATAAATTTCAGC (SEQ ID NO: 41), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *SaI* y *XbaI*, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de la acetoacetato descarboxilasa de aproximadamente 700 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pGAP-1 preparado anteriormente con las enzimas de restricción *SaI* y *XbaI*, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante una noche en un medio líquido LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina, y se recuperaron plásmidos de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que *adc* estaba correctamente insertado. El plásmido obtenido se llamó pla.

Para obtener el gen de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (*zwf*), se realizó amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de *Escherichia coli* B (número de acceso a GenBank CP000819) como molde y usando GCTCTAGACGGAGAAAGTCTTATGGCGGTAACGCAAACAGCCCAGG (SEQ ID NO: 42) y CGGGATCCCGGAGAAAGTCTTATGAAGCAAACAGTTTATATCGCC (SEQ ID NO: 43), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *XbaI*, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa de aproximadamente 1.500 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pla preparado anteriormente con las enzimas de restricción *BamHI* y *XbaI*, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante una noche en un medio líquido LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina, y este plásmido se llamó plaz.

[Ejemplo 10]

<Preparación del plásmido pMWGKC>

Se realizó la amplificación por un método de PCR usando pBRgapP como molde y usando CCGCTCGAGCATATGCTGTCGCAATGATTGACACG (SEQ ID NO: 44) y GCTATTCCATATGCAGGGTTATTGTCTCATGAGC (SEQ ID NO: 45), y el fragmento de ADN obtenido se fosforiló usando la polinucleótido quinasa T4 (Takara), como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN que albergaba el promotor de GAPDH. Además, el plásmido pMW 119 (número de acceso a GenBank AB005476) se trató con las enzimas de restricción *AatII* y *NdeI*, y el fragmento de ADN obtenido se sometió a tratamiento de extremos romos con ADN polimerasa KOD plus (Takara), como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN que albergaba el origen de replicación de pMW119. El fragmento de ADN que albergaba el promotor de GAPDH y el fragmento de ADN que albergaba el origen de replicación de pMW119 se mezclaron, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante una noche en un medio líquido LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina, y se recuperó el plásmido pMWG de las células bacterianas obtenidas.

Para obtener un gen de resistencia a cloranfenicol, se realizó amplificación por un método de PCR usando pTH18cs1 (número de acceso a GenBank AB019610) como molde y usando TCGGCACGTAAGAGGTTCC (SEQ ID NO: 46) y CGGGTCAATTTGCTTTTCG (SEQ ID NO: 47), y el fragmento de ADN obtenido se fosforiló usando la polinucleótido quinasa T4 (Takara), como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN que albergaba un gen

de resistencia a cloranfenicol. Se realizó amplificación por un método de PCR usando pMWG como molde y usando CTAGATCTGACAGTAAGACGGGTAAGCC (SEQ ID NO: 48) y CTAGATCTCAGGGTTATTGTCTCATGAGC (SEQ ID NO: 49). El fragmento de ADN obtenido se mezcló con el fragmento de ADN que contenía el gen de resistencia a cloranfenicol, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 25 μ g/ml de cloranfenicol. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante una noche en un medio líquido LB que contenía 25 μ g/ml de cloranfenicol, y el plásmido obtenido se llamó pMWGC.

Se realizó amplificación por un método de PCR usando el gen pMWGC como molde y usando CCGCTCGAGCATATGCTGTCGCAATGATTGACACG (SEQ ID NO: 50) y GCTATTCCATATGCAGGGTTATTGTCTCATGAGC (SEQ ID NO: 51). Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con el fragmento de ADN obtenido, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 25 μ g/ml de cloranfenicol. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante una noche en un medio líquido LB que contenía 25 μ g/ml de cloranfenicol, y se recuperó el plásmido pMWGKC de las células bacterianas obtenidas.

[Ejemplo 11]

<Construcción del plásmido de expresión para la malato tioquinasa derivada de *Methylobacterium extorquens* IAM12632>

Se adquirió *Methylobacterium extorquens* IAM 12632 de IAM Culture Collection, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, la University de Tokio. IAM 12632 se cultivó en un medio (número de medio: 352, NBRC), y se obtuvo el ADN cromosómico del mismo usando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN).

Se realizó PCR usando el ADN cromosómico de *Methylobacterium extorquens* IAM 12632 como molde y usando AAAAGGCGGAATTCACAAAAAGGATAAAACAATGGACGTTACGAGTACCAAGCC (SEQ ID NO: 52) y CATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGCGAGGTTCTTTTCCGGACTC (SEQ ID NO: 53) como cebadores, y el ADN obtenido se digirió con *Nde*I y *Xba*I, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de la malato tioquinasa. Además, se realizó PCR usando el ADN cromosómico de *Methylobacterium extorquens* como molde y usando GGATCCTCTAGACTGGTGAATATATGAGCTTACCCTGATCCAGCAG (SEQ ID NO: 54) y GGCATGCAAGCTTTTACTTTCCGCCCATCGCGTC (SEQ ID NO: 55) como cebadores, y el ADN obtenido se digirió con *Xba*I y *Hind*III, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de la malil-CoA liasa. El fragmento de la malato tioquinasa y el fragmento de la malil-CoA liasa de *Methylobacterium extorquens* se ligaron en pMWGKC que se había digerido con *Nde*I y *Hind*III, y el plásmido obtenido se llamó pMWGKC_mtk(Mex)_mcl.

pMWGKC_mtk(Mex)_mcl alberga la secuencia de bases del gen mcl (SEQ ID NO: 66), y la secuencia de bases del gen mtkA (SEQ ID NO: 67), y la secuencia de bases del gen mtkB (SEQ ID NO: 68) derivadas de *Methylobacterium extorquens*. Las secuencias de aminoácidos de mcl, mtkA, y mtkB derivadas de *Methylobacterium extorquens* se muestran en las SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y SEQ ID NO: 71, respectivamente.

[Ejemplo 12]

<Construcción del plásmido de expresión para la malato tioquinasa derivada de *Hyphomicrobium methylovorum* NBRC 14180>

Se adquirió *Hyphomicrobium methylovorum* NBRC 14180 de NBRC (Biological Resource Center, Biotechnology Field, National Institute of Technology and Evaluation). NBRC 14180 se cultivó en un medio (número de medio: 233, NBRC), y se obtuvo el ADN cromosómico del mismo usando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN).

Se preparó un cebador (SEQ ID NO: 56) basado en la secuencia de ADN o la región N-terminal de la serina-glioxilato aminotransferasa de NBRC 14180 (número de acceso a GenBank D13739).

Basándose en la secuencia de aminoácidos de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de *Hyphomicrobium denitrificans* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/300021538?from=3218417&to=3221272&report=gbw_ithparts), se comparó la homología de secuencia usando una herramienta de búsqueda de homología de NCBI (National Center for Biotechnology Information) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLASTPROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

Se preparó un cebador (SEQ ID NO: 57) basado en la secuencia de aminoácidos que tiene alta homología.

Se realizó PCR usando los cebadores de la SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 obtenidos como se ha descrito anteriormente y el ADN cromosómico obtenido anteriormente como molde. El fragmento obtenido se ligó en un ADN preparado digiriendo pUC19 con *Sma*I, mediante lo cual se clonó parte del gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa a

partir del gen de la serina-glioxilato aminotransferasa derivado de *Hyphomicrobium methylovorum* NBRC 14180. Después de confirmar la secuencia del clon, se prepararon los cebadores (SEQ ID NO: 58 y 59).

5 Se realizó PCR usando el ADN cromosómico de *Hyphomicrobium methylovorum* NBRC 14180 como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 58 y 59 obtenidos como se ha descrito anteriormente, y el ADN obtenido se digirió con *EcoRI* y *XbaI*, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN que contenía los genes *mcl* y *mtk* de *Hyphomicrobium*. Además, se digirió el plásmido descrito anteriormente pMWGKC_mtk(Mex)_mcl con *EcoRI* y *XbaI*, y se recuperó un fragmento de aproximadamente 4,3 kb que contenía *mcl*. Este fragmento obtenido se ligó al fragmento de ADN que contenía los genes *mcl* y *mtk* de *Hyphomicrobium*. El plásmido obtenido se llamó pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl.

10 pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl contiene la secuencia de bases del gen *mcl* (SEQ ID NO: 60), la secuencia de bases del gen *mtkA* (SEQ ID NO: 61) y la secuencia de bases del gen *mtkB* (SEQ ID NO: 62) derivadas de *Hyphomicrobium methylovorum*. Las secuencias de aminoácidos de *mcl*, *mtkA*, y *mtkB* derivadas de *Hyphomicrobium methylovorum* son como se muestran en las SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74, respectivamente.

[Ejemplo 13]

20 <Construcción del plásmido de expresión para la malato tioquinasa derivada de *Rhizobium* sp. NGR234>

Basándose en la información de secuencia de aminoácidos de la subunidad beta de la malato tioquinasa (número de acceso a GenBank ACP26381) y la subunidad alfa de la succinil-CoA sintetasa (número de acceso a GenBank ACP26382) de *Rhizobium* sp. NGR234, se sintetizó la longitud completa del gen de la malato tioquinasa (SEQ ID NO: 63). El obtenido se digirió con *NdeI* y *XbaI*, y se ligó a pMWGKC digerido con *NdeI* y *XbaI*. El plásmido obtenido se llamó pMWGKC_mtk(Rhi). Además, se realizó PCR usando el ADN cromosómico de *Methylobacterium extorquens* como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 64 y 65, y el ADN obtenido se digirió con *XbaI* y *HindIII*. El fragmento obtenido se sometió a tratamiento de extremos romos y se ligó a un gen obtenido digiriendo MWGKC_mtk(Rhi) con *XbaI* y sometiendo el fragmento resultante a tratamiento de extremos romos. Un plásmido resultante en que se introdujo el gen *mtk* y el gen *mcl* en la misma dirección se llamó pMWGKC_mtk(Rhi)_mcl. Las secuencias de aminoácidos de *mtkA* y *mtkB* derivadas de *Rhizobium* sp. son como se muestran en las SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76, respectivamente.

[Ejemplo 14]

35 <Preparación de variante productora de alcohol isopropílico con malato tioquinasa y malil-CoA liasa introducidas>

Se transformaron células competentes de la variante de *Escherichia coli* B (atoDAB, Δpgi_gntR_gnd_ldhA_aceBA_glcB_fumAC) preparada en el Ejemplo 8 con el plásmido plaz preparado en el Ejemplo 9 y cada uno de los plásmidos que expresan *mtk* y *mcl*. Los transformantes que crecieron en la placa de agar LB que contenía 25 mg/l de cloranfenicol y 100 mg/l de ampicilina se denominaron del siguiente modo (véase la Tabla 2).

45 Los números de variante en la Tabla 2 representan las variantes preparadas introduciendo plaz y cada uno de los plásmidos descritos en la Tabla 2 en la variante de *Escherichia coli* B (atoDAB, Δpgi_gntR_gnd_ldhA_aceBA_glcB_fumAC).

Tabla 2

Número de variante	Plásmido	Origen de mtk	Origen de mcl
MT-1	pMWGKC_mtk(Mex)_mcl	<i>Methylobacterium extorquens</i>	<i>Methylobacterium extorquens</i>
MT-2	pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl	<i>Hyphomicrobium methylovorum</i>	<i>Methylobacterium extorquens</i> , <i>Hyphomicrobium methylovorum</i>
MT-3	pMWGKC_mtk(Rhi)_mcl	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	<i>Methylobacterium extorquens</i>
Control	pMWGKC	Ninguno	Ninguno

50 [Ejemplo 15]

<Confirmación de la incorporación de CO₂ marcado con ¹³C en alcohol isopropílico>

55 Se añadieron 100 ml de medio líquido LB en un matraz Erlenmeyer de 500 ml equipado con un deflector, y se esterilizó por autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Al medio esterilizado, se añadió ampicilina para que tuviera una concentración final de 50 µg/ml y se añadió cloranfenicol para que tuviera una concentración final de 34 µg/ml. Posteriormente, se inoculó un bucle de platino de cada una de las variantes mostradas en la Tabla 2 que tienen una ruta de fijación de dióxido de carbono introducida en las mismas en el medio, y se cultivaron a 30 °C y 130 rpm

durante aproximadamente 20 horas. Se separaron solamente las células bacterianas del líquido de cultivo por centrifugación (5.000 G durante 15 minutos), y después las células bacterianas separadas se re-suspendieron en 10 ml de solución salina fisiológica, obteniendo de ese modo las suspensiones bacterianas respectivas.

5 En un matraz Erlenmeyer de 100 ml, se prepararon 30 ml de medio mínimo M9 que contenía hidrogenocarbonato sódico marcado con ^{13}C 100 mM, 50 g/l de glucosa, 34 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Se inocularon 3 ml de la suspensión bacteriana obtenida anteriormente en este medio y se cultivaron a 30 °C, 100 rpm durante 24 horas, mientras el matraz permanecía fuertemente sellado con un tapón de silicona. El líquido de cultivo obtenido se filtró a presión reducida usando un filtro de membrana de PTFE hidrófila (H050A047A, tamaño de poro: 10 0,5 mm; diámetro: 47 mm; fabricado por ADVANTEC) colocado en un portafiltros para filtración a presión reducida (KGS-47; fabricado por ADVANTEC), separando de ese modo las células bacterianas del sobrenadante de cultivo.

El filtro de membrana al que se adhirieron las células bacterianas se sumergió inmediatamente en 1,6 ml de metanol (calidad LC/MS) enfriado hasta -20 °C y agitado, y la membrana se dejó reposar a -20 °C durante 1 hora. Después 15 de ello, se añadieron 1,6 ml de cloroformo (calidad HPLC) enfriado hasta -20 °C y 0,64 ml de agua pura enfriada hasta 4 °C a la misma, seguido por mezcla con vórtice durante 30 segundos. Posteriormente, el sobrenadante se recogió por separación centrífuga a 4 °C, obteniendo de ese modo un extracto de metanol de las células bacterianas. El extracto obtenido se analizó por LC-MS/MS y se determinó la distribución de peso molecular de acetil-CoA en las células bacterianas. Los resultados se muestran en la Tabla 3. La distribución de peso molecular de acetil-CoA se calculó definiendo las relaciones de picos de espectrometría de masas a pesos moleculares de 20 808, 809, y 810 como M+0, M+1 y M+2, respectivamente.

Por separado, del sobrenadante de cultivo obtenido anteriormente, se recuperaron alcoholes y acetona a altas 25 concentraciones por destilación, y se usaron como materias primas para la medición de la distribución del peso molecular. Las distribuciones del peso molecular de alcohol isopropílico y etanol en el sobrenadante de cultivo se analizaron por GC-MS. Los resultados se muestran en las Tablas 4 y 5. La distribución del peso molecular de alcohol isopropílico (IPA) (Tabla 4) se calculó definiendo las relaciones de los picos de espectrometría de masas a pesos moleculares de 117, 118, y 119 como M+0, M+1 y M+2, respectivamente. La distribución de peso molecular de etanol (EtOH) (Tabla 5) se calculó definiendo las relaciones de picos de espectrometría de masas a pesos 30 moleculares de 103, 104, y 105 como M+0, M+1 y M+2, respectivamente.

Tabla 3

Nombre de la muestra	M+0	M+1	M+2
MT-1	0,80	0,14	0,06
MT-2	0,76	0,18	0,06
Control	0,81	0,13	0,06

Tabla 4

Nombre de la muestra	M+0	M+1	M+2
MT-1	0,87 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,03 ± 0,00
MT-2	0,84 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,04 ± 0,00
IPA disponible en el mercado	0,87 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,04 ± 0,00

35

Tabla 5

Nombre de la muestra	M+0	M+1	M+2
MT-1	0,87 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,04 ± 0,00
MT-2	0,85 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,00
EtOH disponible en el mercado	0,88 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,03 ± 0,00

Como se muestra en la Tabla 3, la variante MT-1 y la variante MT-2 tenían una alta relación de acetil-CoA en que no estaba incorporado ^{13}C (M+0) y una alta relación de acetil-CoA en que estaba incorporado un átomo de ^{13}C (M+1), 40 en comparación con la cepa de control. En particular, la relación de M+1 fue alta en la variante MT-2. A partir de este resultado, se descubrió que el carbono derivado del carbonato marcado con ^{13}C se incorporaba en acetil-CoA en la variante MT-1 y en la variante MT-2, y que el efecto era especialmente pronunciado para la variante MT-2.

Además, la variante MT-2 tenía una baja relación de alcohol isopropílico o de etanol en que no había ^{13}C 45 incorporado (M+0) y una alta relación de alcohol isopropílico o de etanol en que estaba incorporado un átomo de ^{13}C (M+1), en comparación con el alcohol isopropílico o de etanol disponible en el mercado (Tabla 4 y Tabla 5). A partir de este resultado, se descubrió que el carbono derivado del carbonato marcado con ^{13}C se incorporaba también en el alcohol isopropílico o el etanol en la variante MT-2.

50

[Ejemplo 16]

<Medición de la actividad de producción de glioxilato usando malato como sustrato>

5 Se cultivaron las variantes que expresan mtk y mcl descritas anteriormente en 2 ml de medio LB que contenía 25 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Se extrajo una solución enzimática en bruto de acuerdo con el siguiente método. Es decir, se recogieron células bacterianas en fase de crecimiento logarítmico por centrifugación y se lavaron con tampón MOPS-K 200 mM (pH 7,7) y después se disolvieron en tampón MOPS-K, seguido por
10 sonicación. El sobrenadante obtenido por separación centrífuga (12.000 rpm durante 2 minutos) se usó como la solución enzimática en bruto.

La concentración de proteínas en la solución enzimática en bruto se determinó basándose en la curva de calibración generada con valores de DO a 595 nm medidos con un lector de placa UV (Molecular Devices, SpectraMax 190) usando la solución enzimática en bruto y concentraciones conocidas de BSA para preparar la curva de calibración,
15 cada una de las cuales se había hecho reaccionar con el reactivo de colorante de Bradford Quick Start (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) y se había sometido a desarrollo del color.

La actividad enzimática en la solución se determinó de acuerdo con el siguiente procedimiento. Es decir, se mezcló tampón MOPS-K (pH 7,7), fenilhidracina 3,5 mM, MgCl_2 10 mM, ATP 3 mM, CoA 0,3 mM y un 10 % en masa de solución enzimática en bruto en un micropocillo y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como valores de fondo, se midieron los cambios en los valores de DO a 324 nm en el tiempo usando un lector de placa UV. A la mezcla, se añadió solución de (S)-L-malato sódico (pH 7,5) para que tuviera una concentración final de 5 mM, y se midieron los cambios en los valores de DO a 324 nm en el tiempo. Para generar una curva de calibración para glioxilato, se añadió glioxilato al tampón anterior y la mezcla se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y después se midieron los valores de DO a 324 nm. Respecto al valor de actividad enzimática, se sustrajo la pendiente de los valores de fondo de la pendiente de los valores de DO a 324 nm después de la adición de (S)-L-malato sódico, y el valor obtenido se convirtió en una tasa de consumo de glioxilato basada en la curva de calibración para glioxilato. La actividad enzimática por proteínas se determinó dividiendo la tasa de consumo de glioxilato por la concentración de proteína (Tabla 6).
20
25
30

Como se muestra en el Tala 6, se confirmó que todas las variantes MT-1, MT-2 y MT-3 tienen actividad enzimática. Se descubrió que la variante MT-2 y la variante MT-3 tienen una mayor actividad enzimática en comparación con la variante MT-1. En contraste, no se mostró actividad enzimática en el control.
35

Tabla 6

Nombre de la muestra	Actividad (nmol/min/mg de proteína)
MT-1	2 ± 0
MT-2	29 ± 0
MT-3	23 ± 0
Control	0 ± 0

[Ejemplo 17]

<Cantidad de células viables y tasa de retención de plásmido en la variante con malato tioquinasa y malil-CoA liasa introducidas>
40

En un matraz Erlenmeyer de 100 ml, se prepararon 30 ml de medio mínimo M9 o medio LB que contenían cada uno 50 g/l de glucosa, 30 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Cada una de las variantes anteriores que expresan mtk y mcl se inocularon en el medio mínimo M9 o medio LB y se cultivaron a 30 °C, 100 r.p.m. durante 24 horas, mientras el matraz estaba fuertemente sellado con un tapón de silicona. El líquido de cultivo se diluyó con agua y se aplicaron 100 μl del líquido de cultivo diluido a una placa LB sin antibiótico. Se contó la cantidad total de células viables. Además, el líquido de cultivo diluido se aplicó a una placa LB que contenía 30 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y se contó la cantidad de células bacterianas que retenían el plásmido que alberga mtk (smt) y mcl.
45

Como se muestra en la Tabla 7, se descubrió que cada una de la variante MT-2 y la variante MT-3 tenían una mayor cantidad de células viables en el líquido de cultivo y crecían mejor, en comparación con la variante MT-1. Los plásmidos que albergan mtk y mcl se mantuvieron de forma estable en todas las variantes MT-1, MT-2 y MT-3.
50

Tabla 7

Nombre de la muestra	Medio	Cantidad total de células viables	Cantidad de células que albergan plásmido mtk-mcl
MT-1	M9	$1,3 \times 10^6$ /ml	$0,8 \times 10^6$ /ml
MT-2	M9	$6,8 \times 10^8$ /ml	$9,1 \times 10^8$ /ml
MT-3	LB	$2,6 \times 10^9$ /ml	$9,2 \times 10^9$ /ml

55

[Ejemplo 18]

<Construcción del plásmido de expresión para la malato tioquinasa derivada de *Granulibacter bethesdensis* BAA-1260>

5

El ADN genómico de *Granulibacter bethesdensis* BAA-1260D-5 se adquirió de la ATCC.

Se realizó PCR usando el ADN genómico de *Granulibacter bethesdensis* como molde y usando CCCTGAGGAGGGTCCAAGAGATGGACGTCCATGAGTACCA (SEQ ID NO: 77) y GCTCTAGATCAGGCTGCCTGACGCCA (SEQ ID NO: 78) como cebadores, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento mtk de *Granulibacter*. Además, se realizó PCR usando pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl preparado en el Ejemplo 12 como molde y usando GGAATTCACAAAAAGGATAAAA (SEQ ID NO: 79) y TGGTACTCATGGACGTCCATCTCTTGGACCCTCCTCAGGG (SEQ ID NO: 80) como cebadores, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento mcl de *Hyphomicrobium*. Se realizó PCR usando el fragmento mtk obtenido de *Granulibacter* y el fragmento mcl de *Hyphomicrobium* como moldes y los cebadores de la SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 78, obteniendo de ese modo un fragmento de ADN que contenía mcl de *Hyphomicrobium* y el gen del fragmento mtk de *Granulibacter*. El fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*, y se ligó en un plásmido obtenido digiriendo el plásmido pMWGKC preparado en el Ejemplo 10 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. El plásmido obtenido se llamó pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Gb).

pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Gb) alberga el gen mtkA (SEQ ID NO: 81) y el gen mtkB (SEQ ID NO: 82) derivados de *Granulibacter bethesdensis*. Las secuencias de aminoácidos de mtkA y mtkB derivadas de *Granulibacter bethesdensis* se muestran en la SEQ ID NO: 107 y la SEQ ID NO: 108, respectivamente.

[Ejemplo 19]

<Construcción del plásmido de expresión para la malato tioquinasa derivada de *Hyphomicrobium denitrificans* DSM 1869>

Se adquirió *Hyphomicrobium denitrificans* DSM 1869 de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Alemania). DSM1869 se cultivó en un medio (número de medio: 803, DSM), y se obtuvo el ADN cromosómico a partir del mismo usando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN).

Se realizó PCR usando el ADN cromosómico de *Hyphomicrobium denitrificans* como molde y usando ACCAGGGAATTCACAAAAAGGATAAAACAATGAGCTATACCCTCTACCCAACCGTA AGC (SEQ ID NO: 83) y GCCCACTCTAGATCAGGCAACTTTTTCTGCTTGCCGAGAACC (SEQ ID NO: 84) como cebadores, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento mcl-mtk de *Hyphomicrobium*. El fragmento obtenido se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI* y se ligó en un plásmido obtenido digiriendo el plásmido pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl preparado en el Ejemplo 12 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. El plásmido obtenido se llamó pMWGKC_mcl(Hde)_mtk(Hde)_mcl.

pMWGKC_mcl(Hde)_mtk(Hde)_mcl alberga la secuencia de bases del gen mcl (SEQ ID NO: 85), la secuencia de bases del gen mtkA (SEQ ID NO: 86) y la secuencia de bases del gen mtkB (SEQ ID NO: 87) derivadas de *Hyphomicrobium denitrificans*. Las secuencias de aminoácidos de mcl, mtkA, y mtkB derivadas de *Hyphomicrobium denitrificans* se muestran en las SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, y SEQ ID NO: 111, respectivamente.

[Ejemplo 20]

<Construcción del plásmido de expresión para la malato tioquinasa derivada de *Nitrosomonas europaea* NBRC 14298>

50

Se adquirió *Nitrosomonas europaea* NBRC 14298 de NBRC (Biological Resource Center, NITE). NBRC 14298 se cultivó en un medio (número de medio: 829, NBRC) y se obtuvo el ADN cromosómico a partir del mismo usando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN).

55

Se realizó PCR usando el ADN cromosómico de *Nitrosomonas europaea* como molde y usando GCGGGGAATTCACAAAAAGGATAAAACAATGAGTCATACCCTGTATGAACCAAA ACACC (SEQ ID NO: 88) y CAGGCGTCTAGATTAGAGTCCGGCCAGAACTTTTGCGACG (SEQ ID NO: 89) como cebadores, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento mtk de *Nitrosomonas europaea*. El fragmento obtenido se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI* y se ligó en un plásmido obtenido digiriendo el plásmido pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl preparado en el Ejemplo 12 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. El plásmido obtenido se llamó pMWGKC_mcl(Ne)_mtk(Ne)_mcl.

60

pMWGKC_mcl(Ne)_mtk(Ne)_mcl alberga la secuencia de bases del gen mcl (SEQ ID NO: 90), la secuencia de bases del gen mtkA (SEQ ID NO: 91) y la secuencia de bases del gen mtkB (SEQ ID NO: 92) derivadas de *Nitrosomonas europaea*. Las secuencias de aminoácidos de mcl, mtkA, y mtkB derivadas de *Nitrosomonas*

65

europaea se muestran en la SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, y SEQ ID NO: 114, respectivamente.

[Ejemplo 21]

5 <Construcción de plásmidos de expresión para la malato tioquinasa derivada de *Methylococcus capsulatus* ATCC 33009>

El ADN genómico de *Methylococcus capsulatus* ATCC 33009 se adquirió de la ATCC.

10 Se realizó PCR usando el ADN cromosómico de *Methylococcus capsulatus* como molde y usando GGAATTCCATATGGCTGTAAAAATCGTCTAC (SEQ ID NO: 93) y GCTCTAGATCAGAATCTGATTCCGTGTTCC (SEQ ID NO: 94) como cebadores, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento mcl-mtk de *Methylococcus*. El fragmento obtenido se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *XbaI* y se ligó en un plásmido obtenido digiriendo el plásmido pMWGKC preparado en el Ejemplo 10 con las enzimas de restricción *NdeI* y *XbaI*, o en un plásmido obtenido digiriendo el plásmido pMWGC preparado en el Ejemplo 10 con las enzimas de restricción *NdeI* y *XbaI*. El plásmido obtenido se llamó pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) o pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc).

20 Cada uno de pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) y pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) albergan la secuencia de bases del gen mcl (SEQ ID NO: 95), la secuencia de bases del gen mtkA (SEQ ID NO: 96) y la secuencia de bases del gen mtkB (SEQ ID NO: 97) derivadas de *Methylococcus capsulatus*. Las secuencias de aminoácidos de mcl, mtkA, y mtkB derivadas de *Methylococcus capsulatus* se muestran en la SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, y SEQ ID NO: 117, respectivamente.

[Ejemplo 22]

25 <Construcción del plásmido de expresión para la malato tioquinasa derivada de gammaproteobacteria no cultivada (Gen-Bank: AP011641.1)>

30 Para obtener mtk derivado de una gammaproteobacteria no cultivada, se diseñó metk derivado de un gammaproteobacteria basándose en la secuencia de aminoácidos de GenBank: Asp011641.1, y se preparó el siguiente fragmento de ADN (SEQ ID NO: 98) por síntesis de ADN.

35 Se realizó PCR usando el fragmento de ADN preparado como molde y usando GTTGAACGAGGAGATCGTCCATGAACATTCACGAATATCA (SEQ ID NO: 99) y GCTCTAGATTAGCCAGAACTGCAGATCC (SEQ ID NO: 100) como cebadores, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento mtk de la gammaproteobacteria. Además, se realizó PCR usando pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) o pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) preparado en el Ejemplo 21 como molde y usando los cebadores de la (SEQ ID NO: 93 y TGATATTCGTGAATGTTTCATGGACGATCTCCTCGTTCAAC (SEQ ID NO: 101), obteniendo de ese modo un fragmento mcl de *Methylococcus*. Además, se realizó PCR usando el fragmento mtk de gammaproteobacteria obtenido y el fragmento mcl de *Methylococcus* obtenido como moldes y usando los cebadores de la SEQ ID NO: 93 y SEQ ID NO: 100, obteniendo de ese modo un fragmento de ADN que contenía el gen mcl de *Methylococcus* y el gen del fragmento mtk de la gammaproteobacteria. El fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *XbaI* y se ligó en un plásmido obtenido digiriendo el plásmido pMWGKC preparado en el Ejemplo 10 con las enzimas de restricción *NdeI* y *XbaI*. El plásmido obtenido se llamó pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(gamma).

45 pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(gamma) alberga el gen mtkA (SEQ ID NO: 102) y el gen mtkB (SEQ ID NO: 103) derivadas de la gammaproteobacteria no cultivada. Las secuencias de aminoácidos de mtkA y mtkB derivadas de la gammaproteobacteria no cultivada se muestran en la SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 119, respectivamente.

50 [Ejemplo 23]

<Preparación de variante con malato tioquinasa y malil-Coa liasa introducida, productora de alcohol isopropílico, de genoma AtoD potenciado, gen *pgi* deletado, gen *gntR* deletado, gen *gnd* deletado, gen *ldhA* deletado, gen *fumAC* deletado, gen *aceBA* deletado, gen *glcB* deletado>

55 Se transformaron células competentes de la variante de *Escherichia coli* B (atoDAB, Δ*pgi* Δ*gntR* Δ*gnd* Δ*ldhA* Δ*aceBA* Δ*glcB* Δ*fumAC*) preparada en el Ejemplo 8 con el plásmido plaz y cada uno de los plásmidos que expresan mtk y mcl preparados en los Ejemplos 18 a 22. Los transformantes que crecieron en el medio de agar LB que contenía 25 mg/l de cloranfenicol y 100 mg/l de ampicilina se denominaron del siguiente modo (véase la Tabla 8).

60 Los números de variante descritos en la Tabla 8 representan las variantes preparadas introduciendo plaz y cada uno de los plásmidos descritos en la Tabla 8 en la variante de *Escherichia coli* B (atoDAB, Δ*pgi* Δ*gntR* Δ*gnd* Δ*ldhA* Δ*aceBA* Δ*glcB* Δ*fumAC*).

65

Tabla 8

Número de variante	Plásmido	Origen de mtk	Origen de mcl
MT-4	pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Gb)	<i>Granulibacter bethesdensis</i>	<i>Hyphomicrobium methylovorum</i>
MT-5	pMWGKC_mcl(Hde)_mtk(Hde)_mcl	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i>	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> , <i>Methylobacterium extorquens</i>
MT-6	pMWGKC_mcl(Ne)_mtk(Ne)_mcl	<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>Methylobacterium extorquens</i>
MT-7	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)	<i>Methylococcus capsulatus</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>
MT-8	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(gamma)	ADN de gammaproteobacteria no cultivada	<i>Methylococcus capsulatus</i>

[Ejemplo 24]

5 <Medición de la actividad de producción de glioxilato usando malato como sustrato>

Del mismo modo que en el Ejemplo 16, se determinó la actividad enzimática por proteína (Tabla 9).

10 Como se muestra en la Tabla 9, se confirmó que cada una de las variantes MT-4 a MT-8 tiene actividad enzimática, y que la actividad enzimática era mayor en comparación con la variante MT-1. En particular, se descubrió que la variante MT-5, la variante MT-6, la variante MT-7 y la variante MT-8 tienen una actividad equivalente o mayor en comparación con la variante MT-2 y la variante MT-3 mostradas en el Ejemplo 16. En contraste, no se detectó actividad enzimática en el control.

15

Tabla 9

Nombre de la muestra	Actividad (nmol/min/mg de proteína)
MT-4	7,5 ± 0
MT-5	34,0 ± 0
MT-6	54,0 ± 0
MT-7	68,3 ± 0
MT-8	43,4 ± 0
MT-1	2 ± 0
MT-2	29 ± 0
MT-3	23 ± 0
Control	0 ± 0

[Ejemplo 25]

20 <Preparación de variante de genoma atoD potenciado, gen aceB deletado>

Para clonar una región que flanquea la secuencia de bases del gen que codifica la malato sintasa (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "aceB") (1602 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por GGAATTCATTCAGCTGTTGCGCATCGATTC (SEQ ID NO: 24), GTTATGTGGTGGTTCGTGCAGCTCCTCGTCATGG (SEQ ID NO: 104), GAGCTGCACGACCACCACATAACTATGGAG (SEQ ID NO: 105) y GGAATTCAGTTGAACGACGGCGAGCAG (SEQ ID NO: 106). Cada uno de estos cebadores tiene un sitio de reconocimiento de *EcoRI* en el lado del extremo 5' del mismo.

30 Se preparó el ADN genómico de *Escherichia coli* B (n.º de acceso CP000819) y se realizó PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 106, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento aceB-L"). Además, se realizó PCR usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 106, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento aceB-R").

35 Estos fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron. Se realizó PCR usando los fragmentos aceB-L y aceB-R como moldes y usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 108, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,0 kpb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento aceB-LR"). El fragmento aceB-LR se separó por electroforesis en agarosa y se recuperó, se digirió con *EcoRI* y se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo un

40 plásmido sensible a temperatura pTH18cs1 (número de acceso a GenBank AB0 19610) con *EcoRI*. Se permitió que los fragmentos mezclados reaccionaran usando la ADN ligasa T4. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol a 30 °C.

Se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos y se confirmó que el fragmento aceB-LR estaba apropiadamente insertado en pTH18cs1. El plásmido obtenido se llamó pTH18cs1-aceB.

5 La variante de *Escherichia coli* B::atoDAB preparada en el Ejemplo 1 se transformó con el plásmido así obtenido pTH18cs1-aceB y se cultivó a 30 °C durante una noche en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Posteriormente, parte del líquido de cultivo se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C
10 durante 24 horas en un medio líquido LB y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se picaron aleatoriamente 100 colonias y cada una se cultivó individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron los clones
15 sensibles a cloranfenicol. Además, se amplificaron por PCR los ADN cromosómicos de estos clones diana, y se seleccionó una variante de la cual podía amplificarse un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb que indica delección del gen aceB. La variante obtenida se llamó variante de genoma atoD potenciado, gen aceB delecionado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante B::atoDABΔaceB").

20 [Ejemplo 26]

<Preparación de variante de genoma atoD potenciado, gen aceB delecionado, gen glcB delecionado>

Se transformó la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔaceB preparada en el Ejemplo 25 con el plásmido pTH18cs1-glcB preparado en el Ejemplo 7, y se cultivó a 30 °C durante una noche en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Posteriormente, parte del líquido de cultivo se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias
30 obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. De las colonias que aparecieron se picaron aleatoriamente 100 colonias y cada una se cultivó individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron los clones sensibles a cloranfenicol. Además, se amplificaron por PCR los ADN cromosómicos de estos clones diana, y se seleccionó una variante de la cual podía
35 amplificarse un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb, que indica delección del gen glcB. La variante obtenida se llamó variante de genoma atoD potenciado, gen aceB delecionado, gen glcB delecionado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante B::atoDABΔaceBΔglcB").

40 [Ejemplo 27]

<Preparación de variante de genoma atoD potenciado, gen ldhA delecionado>

Se transformó la variante de *Escherichia coli* B::atoDAB preparada en el Ejemplo 1 con el plásmido pTH18cs1-ldhA
45 preparado en el Ejemplo 5 y se cultivó a 30 °C durante una noche en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Posteriormente, parte del líquido de cultivo se aplicó a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C
50 durante 24 horas en un medio líquido LB y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se picaron aleatoriamente 100 colonias y cada una se cultivó individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron los clones
55 sensible a cloranfenicol. Además, se amplificaron por PCR los ADN cromosómicos de estos clones diana, y se seleccionó una variante de la cual podría amplificarse un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb, que indica delección del gen ldhA. La variante obtenida se llamó variante de genoma atoD potenciado, gen ldhA delecionado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante B::atoDABΔldhA")

60 [Ejemplo 28]

<Preparación de variante pBRgapP, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B y la variante pBRgapP, pMWGC/B>

Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* B con el plásmido pBRgapP preparado en el Ejemplo 2, y el plásmido pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) preparado en el Ejemplo 21 o el plásmido pMWGC preparado en el Ejemplo
65 21, y se aplicaron a una placa de agar LB que contenía 25 mg/l de cloranfenicol y 100 mg/l de ampicilina. Como resultado, se obtuvieron transformantes que crecieron en el medio.

[Ejemplo 29]

<Preparación de variante pla, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDAB y la variante pla, pMWGC/B::atoDAB>

5 Se transformaron células competentes de la variante de *Escherichia coli* B (B::atoDAB) preparada en el Ejemplo 1 con el plásmido pla preparado en el Ejemplo 9 y el plásmido pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) preparado en el Ejemplo 21 o el plásmido pMWGC preparado en el Ejemplo 21, y se aplicaron a una placa de agar LB que contenía 25 mg/l de cloranfenicol y 100 mg/ml de ampicilina. Como resultado, se obtuvieron transformantes que crecieron en el medio.

10 [Ejemplo 30]

<Preparación de variante pla, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDABΔaceB y la variante pla, pMWGC/B::atoDABΔaceB>

15 Se transformaron células competentes de la variante de *Escherichia coli* B (B::atoDABΔaceB) preparada en el Ejemplo 25 con el plásmido pla preparado en el Ejemplo 9 y el plásmido pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) preparado en el Ejemplo 21 o el plásmido pMWGC preparado en el Ejemplo 21, y se aplicaron a un medio de agar LB que contenía 25 mg/l de cloranfenicol y 100 mg/m de ampicilina, y se obtuvieron transformantes que crecieron en el medio.

20 [Ejemplo 31]

<Preparación de variante pla, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDABΔaceBΔglcB y variante pla, pMWGC/B::atoDABΔaceBΔglcB>

25 Se transformaron células competentes de la variante de *Escherichia coli* B (B::atoDABΔaceBΔglcB) preparada en el Ejemplo 26 con el plásmido pla preparado en el Ejemplo 9 y el plásmido pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) preparado en el Ejemplo 21 o el plásmido pMWGC preparado en el Ejemplo 21, y se aplicaron a un medio de agar LB que contenía 25 mg/l de cloranfenicol y 100 mg/l de ampicilina. Como resultado, se obtuvieron transformantes que crecieron en el medio.

30 [Ejemplo 32]

<Preparación de variante pla, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDABΔldhA y variante pla, pMWGC/B::atoDABΔldhA>

35 Se transformaron células competentes de la variante de *Escherichia coli* B (B::atoDABΔldhA) preparada en el Ejemplo 27 con el plásmido pla preparado en el Ejemplo 9 y el plásmido pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) preparado en el Ejemplo 21 o el plásmido pMWGC preparado en el Ejemplo 21, y se aplicaron a un medio de agar LB que contenía 25 mg/l de cloranfenicol y 100 mg/l de ampicilina. Como resultado, se obtuvieron transformantes que crecieron en el medio.

40 [Ejemplo 33]

<Producción de alcohol isopropílico>

45 En este ejemplo, se produjo alcohol isopropílico usando un aparato de producción mostrado en la Fig. 1 del documento WO 2009/008377. El tanque de cultivo usado era un tanque que tenía una capacidad de 3 l y hecho de vidrio. En los tanques de atrapamiento, se inyectó agua como solución de atrapamiento (agua de atrapamiento) en una cantidad de 9 l por tanque, y se conectaron dos tanques de atrapamiento para su uso.

50 En la Tabla 10 se muestra una lista de las variantes usadas en la evaluación de la producción de alcohol isopropílico.

Tabla 10

Nombre de la variante	Plásmido/variante	Característica	Descripción citada
vec/B	pBRgapP, pMWGC/B	Sin sistema de producción de IPA, sin expresión de mtk y mcl	Ejemplo 28
mtk_mcl/B	pBRgapP, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B	Sin sistema de producción de IPA, expresión de mtk y mcl	Ejemplo 28
vec/atoDAB	pla, pMWGC/B::atoDAB	Contiene sistema de producción de IPA, sin expresión de mtk y mcl	Ejemplo 29
mtk_mcl/atoDAB	pla, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDAB	Contiene sistema de producción de IPA, expresión de mtk y mcl	Ejemplo 29
vec/atoDAB ΔaceB	pla, pMWGC/B::atoDABΔaceB	Contiene sistema de producción de	Ejemplo 30

Nombre de la variante	Plásmido/variante	Característica	Descripción citada
		IPA, sin expresión de mtk y mcl, alteración del gen aceB	
mtk_mcl/atoDAB ΔaceB	pIa, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDAB ΔaceB	Contiene sistema de producción de IPA, expresión de mtk and mcl, alteración del gen aceB	Ejemplo 30
vec/atoDAB ΔaceBΔglcB ΔaceBAglcB	pIa, pMWGC/B::atoDABΔaceBΔglcB	Contiene sistema de producción de IPA, sin expresión de mtk y mcl, alteración de los genes aceB y glcB	Ejemplo 31
mtk_mcl/atoDAB ΔaceBΔglcB	pIa, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDABΔaceBΔglcB	Contiene sistema de producción de IPA, expresión de mtk y mcl, alteración de los genes aceB y glcB	Ejemplo 31
vec/atoDABΔldhA	pIa, pMWGC/B::atoDABΔldhA	Contiene sistema de producción de IPA, sin expresión de mtk y mcl, alteración del gen ldhA	Ejemplo 32
mtk_mcl/atoDAB ΔldhA	pIa, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDABΔldhA	Contiene sistema de producción de IPA, expresión de mtk y mcl, alteración del gen ldhA	Ejemplo 32

Como precultivo, cada una de las variantes a evaluar se inoculó individualmente en un matraz Erlenmeyer que tenía una capacidad de 500 ml y que contenía 50 ml de un caldo LB de Miller (Difco 244620) que contiene 25 mg/l de cloranfenicol y 100 mg/l de ampicilina, y se cultivaron durante una noche a una temperatura de cultivo de 30 °C agitando a 120 rpm. Después de ello, se transfirieron 45 ml del precultivo a un tanque de cultivo (dispositivo de cultivo BMS-PI fabricado por ABLE corporation) que tiene una capacidad de 3 l y que contiene 90 g del medio que tiene la siguiente composición, y se cultivó. El cultivo se realizó a un volumen de aireación de 0,45 l/min, a una velocidad de agitación de 490 rpm, a una temperatura de cultivo de 30 °C y a un pH de 7,0 (ajustado con solución acuosa de NH₃) a presión atmosférica. Al cultivo, se le añadió una solución acuosa de glucosa al 50 % p/p a un caudal de 20 g/l/h durante el periodo desde el inicio del cultivo hasta 8 horas después del inicio del cultivo. Después de ello, se añadió una solución acuosa de glucosa al 50 % p/p a un caudal de 20 g/l/h, según lo apropiado, de modo que la cantidad de glucosa que quedaba en el tanque de cultivo estuviera minimizada. El líquido de cultivo bacteriano se muestreo varias veces durante el periodo desde el inicio del cultivo hasta 30 horas después del inicio del cultivo y, después de retirarse las células bacterianas por una operación de centrifugación, se midieron las cantidades de alcohol isopropílico, acetona y subproductos principales acumulados en los sobrenadantes de cultivo y las aguas de atrapamiento obtenidos por HPLC de acuerdo con un método habitual. Cada uno de los valores de medición es una suma de las cantidades en el líquido de cultivo y los dos tanques de atrapamiento después del cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla 11 y los subproductos se muestran en la Tabla 12.

<Composición del medio de cultivo>

Licor de macerado del maíz (fabricado por Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.), 50 g/l
 Fe₂SO₄·7H₂O: 0,1 g/l
 K₂HPO₄: 2 g/l
 KH₂PO₄: 2 g/l
 MgSO₄·7H₂O: 2 g/l
 (NH₄)₂SO₄: 2 g/l
 ADEKANOL LG126 (ADEKA Corporation): 0,1 g/l
 (Equilibrio: agua)

Tabla 11

Nombre de la variante	Cantidad de producción (g/30h)		Uso de glucosa (g/30h)	Rendimiento relativo al consumo de azúcar (30h)	
	IPA	Acetona		IPA	IPA + Acetona
vec/B	-	-	212,7	-	-
mtk_mcl/B	-	-	257,9	-	-
vec/atoDAB	33,2	6,0	210,0	15,8	18,6
mtk_mcl/atoDAB	34,6	8,8	209,5	16,5	20,7
vec/atoDAB ΔaceB	30,8	6,1	205,3	15,0	18,0
mtk_mcl/atoDAB ΔaceB	32,8	6,6	202,6	16,2	19,5
vec/atoDAB ΔaceBΔglcB	31,9	5,5	204,1	15,6	18,4
mtk_mcl/atoDAB ΔaceBΔglcB	31,9	5,6	195,3	16,3	19,1
vec/atoDABΔldhA	32,0	5,3	197,2	16,2	18,9
mtk_mcl/atoDAB ΔldhA	38,6	6,8	197,9	17,4	21,3

Tabla 12

Nombre de la variante	Subproductos (g/l/30h)									
	Etanol	Piruvato	Succinato	Lactato	Formato	Acetato	Fumarato	Cantidad total de subproductos		
vec/B	0,3	0,5	1,8	0,3	0,6	28,1	0,0	31,6		
mtk_mcl/B	0,4	0,1	0,5	0,4	0,3	28,2	0,0	29,8		
vec/atoDAB	2,5	1,3	5,8	9,2	2,6	4,6	0,2	26,1		
mtk_mcl/atoDAB	2,0	0,0	5,0	6,3	5,6	4,5	0,2	23,4		
vec/atoDABΔaceB	2,8	0,1	2,4	1,1	4,0	3,8	0,0	14,3		
mtk_mcl/atoDABΔaceB	1,7	0,1	1,9	1,3	3,3	3,5	0,1	11,8		
vec/atoDABΔaceBΔglcB	2,6	0,1	1,7	0,7	4,0	3,7	0,1	12,8		
mtk_mcl/atoDABΔaceBΔglcB	1,3	0,1	2,2	0,9	3,0	3,3	0,1	10,8		
vec/atoDABΔldhA	3,3	4,5	4,0	0,0	3,9	3,8	0,3	19,6		
mtk_mcl/atoDABΔldhA	1,9	0,7	2,2	0,0	5,7	4,6	0,0	15,2		

Como resultado de la evaluación, la cantidad de alcohol isopropílico producido por la cepa de control (vec/atoDAB) fue de 32,2 g/30 h, y la cantidad producida por la variante con mtk introducido (mtk_mcl/atoDAB) 34,6 g/30 h. La cantidad de acetona producida fue de 6,0 g/30 h en la cepa de control (vec/atoDAB) y de 8,8 g/30 h en la variante de mtk introducido (mtk_mcl/atoDAB). A partir de estos resultados, se descubrió que las cantidades de producción de alcohol isopropílico y acetona se aumentaban por la introducción de mtk y mcl. El rendimiento de alcohol isopropílico relativo al consumo de azúcar a las 30 horas después del inicio del cultivo fue del 15,8 % en la cepa de control (vec/atoDAB) y del 16,5 % en la variante de mtk + mcl introducidos (mtk_mcl/atoDAB). El rendimiento de alcohol isopropílico y acetona relativo al consumo de azúcar a las 30 horas después del inicio del cultivo fue del 18,6 % en la cepa de control (vec/atoDAB) y del 20,7 % en la variante de mtk + mcl introducidos (mtk_mcl/atoDAB). A partir de estos resultados, se demostró que las eficacias de conversión de azúcar en alcohol isopropílico o acetona se aumentaban por la introducción de la ruta mtk + mcl.

Respecto a atoDABΔldhA las cantidades de producción de alcohol isopropílico y acetona y los rendimientos de alcohol isopropílico y acetona relativo al consumo de azúcar se mejoraban en la variante de mtk + mcl introducidos de forma similar al caso de atoDAB. Respecto a atoDABΔldhA atoDABΔaceB y atoDABΔaceBΔglBc los rendimientos relativos al consumo de azúcar se aumentaron en la variante de mtk + mcl introducidos, en comparación con los de la cepa de control (vec) de cada variante. Por lo tanto, se cree que la producción de acetil-CoA y las sustancias útiles derivadas de acetil-CoA se aumentaban de forma eficaz por mtk + mcl.

La Tabla 12 muestra los subproductos. En comparación con la cepa de control (vec/B), se descubrió que las cantidades de etanol, piruvato y succinato se reducían en la variante de mtk + mcl introducidos (mtk_mcl/B) a las 30 horas del inicio del cultivo, y la cantidad total de subproductos también estaba inesperadamente reducida en la variante de mtk + mcl introducidos. Asimismo, respecto a atoDAB, atoDABΔaceB, atoDABΔaceBΔglBc y atoDABΔldhA las cantidades de etanol, piruvato y succinato y la cantidad total de subproductos estaba reducida en las variantes de mtk + mcl introducidos en comparación con las cepas de control respectivas. A partir de estos resultados, se descubrió que mtk + mcl producía efectos similares con o sin atoDAB.

Respecto a atoDABΔaceB y atoDABΔaceBΔglBc el rendimiento de IPA y acetona relativo al consumo de azúcar era casi el mismo que en la variante atoDAB. Sin embargo, la cantidad total de subproductos estaba reducida en las variantes de vec introducido y las variantes de mtk introducido. Inesperadamente, las cantidades de lactato y succinato acumuladas estaban significativamente disminuidas en las variantes de mtk + mcl introducidos. Por lo tanto, atoDABΔaceB y atoDABΔaceBΔglBc eran industrialmente preferibles, ya que una cantidad más pequeña de subproductos permite una reducción significativa en la carga de purificación cuando se recoge alcohol isopropílico o acetona de un líquido de cultivo.

Respecto a atoDABΔldhA, se demuestra que las cantidades de producción de alcohol y acetona y los rendimientos de alcohol y acetona relativo al consumo de azúcar estaban mejorados en la variante de mtk + mcl introducidos de forma similar al caso de atoDAB. Respecto a todas las variantes anteriores, los rendimientos relativos al consumo de azúcar estaban mejorados en las variantes de mtk + mcl introducidos en comparación con la cepa de control (vec). Por lo tanto, se cree que la acetil-CoA y las sustancias útiles derivadas de acetil-CoA se aumentaban de forma eficaz.

Respecto a atoDABΔldhA, la cantidad total de subproductos estaba reducida, y la cantidad de piruvato acumulada estaba significativamente reducida en la variante de mtk + mcl introducidos. Además, los rendimientos de alcohol isopropílico y acetona relativo al consumo de azúcar estaban aumentados en la variante atoDABΔldhA de mtk + mcl introducidos, lo que indica que el alcohol isopropílico y la acetona se producían de forma eficaz por las rutas tanto de glucosa como mtk + mcl. La cantidad de subproductos en atoDABΔldhA se reducía de forma similar a los casos de atoDABΔaceB y atoDABΔaceBΔglBc. Además, los rendimientos de alcohol isopropílico y acetona relativo al consumo de azúcar se mejoraba en atoDABΔldhA cuando se introducía mtk + mcl. Estos resultados indican que, en la producción industrial de alcohol isopropílico y/o acetona, la alteración de ldhA es preferible en vista de la reducción de la carga de purificación durante la recogida de alcohol isopropílico y/o acetona y en vista del aumento de sus rendimientos.

La ruta de producción de alcohol isopropílico y la ruta de producción de acetona no se han introducido en las variantes B. Como la cantidad de acetato estaba significativamente aumentada en las variantes B, se cree que la acetil-CoA se convertía principalmente en acetato. Además, se asume que la acetil-CoA aumentada se convertía en acetato y etanol en la variante de mtk + mcl introducidos (mtk_mcl/B). Estos resultados indican que la cantidad de acetil-CoA se aumentaba por el efecto de mtk + mcl incluso en las variantes B.

[Ejemplo 34]

<Construcción del plásmido pGAPS>

Para obtener un gen de resistencia a espectinomicina, se realizó amplificación por un método de PCR usando el plásmido pIC156 (Steinmetz et al., Gene, 1994, 142(1):79-83) como molde y CCGCGGTACCGTATAATAAGAATAATTATTAATCTGTAGACAAATTGTGAAAGG (SEQ ID NO: 120) y

CTTTTGTATAAGTGGGTAAACCGTGAATATCGTGTCTTTTCAC (SEQ ID NO: 121), y el fragmento de ADN obtenido se fosforiló usando la polinucleótido quinasa T4 (Toyobo), como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN que contenía un gen de resistencia a espectinomocina. Además, el plásmido pGAP se trató con *PvuI*, y el fragmento de ADN obtenido se sometió a tratamiento de extremos romos con Toyobo BLUNTING HIGH, y se ligó al fragmento de ADN descrito anteriormente que contenía el gen de resistencia espectinomocina. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 120 μ g/ml de espectinomocina. Las colonias obtenidas se cultivaron durante una noche en un medio líquido LB que contenía 120 μ g/ml de espectinomocina, y el plásmido obtenido se llamó pGAPS.

[Ejemplo 35]

<Preparación del plásmido pGAPS_gcl>

Se obtuvo el ADN cromosómico de *Escherichia coli* MG1655 usando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN). Basándose en el operón que contiene la glioxilato carboxilasa (gcl, NCBI-GI: 945394), se prepararon dos tipos de cebadores representados por AAGAACTCTAGAACAAAAAGGATAAAACAATGGCAAAAATGAGAGCCGTTGACGCGGCAATG (SEQ ID NO: 122) y GACCAGCTGCAGTCAGGCCAGTTTATGGTTAGCCATTAATTCCAGC (SEQ ID NO: 123).

Además, se prepararon dos tipos de cebadores representados por ACACAAGCTGCAGACAAAAAGGATAAAACAATGAAGATTGTCATTGCGCCAGACTCTTTTAAAGAGAGCT (SEQ ID NO: 124) y GCCCCCAAGCTTTCAGTTTTTAATTCCCTGACCTATTTAATGGCGCAGG (SEQ ID NO: 125).

Se realizó amplificación por PCR del ADN cromosómico de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando los cebadores de las SEQ ID NO: 122 y 123 obtenidos como se ha descrito anteriormente, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 3 kb. Además, se realizó amplificación por PCR usando el ADN cromosómico de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando los cebadores de las SEQ ID NO: 124 y 125 obtenidos como se ha descrito anteriormente, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 1,1 kb. Estos ADN obtenidos se digirieron con *PstI*, y estos fragmentos se ligaron juntos. Se realizó amplificación por PCR usando el ADN ligado como molde y usando AAGAACTCTAGAACAAAAAGGATAAAACAATGGCAAAAATGAGAGCCGTTGACGCGGCAATG (SEQ ID NO: 126) y GCCCCCAAGCTTTCAGTTTTTAATTCCCTGACCTATTTAATGGCGCAGG (SEQ ID NO: 127) como cebadores, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN. El fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *XbaI* y *HindIII*, y se ligó en un plásmido pGAPS que se había digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *HindIII*. Después de ello, se transformó *Escherichia coli* DH5 α con el producto de ligamiento y se cultivó en una placa de agar LB que contenía espectinomocina, y se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos.

Los plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción *Clal* y *HindIII*, y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 4 kb que albergaba pGAPS. El fragmento de ADN se sometió a tratamiento de extremos romos y auto-ligamiento. Se transformó *Escherichia coli* DH5 α con el producto de ligamiento y se cultivó en una placa de agar LB que contenía 120 μ g/ml de espectinomocina. Las células bacterianas que crecieron en la placa se cultivaron en un medio líquido LB que contenía 120 μ g/ml de espectinomocina, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos, como resultado de lo cual se obtuvo el plásmido pGAPS_gcl.

[Ejemplo 36]

<Obtención de la variante *Pantoea ananatis* PA>

Se recuperó el plásmido RSFCPG de *Pantoea ananatis* AJ13601 (cepa depositada de patente BP-7207). El plásmido RSFCPG es un plásmido de resistencia a tetraciclina que tiene las enzimas glutamato deshidrogenasa, citrato sintasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa que cataliza la reacción de biosíntesis de L-glutamato (JP-A n.º 2001-333769). *Pantoea ananatis* AJ417 (cepa depositada de patente BP-8646) se transformó con RSFCPG usando el método de CaCl₂ (Molecular Cloning, 3ª edición, Cold Spring Harbor press, 2001) y se cultivó en un medio líquido LB que contenía 10 μ g/ml de tetraciclina, como resultado de lo cual se obtuvo *Pantoea ananatis* AJ417/RSFCPG (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante PA").

[Ejemplo 37]

<Preparación de variante de *Pantoea ananatis* de gen aceB deletado>

Se conoce la secuencia completa del ADN genómico de *Pantoea ananatis* AJ13355 (cepa depositada de patente BP-6614) (número de acceso a GenBank AP012032), y también se ha informado de la secuencia de bases del gen que codifica la malato sintasa de *Pantoea ananatis* (a partir de ahora en este documento a veces mencionada como "PAaceB") (número de acceso a GenBank NC_017531). Para clonar una región que flanquea la secuencia de bases

del gen que codifica aceB (1.599 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por

5 GACTCTAGAGGATCCCCGGGATGACAGACTCGGTTATCAACAGTGAATTACTTTTCAG (SEQ ID NO: 128),
 GACGGGACGGCGGCTTTGTTGGCTTCCGCGTTATGAAAAAGTAGAGAGC (SEQ ID NO: 129),
 TTGAGACACAACGTGGCTTTCCAGCAAGGACAGCGCGCAATGAATG (SEQ ID NO: 130), y
 ATGACCATGATTACGAATTCTCAGGGAAGCAGGCGGTAGCCTGGCAGAGTCAG (SEQ ID NO: 131).

Además, para clonar un gen de resistencia a kanamicina, se sintetizaron dos tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por

10 TTTTTCATAACGCGGAAGCCAACAAAGCCGCGTCCCGTCAAGTCAGC (SEQ ID NO: 132) y
 CGCGCGCTGTCTTGCTGGGAAAGCCACGTTGTGTCTCAAATCTCTGATGTTACATTGC (SEQ ID NO: 133).

15 Se preparó el ADN genómico de *Pantoea ananatis* AJ417 y se realizó amplificación por PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y un par de cebadores de la SEQ ID NO: 128 y la SEQ ID NO: 129, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN que contenía una secuencia que flanquea el gen aceB (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento PAaceB-L"). Además, se realizó amplificación por PCR usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 130 y la SEQ ID NO: 131, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN que contenía una secuencia que flanqueaba el gen aceB (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento PAaceB-R"). Además, se realizó amplificación por PCR usando el plásmido pUC4K que tiene un gen de resistencia a kanamicina y usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 132 y la SEQ ID NO: 133, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN que contenía el gen de resistencia a kanamicina (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento KanR"). El plásmido pUC18 se trató con *EcoRI* y *XmaI*, preparando de ese modo un fragmento pUC18. Este fragmento PAaceB-L, fragmento PAaceB-R, fragmento KanR y fragmento pUC18 se recuperaron, y los fragmentos se mezclaron juntos y se trataron el kit de clonación In-fusion HD (Invitrogen). Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (NEB5a; New England Biolabs) con el producto de reacción y se cultivaron en una placa LB que contenía 30 μ g/ml de kanamicina. Se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos, y se confirmó por secuenciación de ADN que el vector pUC 18 estaba construido de modo que estaba incluida la secuencia de "la secuencia flanqueante 5' de aceB_gen de resistencia a kanamicina_la secuencia flanqueante 3' de aceB". Se realizó PCR usando este plásmido como molde y usando GCCGCCGAATTCCCAGAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACC (SEQ ID NO: 134) y ATGACCATGATTACGAATTCTCAGGGAAGCAGGCGGTAGCCTGGCAGAGTCAG (SEQ ID NO: 135). El producto de amplificación se purificó y digirió con *EcoRI*, seguido por auto-ligamiento del fragmento resultante usando ADN ligasa (Takara), como resultado de lo cual se obtuvo un plásmido que no tenía origen de replicación. Se transformó *Pantoea ananatis* AJ417 con el plásmido obtenido y se cultivó en placa LB que contenía 30 μ g/ml de kanamicina. Las colonias obtenidas se sometieron a PCR genómica y secuenciación de ADN, y se confirmó que el gen aceB estaba apropiadamente delecionado. Las bacterias obtenidas se transformaron con RSFCPG usando el método de CaCl₂ y se cultivaron en medio LB que contenía 10 μ g/ml de tetraciclina. La variante obtenida se llamó variante de *Pantoea ananatis* AJ417 de gen aceB delecionado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante PA Δ aceB").

[Ejemplo 38]

<Preparación de variante de *Pantoea ananatis* de gen fumA delecionado>

45 Se preparó el ADN genómico de *Bacillus subtilis* subespecie *subtilis* cepa 168 (ATCC 23857) y se realizó amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y usando AGTCTAGAGATCCTTTTAAACCCATCAC (SEQ ID NO: 136) y AGTCTAGAAGTCGATAAACAGCAATATT (SEQ ID NO: 137) como cebadores. El fragmento de ADN obtenido se digirió con la enzima de restricción *XhoI*, obteniendo de ese modo un fragmento de ADN de aproximadamente 2,0 kpb que contenía el gen sacB. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento de ADN preparado digiriendo el plásmido pHSG298 (Takara) con la enzima de restricción *XhoI* y sometiendo el producto resultante a tratamiento con fosfatasa alcalina, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) con el producto de ligamiento resultante, y se obtuvieron transformantes que crecieron en la placa de agar LB que contenía 25 μ g/ml de kanamicina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, como resultado de lo cual se obtuvo el plásmido pHSG-sacB, en que estaba insertado el fragmento de ADN que contiene el gen sacB en pHSG298.

60 Se conoce la secuencia completa del plásmido pEA320, originalmente encontrado en *Pantoea ananatis* AJ13355, (secuencia de referencia del NCBI NC_017533.1) y también se ha informado de la secuencia de bases del gen que codifica la fumarato hidratasa clase I (a partir de ahora en este documento a veces mencionada como "fumA"). Para clonar una región que flanquea la secuencia de bases del gen que codifica fumA (1.647 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por GCAACGTTGGCTCTCATCT (SEQ ID NO: 138), CGGGATCCAAACACGCGCGGAAACA (SEQ ID NO: 139), CGGGATCCGTTAACGCAGGCTGAC (SEQ ID NO: 140) y GCTGCTGGCGTACTGGTTC (SEQ ID NO: 141).

Se preparó el ADN genómico de *Pantoea ananatis* AJ417 y se realizó PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 138 y la SEQ ID NO: 139, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 0,7 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento fumA-L"). Además, se realizó CR usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 140 y la SEQ ID NO: 141, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 0,9 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento fumA-R").

Estos fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron, y cada uno del fragmento fumA-L y el fragmento fumA-R se digirió con *Bam*HI. Los fragmentos resultantes se ligaron usando una ligasa y los extremos 5' del producto ligado se fosforilaron usando la polinucleótido quinasa T4. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento de ADN preparado digiriendo el pHSG-sacB descrito anteriormente con *Bam*HI y sometiendo adicionalmente el producto resultante a tratamiento de extremos romos con la ADN polimerasa T4 y tratamiento con fosfatasa alcalina, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron los transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 25 μ g/ml de kanamicina a 30 °C. Se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos, y se confirmó que los dos fragmentos - el fragmento de la región flanqueante cadena arriba 5' y el fragmento de la región flanqueante cadena abajo 3' del gen que codifica fumA - estaban apropiadamente insertados en pHSG-sacB. El plásmido obtenido se llamó psacB-PAfumA.

El plásmido psacB-PAfumA es replicable en *Pantoea ananatis*. Por lo tanto, para obtener un plásmido para delecionar el gen fumA que carece de un origen de replicación y que no se replicaría en *Pantoea ananatis*, se realizó amplificación por PCR usando psacB-PAfumA como molde y un par de cebadores de CTTTACACTTTATGCTTCC (SEQ ID NO: 142) y TTGAGCTCGAGAGGCTGCCTCGTGA (SEQ ID NO: 143) que tiene un sitio de reconocimiento de *Sac*I en el lado del extremo 5' del mismo, y como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 5 kb. El fragmento de ADN obtenido se digirió con *Sac*I y se permitió que ligara usando una ligasa, como resultado de lo cual se obtuvo el plásmido pPAfumA. El pPAfumA obtenido alberga el fragmento fumA-L, el fragmento fumA-R, el gen sacB y el gen de resistencia a kanamicina, pero sin origen de replicación. *Pantoea ananatis* AJ417 se transformó con pPAfumA por electroporación y se aplicó a una placa de agar LB que contenía 40 μ g/ml de kanamicina. El clon de un único entrecruzamiento que creció en el medio anterior se cultivó durante una noche en un medio líquido LB, y parte del líquido de cultivo se aplicó a un medio de agar LB que contenía sacarosa al 10 % (p/v).

Posteriormente, entre los clones obtenidos con el medio anterior, se seleccionaron los clones sensibles a kanamicina que crecieron en el medio que contiene sacarosa. Además, se amplificaron por PCR los ADN cromosómicos de estos clones usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 138 y la SEQ ID NO: 141, y se seleccionó una variante de la cual podía amplificarse un fragmento de aproximadamente 1,5 kpb, que indica delección del gen fumA. La variante obtenida se llamó variante de *Pantoea ananatis* AJ417 de gen fumA delecionado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante P Δ fumA").

[Ejemplo 39]

<Preparación de variante de *Pantoea ananatis* de gen fumA delecionado, gen fumC delecionado>

Para clonar una región que flanquea la secuencia de bases del gen que codifica la fumarato hidratasa clase II (a partir de ahora en este documento a veces mencionada como "fumC") (1.398 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por TCGCCATGATGCTGCTGTG (SEQ ID NO: 144), CGGGATCCGACTTAGCGTCATCGGTTG (SEQ ID NO: 145), CGGGATCCGATGAAGATTGCTAACGACG (SEQ ID NO: 146) y TGATGCCGACAATATTACGC (SEQ ID NO: 147).

Se preparó el ADN genómico de *Pantoea ananatis* AJ417 y se realizó PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 144 y la SEQ ID NO: 145, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 0,8 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento fumC-L"). Además, se realizó PCR usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 146 y la SEQ ID NO: 147, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 0,7 kb (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "fragmento fumC-R").

Estos fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en agarosa y se recuperaron. Cada uno del fragmento fumC-L y el fragmento fumC-R se digirió con *Bam*HI, y se permitió que estos fragmentos ligaran usando una ligasa, seguido por tratamiento de fosforilación de los extremos 5' usando la polinucleótido quinasa T4. El fragmento de ADN resultante se mezcló con un fragmento de ADN preparado digiriendo pHSG-sacB preparado en el Ejemplo 38 con *Bam*HI y sometiendo adicionalmente el producto resultante a tratamiento de extremos romos con la ADN polimerasa T4 y tratamiento con fosfatasa alcalina, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento resultante, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 25 μ g/ml de kanamicina a 30 °C. Se recuperó un plásmido de los transformantes obtenidos, y se confirmó

que los dos fragmentos - el fragmento de la región flanqueante cadena arriba 5' y el fragmento de la región flanqueante cadena abajo 3' del gen que codifica *fumC* - estaban insertados apropiadamente en pHSG-sacB. El plásmido obtenido se llamó psacB-PAfumC.

5 El plásmido pPAfumC para delecionar el gen *fumC* que carece de un origen de replicación y no se replicaría en *Pantoea ananatis* se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 38, excepto que se usó el plásmido psacB-PAfumC en lugar de psacB-PAfumA. Además, se seleccionaron clones sensibles a kanamicina que crecieron en un medio que contiene sacarosa del mismo modo que en el Ejemplo 38, excepto que se usó el plásmido pPAfumC en lugar de pPAfumA y que se usó la variante PAΔfumA en lugar de *Pantoea ananatis* AJ417. Se amplificó por PCR el ADN cromosómico de estos clones usando un par de cebadores de la SEQ ID NO: 138 y la SEQ ID NO: 141, y se seleccionó una variante de la cual podía amplificarse un fragmento de aproximadamente 1,5 kpb, que indica delección del gen *fumC*. La variante obtenida se transformó con RSFCPG por el método de CaCl₂ y se cultivó en medio LB que contenía 10 μg/ml de tetraciclina. La variante obtenida se llamó variante de *Pantoea ananatis*, de gen *fumA* delecionado, gen *fumC* delecionado (a partir de ahora en este documento abreviado a veces como "variante PAΔfumAC").

[Ejemplo 40]

<Construcción de variantes de *Pantoea ananatis* para evaluación>

20 Cada una de las variantes de *Pantoea ananatis* PA preparadas en el Ejemplo 36, la variante PAΔaceB preparada en el Ejemplo 37 y la variante PAΔfumAC preparada en el Ejemplo 39, se transformó con pGAPS preparado en el Ejemplo 34, pGAPS_gcl preparado en el Ejemplo 35, pMWGKC preparado en el Ejemplo 10, y/o pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) del Ejemplo 21 por el método de CaCl₂ o electroporación, y se aplicó a una placa de agarLB que contenía 30 μg/ml de cloranfenicol, 120 μg/ml espectinomicina y 15 μg/ml de tetraciclina. La colonia que creció en la placa se usó como la variante para evaluación. Las variantes obtenidas se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13

Nombre de la variante	Plásmido/variante	Característica
PA/vec	pMWGKC/pGAPS/RSFCPG/P. ananatis	Sin expresión de mtk, mcl y gcl
PA/mtk_mcl	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/pGAPS/RSFCPG/P. ananatis	Expresión de mtk y mcl, sin expresión de gcl
PA/mtk_mcl/gcl	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/pGAPS_gcl/RSFCPG/P. ananatis	Expresión de mtk, mcl y gcl
PAΔaceB/mtk_mcl/ gcl	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/pGAPS_gcl/RSFCPG/P. ananatisΔaceB	Expresión de mtk, mcl y gcl, alteración del gen aceB
PAΔfumAC/mtk_mc l/gcl	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/pGAPS_gcl/RSFCPG/P. ananatisΔfumAC	Expresión de mtk, mcl y gcl, alteración del gen fumAC

30 [Ejemplo 41]

<Confirmación de la incorporación de CO₂ marcado con ¹³C en glutamato en variantes de *Pantoea*>

35 Cada una de las variantes diana de *Pantoea* se precultivo en un medio LB que contenía 30 μg/ml de cloranfenicol, 120 μg/ml de espectinomicina y 15 μg/ml de tetraciclina a 30 °C, a 220 r.p.m. Las células bacterianas se recogieron del precultivo por separación centrífuga (5.000 r.p.m. durante 5 minutos). Se prepararon 2 ml de medio mínimo de *Pantoea* (17 g/l de Na₂HPO₄·12H₂O, 3 g/l de KH₂PO₄, 0,5 g/l de NaCl, 1 g/l de NH₄Cl, MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 10 μM, 50 mg/l de L-lisina, 50 mg/l de L-metionina, pH 6,0) que contenía 20 g/l de glucosa, 30 μg/ml de cloranfenicol, 120 μg/ml de espectinomicina y 15 μg/ml de tetraciclina, y las células bacterianas obtenidas se añadieron al mismo de modo que la DO se ajustó al intervalo de 1 a 5. Después de sellar fuertemente el recipiente de cultivo, las células bacterianas se cultivaron a 30 °C, a 220 r.p.m. durante 1 día. El líquido de cultivo se muestreó periódicamente y se retiraron las células bacterianas por separación centrífuga (12.000 r.p.m. durante 3 minutos). El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de filtro de PTFE hidrófila (Millipore Corporation, MSGVN2B50), obteniendo de ese modo una muestra de cultivo. Las variantes usadas como muestras de cultivo se resumen en la Tabla 13.

45 Para medir el contenido de ¹³C de glutamato en cada muestra de cultivo, se añadieron 500 μl de MTBSTFA con TBDMSCI al 1 % (fabricado por Sigma-Aldrich Co., 375934) y 500 μl de DMF seca a una cantidad apropiada de la muestra, que se secó por, por ejemplo, secado por congelación o secado al vacío. La mezcla obtenida se calentó a

80 °C durante 2 horas y después se separó por centrifugación (14.000 r.p.m. durante 5 minutos). El sobrenadante obtenido se analizó por GC-MS (Agilent 7890A y 5975c). Se midieron las áreas respectivas de los picos del espectro de masas a los pesos moleculares de 432, 433 y 434, cada uno de los cuales se asumió correspondiente a una estructura en que un grupo t-butilo estaba retirado de un derivado de glutamato. Aquí, se asume que el peso molecular de 432 corresponde a una estructura en que todos los átomos están formados de los isótopos más abundantes, que el peso molecular de 433 corresponde a una estructura que contiene un neutrón y que el peso molecular 434 corresponde a una estructura que contiene dos neutrones. Los picos a los pesos moleculares de 432, 433 y 434 se definieron como [M+0], [M+1] y [M+2], respectivamente. El valor de [M+1]/[M+0] se representó en el eje-x y el valor de [M+2]/[M+0] se representó en el eje-y. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 4.

En la fermentación general de glutamato, se incorporan ^{13}C derivado de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ mediante oxaloacetato en glutamato solamente en la posición C1 o C5. Por lo tanto, los valores mencionados anteriormente estarán posicionados en una línea de referencia. La línea de referencia se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones.

$$x = (x_0 - x_0 \alpha + \alpha)/(1 - \alpha)$$

$$y = (y_0 - y_0 \alpha + x_0 \alpha)/(1 - \alpha)$$

α representa la relación del isótopo ^{13}C en el carbono derivado de CO_2 (en la posición C1 o la posición C5) en glutamato [$\approx ^{13}\text{C}/(^{13}\text{C} + ^{12}\text{C})$]. x e y representan las coordenadas de un punto arbitrario sobre la línea de referencia. x_0 e y_0 representan los valores de x e y , asumiendo que la relación de isótopo de ^{12}C en el carbono derivado de CO_2 (en uno de la posición 1 y la posición 5 de glutamato) en glutamato es el 100 % y que las relaciones de isótopos de otros átomos son las mismas que sus relaciones de isótopos naturales (es decir, los valores de x e y , si $\alpha=0$). x_0 e y_0 se establecieron a 0,358527 y 0,16822084314, respectivamente. Resolviendo las ecuaciones anteriores, se expresa la línea de referencia en la siguiente ecuación.

$$y = x_0 \cdot x + y_0 - x_0^2$$

En la ruta intrínseca de producción de glutamato, se fija ^{13}C derivado de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ por una enzima de fijación de dióxido de carbono tal como fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc), piruvato carboxilasa (pyc) o fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (pck), y se incorpora mediante oxaloacetato en glutamato en la posición C1 o la posición C5. Aunque los valores de [M+1] y [M+2] varían dependiendo de las relaciones de $^{12}\text{CO}_2$ y $^{13}\text{CO}_2$ incorporado por ppc, los valores se representan siempre sobre la línea de referencia en un caso en que la incorporación sucede en una única posición. Por otro lado, en el caso de que funcione la ruta pretendida de fijación de dióxido de carbono, ^{13}C se incorpora en glutamato mediante oxaloacetato y acetil-CoA. En este caso, existe una posibilidad de que se incorpore ^{13}C en glutamato tanto en la posición C1 como en la posición C5, como resultado de lo cual el valor [M+2] debe aumentarse para dar un valor representado por encima de la línea de referencia.

Como se muestra en la Fig. 4, cada una de la variante PA/mtk_mcl_gcl, la variante PA Δ aceB/mtk_mcl_gcl y la variante PA Δ fumAC/mtk_mcl_gcl dieron un valor representado significativamente por encima de la línea de referencia. Es decir, se cree que el CO_2 fijado se incorporaba en glutamato mediante acetil-CoA. Por otro lado, la cepa de control (PA/vec) daba un valor representado sobre la línea de referencia y no se observaba incorporación de ^{13}C mediante acetil-CoA. Asimismo, no se observaba incorporación de ^{13}C mediante acetil-CoA en la variante en que solamente se introducía mtk+mcl (PA/mtk_mcl). Se cree que, como *Pantoea ananatis* no tiene gcl, conferir solamente mtk y mcl era insuficiente para permitir la conversión adicional de glioxilato y, por lo tanto, la reacción no continuaba adicionalmente. A partir de estos resultados, se demostró que, como se muestra en la Fig. 1, no solamente la introducción de mtk y mcl, sino también la unión a la ruta gcl cadena abajo son necesarios para la conversión de CO_2 en acetil-CoA.

[Ejemplo 42]

<Producción de glutamato por variantes de *Pantoea*>

Se midió la cantidad de glutamato y las cantidades de subproductos en el líquido de cultivo en el Ejemplo 41. La cantidad de glutamato en la muestra de cultivo se midió usando HPLC (2695, Waters) equipada con una columna NN-814 (Showa Denko K.K.) y un detector UV/Vis (2489, Waters). Las cantidades de glucosa y otros productos en el filtrado se midieron usando HPLC (2695, Waters) equipada con una columna ULTRON PS-80H (Shinwa Chemical Industries Ltd.) y un detector de IR (2414, Waters). Los resultados se muestran en las Tablas 14 y 15.

Tabla 14

Nombre de la variante	Rendimiento relativo al consumo de azúcar (24 h)	Confirmación de incorporación de ¹³ C
PA/vec	9 %	-
PA/mtk_mcl	10 %	-
PA/mtk_mcl/gcl	11 %	+
PAΔaceB/mtk_mcl/gcl	16 %	+
PAΔfumAC/mtk_mcl/gcl	16 %	+

Tabla 15

Nombre de la variante	Subproductos (g/l/24 h)						Cantidad total de subproducto
	Etanol	Piruvato	Succinato	Lactato	Acetato	2,3-BDO	
PA/vec	0,0	0,0	4,3	0,8	0,0	0,7	5,8
PA/mtk_mcl	0,0	0,0	3,0	0,5	1,7	0,1	5,2
PA/mtk_mcl/gcl	0,0	0,0	3,2	0,5	1,2	0,1	5,0
PAΔaceB/mtk_mcl/gcl	0,0	0,0	0,3	0,4	0,0	0,0	0,7
PAΔ1fumAC/mtk_mcl/gcl	0,1	0,0	0,0	0,7	3,7	0,0	4,6

5 La variante mtk+mcl+gcl inducido (PA/mtk_mcl/gcl) mostró un rendimiento mejorado relativo al consumo de azúcar, en comparación con la cepa de control (PA/vec) y la variante mtk+mcl inducido (PA/mtk_mcl). En el caso de alteración del gen aceB o el gen fumA-C (PAΔaceB/mtk_mcl/gcl, PAΔfumAC/mtk_mcl/gcl), el rendimiento relativo al consumo de azúcar se aumentó adicionalmente.

10 Respecto a las cantidades de subproductos, en comparación con la cepa de control (PA/vec), se descubrió que, inesperadamente, las cantidades de succinato y 2,3-butanodiol (2,3-BDO) se reducían y la cantidad de subproductos se reducían en la variante de mtk+mcl+gcl introducido (PA/mtk_mcl/gcl). Además, en comparación con la variante sin alteración en el gen aceB (PA/mtk_mcl/gcl), se reveló que, inesperadamente, las cantidades de succinato y acetato estaban reducidas, y también la cantidad total de subproductos estaba notablemente reducida en la variante de gen aceB alterado (PAΔaceB/mtk_mcl/gcl). En la variante de gen fumAC alterado (PAΔfumAC/mtk_mcl/gcl), la cantidad de succinato estaba notablemente disminuida en comparación con la variante sin alteración en el gen fumAC (PA/mtkΔmcl/gcl), pero la cantidad de acetato estaba aumentada y la cantidad total de subproductos estaba reducida. Estas variantes eran industrialmente preferibles, ya que una cantidad más pequeña de subproductos permite una reducción significativa en la carga de purificación cuando se recoge glutamato de un líquido de cultivo.

20 El efecto anterior de disminución de los subproductos se observó de forma similar en la variante PA que no tiene RSFCPG.

25 [Ejemplo 43]

<Preparación del plásmido pCASET>

30 Se realizó amplificación por un método de PCR usando pHSG298 (Takara) como molde y usando CGCCTCGAGTGACTCATACCAGGCCTG (SEQ ID NO: 148) y CGCCTCGAGGCAACACCTTCTTCACGAG (SEQ ID NO: 149) como cebadores, y el fragmento de ADN obtenido se digirió con la enzima de restricción *Xho*I y se permitió que ligara usando una ligasa. Después de ello se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 25 μg/ml de kanamicina. Se recuperaron los plásmidos de las células bacterianas obtenidas, y un plásmido en que estaba insertado un sitio de reconocimiento de *Xho*I en pHSG298 se llamó pHSG298-*Xho*I.

40 Para obtener el promotor tac, se realizó amplificación por un método de PCR usando pKK223-3 (Pharmacia) como molde y usando ATCATCCAGCTGTCAGGCAGCCATCGGAAG (SEQ ID NO: 150) y ATCCCCGGAATTCTGTT (SEQ ID NO: 151) como cebadores, y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *Pvu*II y *Sma*I, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 0,2 kpb que codifica el promotor tac. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento de ADN de aproximadamente 2,4 kpb preparado digiriendo el plásmido pHSG298-*Xho*I con la enzima de restricción *Pvu*II y sometiendo el producto resultante a tratamiento con fosfatasa alcalina, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 25 μg/ml de kanamicina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, obteniendo de ese modo un plásmido pHSGT1 en que el promotor lac de pHSG298-*Xho*I está remplazado por el promotor tac y el promotor tac está insertado en la misma dirección que el promotor lac original.

5 Para ligar el sitio de clonación múltiple de pHSG298 corriente abajo del promotor tac de pHSGT1, se digirió pHSG298 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *ClaI*, obteniendo de ese modo un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kpb que contenía el sitio de clonación múltiple de pHSG298. El fragmento de ADN obtenido se
 10 mezcló con un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kpb preparado digiriendo el plásmido pHSGT1 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *ClaI*, y sometiendo el producto resultante a tratamiento con fosfatasa alcalina, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 25 μ g/ml de kanamicina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, obteniendo de ese modo un plásmido pHSGT2 en que el sitio de clonación múltiple de pHSG298 está ligado corriente abajo del promotor tac.

15 El siguiente fragmento de ADN (SEQ ID NO: 152) que contiene el origen de replicación, repA y repB de pCASE1 (Appl Microbiol Biotechnol (2009) 81:1107-1115) aislado de *Corynebacterium casei* JCM 12072 se preparó por síntesis de ADN. La secuencia del mismo se muestra a continuación.

CGCCTCGAGCACTGGAAGGGTTCTTCAGGGGAACCCCCGAAACCGGGGAAACA
 TCTGACTTGGTTAAATGTCGTATTATGAACACGCCGAGGAATGAAAACCGACCGTG
 CACGCTCGTGTGAGAAAGTCAGCTACATGAGACCAACTACCCGCCCTGAGGGACG
 CTTTGAGCAGCTGTGGCTGCCGCTGTGGCCATTGGCAAGCGATGACCTCCGTGAG
 GGCATTTACCGCACCTCACGGAAGAACGCGCTGGATAAGCGCTACGTGGAAGCCA
 ATCCCGACGCGCTCTCTAACCTCCTGGTTCGTTGACATCGACCAGGAGGACGCGCTT
 TTGCGCTCTTTGTGGGACAGGGAGGACTGGAGACCTAACGCGGTGGTTGAAAACC
 CCTTAAACGGGCACGCACACGCTGTCTGGGCGCTCGCGGAGCCATTTACCCGCAC
 CGAATACGCCAAACGCAAGCCTTTGGCCTATGCCGCGGCTGTCACCGAAGGCCTA
 CGGCGCTCTGTTCGATGGCGATAGCGGATACTCCGGGCTGATCACCAAAAACCCCG
 AGCACACTGCATGGGATAGTCACTGGATCACCGATAAGCTGTATACGCTCGATGAG
 CTGCGCTTTTGGCTCGAAGAAACCGGCTTTATGCCGCCTGCGTCCTGGAGGAAAA
 CGCGGCGGTTCTCGCCAGTTGGTCTAGGTTCGTAATTGCGCACTCTTTGAAAGCGCA
 CGTACGTGGGCATATCGGGAGGTCAGAAAGCATTTTGGAGACGCTGACGGCCTAG
 GCCGCGCAATCCAAACCACCGCGCAAGCACTTAACCAAGAGCTGTTTGATGAACC
 ACTACCTGTGGCCGAAGTTGACTGTATTGCCAGGTCAATCCATAAATGGATCATCA
 CCAAGTCACGCATGTGGACAGACGGCGCCGCCGTCTACGACGCCACATTCACCGC
 AATGCAATCCGCACGCGGGAAGAAAGGCTGGCAACGAAGCGCTGAGGTGCGTCCG
 TGAGGCTGGACATACTCTTTGGAGGAACATTGGCTAAGGTTTATGCACGTTATCCA
 CGCAACGGAAAAACAGCCCGCGAGCTGGCAGAACGTGCCGGTATGTCGGTGAGA
 ACAGCTCAACGATGGACTTCCGAACCGCGTGAAGTGTTCAATAACGTGCCAACG
 AGAAGCGTGCTCGCGTCCAGGAGCTGCGCGCCAAAGGTCTGTCCATGCGCGCTAT
 CGCGGCAGAGATTGGTTGCTCGGTGGGCACGGTTCACCGCTACGTCAAAGAAGTT
 GAAGAGAAGAAAACCGCGTAAATCCAGCGGTTTAGTCACCCTCGGCGTGTTCAA
 GTCCATCGTAACCAAGTCAGCTCGAGGCG

El fragmento de ADN preparado se digirió con la enzima de restricción *Xho*I. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento de ADN preparado digiriendo el plásmido pHSGT2 con la enzima de restricción *Xho*I y sometiendo el producto resultante a tratamiento con fosfatasa alcalina, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que 25 µg/ml de kanamicina. Se recuperaron los plásmidos de las células bacterianas obtenidas, y un plásmido en que el fragmento de ADN que contenía el origen de replicación, repA y repB de pCASE1 está insertado en el sitio de reconocimiento de *Xho*I de pHSGT2 se llamó pCASET. En el pCASET recuperado, el repA derivado de pCASE1 estaba insertado en la dirección opuesta con respecto al promotor tac.

[Ejemplo 44]

<Construcción del plásmido pCASEL>

El fragmento de ADN sintetizado en el Ejemplo 43 (SEQ ID NO: 152) que contiene el origen de replicación, repA y repB de pCASE1 se digirió con la enzima de restricción *Xho*I. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento de ADN preparado digiriendo el plásmido pHSG298-*Xho*I preparado en el Ejemplo 43 con la enzima de restricción *Xho*I y sometiendo el producto resultante a tratamiento con fosfatasa alcalina, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α con el producto de ligamiento, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que 25 µg/ml de kanamicina. Se recuperaron los plásmidos de las células bacterianas obtenidas, y un plásmido en que el fragmento de ADN que contenía el origen de replicación, repA y repB de pCASE1 está insertado en el sitio de reconocimiento de *Xho*I de pHSG298-*Xho*I se llamó pCASEL. En el pCASEL recuperado, el repA derivado de pCASE1 estaba insertado en la dirección opuesta con respecto al promotor lac derivado de pHSG298.

[Ejemplo 45]

<Construcción del plásmido de expresión para mtk y mcl derivado de *Methylococcus capsulatus*>

Se realizó PCR usando pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) como molde y usando un par de cebadores de GGAATTCACAAAAGGATAAAACAATGGCTGTCAAGAACCGTCTAC (SEQ ID NO: 153) y CGAATTCTCAGAATCTGATTCCGTGTTCCCTG (SEQ ID NO: 154), como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN que contenía mcl-mtk de *Methylococcus*. Cada uno de los cebadores de las SEQ ID NO: 153 y 154 tiene un sitio de reconocimiento *Eco*RI en el lado del extremo 5'. Cada uno del fragmento de ADN obtenido y el plásmido pCASET se digirieron con *Eco*RI, y se permitió que los fragmentos resultantes ligaran. Por secuenciación de ADN, se confirmó que el fragmento mcl-mtk estaba insertado en la dirección apropiada para la expresión con el promotor del plásmido. El plásmido obtenido se llamó pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc) o pCASEL_mcl(Mc)_mtk(Mc).

[Ejemplo 46]

<Construcción de plásmidos de expresión para mtk derivado de *Granulibacter bethesdensis*, *Nitrosomonas europaea*, y *Hyphomicrobium methylovorum*>

Se transformaron células de *Escherichia coli* *dam*⁻/*dcm*⁻ competentes (New England Biolabs) con cada uno de pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Gb), pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl, y pMWGKC_mcl(Ne)_mtk(Ne), y se cultivaron en medio LB que contenía 30 µg/ml de cloranfenicol. Se recuperó un plásmido de las mismas digerido con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xba*I, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 3 kb que contenía mtk y mcl. El fragmento de ADN que contenía mtk y mcl se ligó en un plásmido pCASEL que se había digerido con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xba*I, preparando de ese modo los vectores pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Gb), pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Hme), y pCASEL_mcl(Ne)_mtk(Ne) para expresar mtk y mcl en *Corynebacterium*. Cada uno de estos vectores tiene mtk de *Granulibacter bethesdensis*, *Nitrosomonas europaea*, o *Hyphomicrobium methylovorum*.

Los plásmidos para *Corynebacterium* preparados se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16

Número de variante	Plásmido	Origen de mtk	Origen de mcl
MT-9	pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Gb)	<i>Granulibacter bethesdensis</i>	<i>Hyphomicrobium methylovorum</i>
MT-10	pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Hme)	<i>Hyphomicrobium methylovorum</i>	<i>Hyphomicrobium methylovorum</i>
MT-11	pCASEL_mcl(Ne)_mtk(Ne)	<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i>
MT-12	pCASEL_mcl(Mc)_mtk(Mc)	<i>Methylococcus capsulatus</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>
MT-13	pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)	<i>Methylococcus capsulatus</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>

[Ejemplo 47]

<Medición de actividad mtk en *Corynebacterium*>

5 Se transformó *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13012 con cada uno de los plásmidos preparados en el Ejemplo 45 y Ejemplo 46 por electroporación. El resultante se aplicó a una placa de agar LB que contenía 15 µg/ml de kanamicina y se cultivó a 30 °C durante 1 a 4 días. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 1 a 4 días en un medio líquido LB que contenía 15 µg/ml de kanamicina, y se recogieron las células bacterianas por separación centrífuga. Las células bacterianas se suspendieron en tampón MOPS-K (pH 7,7) y la suspensión obtenida se machacó con perlas de vidrio de 0,1 mm usando un Beads Shocker (MB5000, Yasui Kikai Corporation). Después de
10 ello, el sobrenadante obtenido por separación centrífuga (13.000 rpm durante 2 minutos) se usó como extracto enzimático en bruto mutante. La actividad en las células bacterianas se midió usando el extracto del mismo modo que en el Ejemplo 16. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

15 Tabla 17

Número de variante	Plásmido	Actividad (nmol/min/mg)
MT-9	pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Gb)	5,5
MT-10	pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Hme)	8,3
MT-11	pCASEL_mcl(Ne)_mtk(Ne)	11,0
MT-12	pCASEL_mcl(Mc)_mtk(Mc)	51,3
MT-13	pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)	99,1

En un caso en que se usó el plásmido pCASEL como vector de expresión, el plásmido que expresaba mtk derivado de *Methylococcus capsulatus* proporcionaba el mayor valor de actividad. Además, en comparación con la Tabla 9, se observó casi la misma co-relación entre mtk que tiene alta actividad y mtk que tiene baja actividad. La evaluación de las actividades de mtk derivado de *Methylococcus capsulatus* introducido en pCASEL y el introducido en pCASET
20 mostró una mayor actividad en la variante que tiene mtk introducido en pCASET.

[Ejemplo 48]

25 <Construcción del plásmido de expresión para mtk, mcl, gcl, y glxR en *Corynebacterium*>

Se adquirió *Rhodococcus jostii* NBRC16295 del NBRC (Biological Resource Center, Biotechnology Field, National Institute of Technology and Evaluation). NBRC16295 se cultivó en un medio (número de medio: 802, NBRC), y se obtuvo el ADN genómico del mismo usando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN). Se realizó PCR usando este
30 ADN genómico como molde y usando CGAGCTCAAGCTTACAAAAAGGATAAAAACAATGAGCACCATTGCATTCGG (SEQ ID NO: 155) y CGGGATCCCTAGTCCAGCAGCATGAGAG (SEQ ID NO: 156) como cebadores, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento glxR-gcl de *Rhodococcus* (SEQ ID NO: 157). El fragmento obtenido se digirió con *SacI* y *Bam*HI, y el resultante se ligó a un fragmento obtenido digiriendo pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc) con *SacI* y *Bam*HI.
35 El plásmido obtenido se llamó pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj).

[Ejemplo 49]

40 <Construcción de variante de *Corynebacterium glutamicum* para evaluación de la producción de glutamato e incorporación de ¹³C>

Se transformó *Corynebacterium glutamicum* DSM1412 (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como "cepa CG") con cada uno de los plásmidos construidos en los Ejemplos 43, 45 y 48 por electroporación, y se aplicó a una placa de agar LB que contenía 15 µg/ml de kanamicina. La colonia que creció en la placa se usó como
45 la variante para la evaluación. Las variantes obtenidas se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18

Nombre de la variante	Plásmido/variante	Características
CG/vec	pCASET / C. glutamicam	Sin mtk, mcl, gcl, y glxR
CG/mtk_mcl	pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc) / C. glutamicam	Expresión de mtk y mcl, Sin gcl y glxR
CG/mtk_mcl/gcl-glxR	pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj) / C. glutamicam	Expresión de mtk, mcl, gcl, y glxR

[Ejemplo 50]

<Confirmación de la introducción de CO₂ marcado con ¹³C en glutamato en variantes de *Corynebacterium*>

5 Cada una de las variantes del microorganismo a analizarse se cultivó en 2 ml de medio líquido LB que contenía 15 µg/ml de kanamicina a 30 °C y 280 rpm hasta que se consiguió suficiente crecimiento. En un matriz Erlenmeyer de 100 ml equipado con palas agitadoras, se prepararon 10 ml de medio mínimo [30 g/l de (NH₄)₂SO₄, 3 g/l de Na₂HPO₄, 6 g/l de KH₂PO₄, 2 g/l NaCl, 84 mg/l de CaCl₂, 3,9 mg/l de FeCl₃, 0,9 mg/l de ZnSO₄·7H₂O, 0,3 mg/l de CuCl₂·H₂O, 5,56 mg/l de MnSO₄·5H₂O, 0,1 mg/l de (NH₄)₂gMo₇O₂₄·4H₂O, 0,3 mg/l de Na₂B₄O₇·10H₂O, 0,4 g/l MgSO₄·7H₂O, 40 mg/l de FeSO₄·7H₂O, 500 µg/l de vitamina B1HCl, 0,1 g/l de EDTA, 10 µg/l de biotina] para *Corynebacterium* que contiene 20 g/l de glucosa y 15 µg/ml de kanamicina. Se añadió al mismo 1 ml de cultivo en el medio líquido LB anterior, y la mezcla se cultivó durante 1 a 4 días hasta que se consiguió suficiente crecimiento, mediante lo cual se obtuvo un pre-cultivo. A partir del pre-cultivo, se recogieron células bacterianas por separación centrífuga (5.000 rpm durante 15 minutos).

15 Se prepararon 2 ml del medio mínimo para *Corynebacterium* (la concentración final de biotina se cambió a 2 µg/l) que contenía hidrogenocarbonato sódico (marcado con ¹³C) 100 mM, 20 g/l de glucosa, Tween 60 al 1,5 % (p/v) (fabricado por Sigma-Aldrich Co.), y 15 µg/ml de kanamicina, y las células bacterianas del pre-cultivo se añadieron al mismo de modo que la DO se ajustara al intervalo de 1 a 5. Después de sellar fuertemente el recipiente de cultivo, las células bacterianas se cultivaron a 30 °C y 150 rpm durante 1 a 2 días. El líquido de cultivo se muestreó periódicamente y se retiraron las células bacterianas por separación centrífuga (Millipore Corporation, 12.000 rpm durante 3 minutos). El sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro de membrana de PTFE hidrófilo (Millipore Corporation, MSGVN2B50), obteniendo de ese modo una muestra de cultivo. El contenido de ¹³C de la muestra de cultivo se analizó del mismo modo que en el Ejemplo 41. Es decir, se definieron áreas respectivas de los picos a pesos moleculares de 432, 433 y 434 en análisis GC-MS como [M], [M+1] y [M+2], respectivamente, y el valor de [M+1]/[M] se representó en el eje-x y el valor de [M+2]/[M] se representó en el eje-y. La línea de referencia se obtuvo por un cálculo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 41.

30 Basándose en la Fig. 5, la variante de mtk+mcl+gcl+glxR-introducido (CG/mtk_mcl_gcl_glxR) dio un valor representado por encima de la línea de referencia, y se cree que el CO₂ fijado se incorporaba en glutamato mediante acetil-CoA. Por otro lado, la cepa de control (CG/vec), dio un valore representado casi en la línea de referencia, y no se observó incorporación de ¹³C mediante acetil-CoA. Asimismo, la variante de mtk + mcl introducidos (CG/mtk_mcl) dio un valor representado casi sobre la línea de referencia, y no se observó incorporación de ¹³C mediante acetil-CoA. Se cree que, como *Corynebacterium glutamicum* no tiene gcl y glxR, conferir solamente mtk y mcl era insuficiente para permitir que la reacción continuara, como en el caso de *Pantoea ananatis*.

[Ejemplo 51]

<Ensayo para la producción de glutamato en variantes de *Corynebacterium*>

40 Se midió la cantidad de glutamato y las cantidades de subproductos en el líquido de cultivo en el Ejemplo 50. Del mismo modo que en el Ejemplo 42, se analizó el glutamato, glucosa y otros compuestos orgánicos en el líquido de cultivo. Los resultados se muestran en las Tablas 19 y 20.

45 Tabla 19

Nombre de la variante	Rendimiento relativo al consumo de azúcar (24h)	Resultado del análisis de ¹³ C
CG/vec	2 %	-
CG/mtk_mcl	3 %	-
CG/mtk_mcl_gcl_glxR	6 %	+

Tabla 20

Nombre de la variante	Subproductos (g/l/24h)					Cantidad total de subproductos
	Etanol	Piruvato	Succinato	Lactato	Acetato	
CG/vec	0,0	0,0	0,2	1,6	0,3	2,1
CG/mtk_mcl	0,0	0,0	0,3	1,6	0,3	2,2
CG/mtk_mcl_gcl_glxR	0,0	0,0	0,1	0,6	0,2	0,9

50 La variante de mtk+mcl+gcl+glxR-introducido (CG/mtk_mcl_gcl_glxR) mostró un rendimiento mejorado relativo al consumo de azúcar, en comparación con la cepa de control (CG/vec) y la variante (CG/mtk_mcl) en que solamente se introdujo mtk+mcl.

55 Respecto a las cantidades de subproductos, en comparación con la cepa de control (CG/vec), se descubrió que, inesperadamente, la cantidad de lactato estaba principalmente reducida y la cantidad total de subproductos estaba reducida en la variante de mtk+mcl+gcl+glxR-introducido (CG/mtk_mcl_gcl_glxR). En la variante (CG/mtk_mcl) en que solamente se introdujo mtk + mcl, las cantidades de subproductos eran casi iguales a las de la cepa de control.

[Ejemplo 52]

<Potenciación de la actividad por introducción de mutaciones en el gen de la malato tioquinasa derivado de *Methylobacterium extorquens*>

5 Se realizó PCR usando pMWGKC_mtk(Mex)_mcl como molde y cada uno de los pares de cebadores mostrados en la Tabla 21. El molde se digirió con la enzima de restricción *DpnI*. Después de ello, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con el producto obtenido, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante una noche en un medio líquido LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol. Se recuperó un plásmido de una parte del líquido de cultivo y se comprobó la secuencia de ADN del mismo. Se usó un plásmido en que estaba apropiadamente introducida la mutación pretendida como la muestra mutante. Esta muestra se pre-cultivó en un medio líquido LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, y después se inoculó en 3 ml de medio líquido LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol y se cultivó a 30 °C y 280 rpm durante una noche. Se separaron 2 ml del cultivo por centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos para retirar el sobrenadante, y se añadieron 2 ml de tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) al mismo, seguido por lavado de las células. La operación de lavado se repitió una vez, y las células se suspendieron en 500 μ l de tampón fosfato 10 mM (pH 7,0). La suspensión obtenida se machacó con perlas de vidrio de 0,1 mm usando un Beads Shocker (MB5000, Yasui Kikai Corporation), y el sobrenadante obtenido por separación centrífuga (13.000 rpm durante 2 minutos) se usó como extracto enzimático en bruto mutante.

La actividad de cada extracto enzimático en bruto mutante se evaluó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 16. Los resultados se muestran en la Tabla 21. Como resultado, la mutación Q244E en mtkB y la mutación L144I en mtkB mejoraron el valor de actividad en comparación con mtkB no mutado. Además, se mejoró la actividad introduciendo otro aminoácido en la posición Q244 de mtkB, cuando el aminoácido introducido era A, L, I, M, N, Y, K, o R. Además, se mejoró la actividad introduciendo una mutación en la posición L144 de mtkB, cuando el aminoácido introducido era N, D, K, R, H, Q, o P.

Tabla 21

Tipo de mutación (Tipo silvestre)	Actividad relativa (1)	Posición —
mtkB_Q244E	1,9	158, 159
mtkB_Q244A	1,2	160, 161
mtkB_Q244L	1,1	162, 163
mtkB_Q244I	1,2	164, 165
mtkB_Q244M	1,1	166, 167
mtkB_Q244N	1,2	168, 169
mtkB_Q244Y	1,1	170, 171
mtkB_Q244K	1,3	172, 173
mtkB_Q244R	1,3	174, 175
mtkB_L144I	1,1	176, 177
mtkB_L144N	2,1	178, 179
mtkB_L144D	1,8	180, 181
mtkB_L144K	1,5	182, 183
mtkB_L144R	1,9	184, 185
mtkB_L144H	1,4	186, 187
mtkB_L144Q	1,4	188, 189
mtkB_L144P	2,4	190, 191

30 De acuerdo con la invención, el CO₂ puede convertirse en acetyl-CoA. Además, de acuerdo con la invención, las sustancias derivadas de acetyl-CoA tales como alcohol isopropílico, acetona y ácido glutámico pueden producirse de forma eficaz.

35 La descripción de la solicitud de patente japonesa n.º 2011-167808 presentada el 29 de julio de 2011 se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente y normas técnicas mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en este documento por referencia en la misma medida que si cada publicación individual, solicitud de patente o norma técnica estuviera indicada específica e individualmente como incorporada por referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> Mitsui Chemicals, Inc.

<120> Microorganismo que contiene una ruta de fijación de carbono

<130> P0011000634
 <150> JP2011-167808
 <151> 29-07-2011
 5 <160> 191
 <170> PatentIn versión 3.4
 10 <210> 1
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 1
 20 cgctcaattg caatgattga cacgattccg 30
 <210> 2
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2
 30 acagaattcg ctatttgta gtgaataaaa gg 32
 <210> 3
 <211> 50
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 3
 40 cgaattcgct ggtggaacat atgaaaaca aattgatgac attacaagac 50
 <210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 4
 gcggtacct attgctctc ctgtgaaacg 30
 <210> 5
 <211> 31
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 5
 gctctagatg ctgaaatcca ctagtctgt c 31
 65 <210> 6
 <211> 29

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> Cebador

 <400> 6
 tactgcagcg ttccagcacc ttatcaacc 29

 10 <210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 7
 20 ggtctagagc aatgattgac acgattccg 29

 <210> 8
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 8
 30 caggaattcg ctatatctgg ctctgcacg 29

 <210> 9
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 9
 40 cagtctagag caatactctt ctgatttga g 31

 <210> 10
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 10
 50 cagtctagat catcgtcgat atgtaggcc 29

 <210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 11
 60 gacctgcaga tcatccgtca gctgtacgc 29

 <210> 12
 <211> 29
 65

ES 2 599 482 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> Cebador

 <400> 12
 ggaattcggg tcaatttca ccctctatc 29

 10 <210> 13
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 13
 gtgggccgtc ctgaaggtag aaaagagata gattctc 37
 20
 <210> 14
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 14
 ctcttttga ccttcaggac ggcccacaaa ttgaag 37
 30
 <210> 15
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 15
 ggaattccca gccccgaag gccgatggc 29
 40
 <210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador
 50
 <400> 16
 cgccataga atggcgcggc ggggccggtg g 31
 55
 <210> 17
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 17
 tggagctctg ttactcctg tcaggggg 28
 65
 <210> 18
 <211> 33

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> Cebador

 <400> 18
 tggagctctc tgatttaatc aacaataaaa ttg 33

 10 <210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 19
 20 cgggatccac caccataacc aaacgacgg 29

 <210> 20
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 20
 30 ggaattcgac catcgcttac ggtaattg 29

 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 21
 40 gagcggcaag aaagacttcc tccagtgatg ttg 33

 <210> 22
 <211> 32
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 22
 50 ggagaaagtc ttcttgccg ctcccctgca ac 32

 <210> 23
 <211> 27
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 23
 60 ggaattcttt agcaaatggc ttcttc 27

 <210> 24
 65 <211> 30

ES 2 599 482 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> Cebador

 <400> 24
 ggaattcatt cagctgttgc gcatcgattc 30

 10 <210> 25
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 25
 20 cggttgtgtg tgccgtgcag ctctcgta tggatc 36

 <210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 26
 30 ggagctgcac ggcaacaaca accgtgctg actg 34

 <210> 27
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 27
 40 ggaattccag gcaggatca ataaataac 29

 <210> 28
 <211> 29
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 50 <400> 28
 ggaattccag gagaaagggc tggcacggg 29

 <210> 29
 55 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Cebador

 <400> 29
 ctttttgac gctatgttta tctctcgtt ttgc 35

 65 <210> 30
 <211> 31

ES 2 599 482 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 30
 gagataaaca tagcgtcaaa aaagccccgg c 31

 10 <210> 31
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial

 15 <220>
 <223> artificial

 <400> 31
 20 ggaattccgt ccatcattgc taccagcc 28

 <210> 32
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> artificial

 25 <220>
 <223> artificial

 <400> 32
 30 cgccatatga tcgccagcgc gcgggatttt tc 32

 <210> 33
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> artificial

 <220>
 <223> artificial

 <400> 33
 40 cgagctctgt tctctcactt actgcctgg 29

 <210> 34
 <211> 28
 45 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> artificial

 50 <400> 34
 atgagctctc tgcaacatac aggtgcag 28

 <210> 35
 <211> 29
 55 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> artificial

 60 <400> 35
 cgggatccac tacgcgcacg atggtcaag 29

 65 <210> 36
 <211> 33

ES 2 599 482 T3

<212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> artificial

 <400> 36
 cgagctacat atgcaatgat tgacacgatt ccg 33

 10 <210> 37
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> artificial

 <400> 37
 20 cgccgcatg ctatttgta gtgaataaaa gg 32

 <210> 38
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 38
 30 aatatcatg ctggggaac atatgaaagg tttgcaatg ctagg 45

 <210> 39
 <211> 40
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 39

 40 <400> 39
 acgcgtcgac ttataatata actactgctt taattaagtc 40

 <210> 40
 <211> 56
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 40

 50 <400> 40
 acgcgtcgac gctggtgaa catatgtaa aggatgaagt aattaaaca attagc 56

 <210> 41
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 60 <400> 41
 gctctagagg tacctactt aagataatca tatataactt cagc 44

 <210> 42
 <211> 46
 65

ES 2 599 482 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Cebador 44

<400> 42
gctctagacg gagaaagtct tatggcggta acgcaaacag cccagg 46

10 <210> 43
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador 45

<400> 43
cgggatcccg gagaaagtct tatgaagcaa acagttata tcgcc 45

20 <210> 44
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador 46

30 <400> 44
ccgctcgagc atatgctgtc gcaatgattg acacg 35

<210> 45
<211> 34
<212> ADN
35 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador 47

40 <400> 45
gctattccat atgcagggtt attgtctcat gagc 34

<210> 46
<211> 19
45 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador 48

50 <400> 46
tcggcacgta agaggttcc 19

<210> 47
<211> 19
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador 49

60 <400> 47
cgggtcgaat ttgcttctg 19

65 <210> 48
<211> 28

ES 2 599 482 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> Cebador 50

 <400> 48
 ctagatctga cagtaagacg ggtaagcc 28

 10 <210> 49
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador 51

 <400> 49
 20 ctagatctca gggttattgt ctcatgagc 29

 <210> 50
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador 52

 <400> 50
 30 ccgctcgagc atatgctgtc gcaatgattg acacg 35

 <210> 51
 <211> 34
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 53

 40 <400> 51
 gctattccat atgcagggtt attgtctcat gagc 34

 <210> 52
 <211> 55
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 54

 50 <400> 52
 aaaaggcgga attcacaaaa aggataaaac aatggacggt cacgagtacc aagcc 55

 <210> 53
 <211> 46
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 55

 <400> 53
 60 catgcctgca ggtcgactct agaggcgagg ttcttttcc ggactc 46

 <210> 54
 65 <211> 48

ES 2 599 482 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> Cebador 56

 <400> 54
 ggatcctcta gactggtgga atatatgagc ttcaccctga tccagcag 48

 10 <210> 55
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador 57

 <400> 55
 20 ggcacgcaag ctttacttt cgcacctcg cgtc 34

 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador 58

 <400> 56
 30 atgaccgtca cgcctcacct 20

 <210> 57
 <211> 33
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 59

 40 <400> 57
 gaagcggccg gcatccgaga agccggctg gat 33

 <210> 58
 <211> 45
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 60

 50 <400> 58
 ggaattcaca aaaagataa aacaatgagc tacacgcttt acccg 45

 <210> 59
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 61

 <400> 59
 60 gctctagatt acgcgacttt cttacgctgg ttg 33

 <210> 60
 65 <211> 963

ES 2 599 482 T3

<212> ADN
 <213> *Hyphomicrobium methylovorum*

<400> 60

5

```

atgagctaca cgctttaccc gacccgcaag cagcgcctgc agcgcctcgta cctcgcagtg      60
ccgggctcca acccgagcat gatcgatcgc gcactcaaga gcgcagccga ctatgtgttt      120
ctcgattgcg aagacgccgt cgcgcgcccc gagaaagaac aggctcgcga gaacatcatt      180
cagggcgtga acgatctcga ctggaagggc gcaggcaaga gcgtctcggc tcgcatcaac      240
ggcctcgaca cgcactacat gtaccgcgac gttgtcgaca tcgtggagca ggctggctcc      300
aagctcgaca cgatcctcat tcccaaggtc ggcgttcggc ctgacgtcta cacggctcga      360
tgcatcgtga gccagatcga agtcgcgaag ggtcttcggc accagatcgg caccgaagcg      420
ctcatcgaaa cgcgcgtcgg catggcaaac gtcgaagcca tcgcgtcggc aagcagccgc      480
ctcgagtcca tgcacttcgg cgttgctgac tactccgctt tcaacaaggc acgcaccgtc      540
gtcatcggcg gcttgaaccc tgattaccgc ggtgaccagt ggcacttccc gctgtcgcgt      600
atgaccgttg cctgccgcgc attcggcctt cgtccgatcg acggcccgtt cgggtggcatc      660
gacgatccgg aaggctacaa ggcgcgccgt cgcgcgtggcg ctgctctcgg catggaaggc      720
aagtgggcca tccatccgtc gcagatcgaa ctgcgcaacg aaatctattc gccgacggcg      780
aaggaagtcg aacgcgctga acgcatactc gttgcactga aggaagctga agctcaaggt      840
aagggcgcag cgtcgccttg cggcaagatg atcgacgccg catctgaaaa gatggcgcgc      900
aacctgctct cgactgccga gcagatcaag aaggccgagg ccgctcacgc agctcagaag      960
aaa                                                                 963
    
```

<210> 61
 <211> 1161
 <212> ADN
 <213> *Hyphomicrobium methylovorum*

10

<400> 61

ES 2 599 482 T3

atggacgttc acgagtatca ggccaaagag cttctcgcga agttcggcgt gccgatcgcg	60
cgcggcgggc ttgcttacag cccggagcag gcaacatata gtgcaagcga gcttggcggc	120
accgtcgtcg tcaagggcga gattcaactct ggcgcgcgcg gcaaagctgg cggcgtcaaa	180
gtctgcaaga acgagaaaga gatcgaagac gcggctgagt tcatgctcgg ccgcaagctg	240
gtcacgcata agaccggccc ggcgggcaag ctcgtctcgc gtctttacat cgaagaagcg	300
accaacatcg atcgcgagat ctatctcggc ttcgtgatgg atcgcgcctc cgagcgtatc	360
gtcgtcgttg catccggccc tggcggcgatg gacatcgagg aaatctctgc gagccagccc	420
gacacgatca tccgcgtgag cgttgatccg gccgtcggca tgcagcagtt ccagggcgcg	480
gaactcgcgt tcggtctcgg cgtcgatccg gagatcgtca acaagctcgt tccggcgatc	540
atgggatgct accgggcatt ccgcgatctc gacgcgacca tggttgaggt caaccgcctc	600
gtcatcacca aggaaaagca ggttctcgcg ctcgacgcta agatgtcgtt cgatgacaac	660
gcgctgttcc gccgtccgca catcgcagag ctgcgggaca agagccagga agaccgcgc	720
gaaacctacg cgtcggatcg tggcctctcc tacgttggtc tcgatggcga catcggctgc	780
atcgtcaacg gcgcaggtct cgccatggcg acgctcgaca tgatcaagct cgcaggcgg	840
gagccggcga acttctcga cattggcggc ggagcgtctc cggaacgcgt caccaagtcg	900
ttcaaggctg ttcttcgoga caagaacgtc aaggcgatcc tcgtgaacgt cttcgccggt	960
atcaaccggt gcgactgggt tgccaagggc gtggctgatg ccgtgaagga actcgagatc	1020
aagatgccga tcgtcgttcg cctcgcaggc acgaacgctg aagaaggccg caagatcatic	1080
gacaacagcg gcttgaccgt catcagtgca gatactctcg ctgacgcggc caagcaggcc	1140
gtcgacgctg cgaaaaaagc g	1161

<210> 62
 <211> 897
 <212> ADN
 <213> *Hyphomicrobium methylovorum*
 <400> 62

5

ES 2 599 482 T3

atggctatct **tcatcaatga** **aaagacgccg** **atcctgatcc** **agggcttcac** **cggacgtatc** 60
ggcacctttc **acgctcaaga** **aatgatcgac** **tacggctcca** **atggtgtcgg** **cggtgttacg** 120
cccggcaaag **gcggtacctc** **gcacctcggc** **cgtcgggtgt** **tcaacaccgt** **gaagggcgcg** 180
gccgatgaaa **ccggcgccga** **agcctcgatc** **gtattcgtgc** **cgccgcggtt** **cgccggcgac** 240
gcgatcatgg **aagcagcaga** **cgctggcatc** **aaatactgog** **tctgcatcac** **ggacggcatt** 300
cctgctcagg **atatgatccg** **cgtgaagcgc** **tacatgogcc** **gctacaagaa** **agagagccgc** 360
atggttctca **ccggcccga** **ctgcgccggc** **acgatctcgc** **ccggttaaggc** **gatgctcggc** 420
attatgccgg **gacacatctt** **ccttcggggt** **cgcgctggca** **tcgtcggacg** **ctcgggcacg** 480
ctgggctatg **aagccgcagc** **gcagctcaag** **gogctgggca** **tcggcgtttc** **gacctcggtc** 540
ggtatcggcg **gcgatccgat** **caacggttcg** **tcgcatcgtg** **acattctoga** **agcgttcgag** 600
agcgatcccg **agaccgatgc** **ggtgctcatg** **atcggtgaaa** **tcggcggacc** **gcaggaagcg** 660
gaagccggtc **tcttcgcgaa** **agagcacatg** **aagaagccgg** **tcatcgcta** **catcgcaggc** 720
ctttcggcac **cgaagggtcg** **ccgcatgggc** **cacgcaggcg** **ctatcgtttc** **ggcattcggc** 780
gaatcggccg **ctgagaaggt** **cgagatcctg** **aaaggctgca** **acgtgacgat** **cgccgcgacg** 840

ccgtcggaga **tgggttcgac** **ggtcgcgcag** **gttctcaacc** **agcgttaagaa** **agtcgcg** 897

<210> 63
 <211> 2105
 <212> ADN
 <213> *Rhizobium* sp. NGR234

 <400> 63

5

ES 2 599 482 T3

catatggaca ttcacgaata tcaagcgaaa gaactgctga gccgttatca aattcacatc 60
 ccgcgtgggtg gtctggccta ctccccggaa caagctgcct atcgtgcacg cgaaatcggc 120
 ggtgatcgct ggggtggttaa agctcagatt catagcggtg cacgtggcaa agctggcggc 180
 atcaaaactgt gctctaccga tcacgaaatt gttgaagcgg ccgacagtat gctgggccgc 240
 accatcgtga cgcacagac cggtcggcaa ggcaaactgg tttctgcct gtatgtcgaa 300
 gaagcgatgg atattgcccg tgaatttac atcggttttg ttctggaccg taaaagttaa 360
 cgcattatga tcgtcgcgag ctctagtggc ggtatggaaa ttgaagaaat cgcagaagct 420
 gaaccggata gcattatccg cggcacggcg gatccgggtg ttggcatgca ggactttcaa 480
 gcacgtgaaa ttgctttcgg tctgggcatc gataacgcgc tgattggccg cggcacccaa 540
 acgctgctgg gttgttatcg tgcattcgtt gattacgacg ctctctatgct ggaaattaac 600
 ccgctggctg tgaccctgcg cggtgatctg gtggcgctgg acgccaaaat gtcgtttgat 660
 gaaaatgcac tgttccgctg cccgcacatc gctgaaatgc gcgataaaag ccaggaagac 720
 caacgcgaaa cgtatgcac cgcacgtggt ctgtcatacg ttggtctgga cggcaacatt 780
 ggttgcatca tcaatggtgc cggcctggcg atggccacca tgatgatgat taaaatcgca 840
 ggcgggtgaac cggctaattt tctggatata ggcgggtggcg catcgcggga ccgtgtcgca 900
 aaaagcttcc gcgcccgtct gacggatcgt caggtggaaa ccattctggt taacatcttt 960
 gcgggcatta atcgttgtga ctgggtcgcg gaaggcgtga tcaaagcact gcgtgaagtg 1020
 ggtgttccgg tcccgtggt tgtccgtctg tccggtacga acatggaaga aggtcgtcgc 1080
 attctggcgg aatcaggtga aatatattatc gtggccgaaa ccctggcaga agctgctgat 1140
 aaagcagtggt ctgcgtggcg ttcggtcacc gctaataaag ctgcgtaagg tgcctccca 1200
 tgtccattct gctggataaa aataccctg tgcacgtgca aggctttacc ggcaaatcg 1260
 gctcattcca tgctgaagat atgaaacgct acggcaccaa cgtggttggc ggtgttacgc 1320
 cgggcaaagg cggtcaggca catctgggta tgccggtgtt taataccgtt aaaggcgcgg 1380
 tccaagaaac ggggtcggat gccagtatta tctttgtccc gccgcccgtt gcggccgatt 1440
 ccattatgga agcagctgac gcgggcatcc gtctgtcgt gtgtattacc gatggtatcc 1500
 cgagtcagga catgattcgt gttaaacgct atatgcgtcg ctaccgtttc gaagaccgca 1560
 tgaccctgat tgggtccgaac tgcgcaggca tgatcacgcc ggggtgaagct atgatgggta 1620
 ttatgccggg ctctatctat ctgccgggcc gtattggtat cgttggctcgt agcggtaccc 1680

ES 2 599 482 T3

tgggttacga agcagcctct caaatgaaag cgctgggctg cgggtgtgagt acgtccattg 1740
gcatcggcgg tgatccggtc aatggtagct cttttaaaga catgctggaa ctgttcgaaa 1800
aagatccggg caccgacgcc gtgctgatga ttggtgaaat cggcgggtccg caggaagcgg 1860
aagcagetct gtgggcccgc gatcacatga aaaaaccgct gatcgcgtat atcgcaggtc 1920
tgtcagcacc gaaaggtcgt cgcattgggtc acgcaggcgc tattatctca gcatttgccg 1980
aatcggctca agaaaaagtg gaaattctga aatcggcagg tgttacgata gtcccagacc 2040
cgctctcttt tggtgaaacc gttgctggatg tgctgtcggc tatgagtaaa gcccgttaat 2100
ctaga 2105

5 <210> 64
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador 66

 <400> 64
 ggaattccat atggcaaaag cgtcacgct 30

 15 <210> 65
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Cebador 67

 <400> 65
 gctctagact atatcaccgg ctttgaacg 29

 25 <210> 66
 <211> 975
 <212> ADN
 <213> *Methylobacterium extorquens*

 30 <400> 66

ES 2 599 482 T3

atgagottca ccoctgatcca gcaggccacc ccgcgcctgc accgctcggga actcgcgggt 60
 cccggctcca acccgacctt catggagaag tcggctgcct cgaaggccga cgtgatcttc 120
 ctcgacctcg aggacgcggt cgcgcccgcac gacaaggagc aggcccgcaa gaacatcatc 180
 caggctotta acgacctgga ttggggcaac aagaccatga tgatccgcat caacgggtctc 240
 gacacccact acatgtaccg cgacgtggtg gacatcgtgg aggctgccc ggcctcgcac 300
 atgatcctga tccccaaaggc cggcgtgccg gccgacgtct acgccatcga cgtgctgacg 360
 acgcagatcg agcaggccaa gaagcgcgag aagaagatcg gcttcgaggt gctgatcgag 420
 accgcgctcg gcatggccaa tgtcgaggcg atcgcgacct cgtccaagcg cctcgaggcg 480
 atgtccttcg gtgtcgccga ctacgccgcc tccactcgcg cccgctccac cgtgatcggc 540

 ggcgtcaacg ccgattacag cgtgctcacc gacaaggagc aggccgggcaa ccgccagacc 600
 cactggcagg atccgtggct gttegccag aaccgcacgc tggtcgcctg ccgcgcctac 660
 ggcctgcgcc cgatcgacgg tcccttcggc gacttctccg atccggacgg ctacacctcg 720
 gccgctcgcc gctgcgccgc gctcggcttc gagggcaagt gggcgatcca ccctcgcag 780
 atcgatctgg ccaacgaggt gttcaccccc tccgaggccg aggtcaccaa ggcccgcgc 840
 atcctggaag ccatggaaga ggccgccaaag gccggccgcg gcgccgtctc gctcgacggc 900
 cgctcatcg acatgcctc gatccgcatg gccgaggcgc tgatccagaa ggccgacgcg 960
 atgggcggga agtaa 975

<210> 67
 <211> 891
 <212> ADN
 <213> *Methylobacterium extorquens*

 <400> 67

5

ES 2 599 482 T3

atgagcattc tcatcgacga gaagaccccg atcctggtcc agggcatcac gggcgacaag 60
 ggcaccttcc acgccaagga gatgatcgcc tacggctcga acgtcgtcgg cggcgtcacc 120
 ccgggcaagg gcggcaagac ccattgcggc gtgccggtgt tcaacaccgt caaggaggcc 180
 gtggaggcga ccggcgccac cacctcgatc accttcgtgg cccccctt cggcggcgac 240
 gcgatcatgg aggcgccga cgccggcctc aagctcgtct gctcgatcac cgacggcatc 300
 cccgctcagg acatgatgcy ggtgaaacgc tacctccggc gctatccgaa ggagaagcgc 360
 acgatggtgg tgggcccga ctgcgcgggc atcatctcgc ccggcaagtc gatgctcggc 420
 atcatgcccg gccacatcta cctcccgggc aaggtcggcg tcatctcccg ttccggcacg 480
 ctgggctacg aggccgccc gcagatgaag gagctcggca tcggcatctc gacctccgtc 540
 ggcacgcggc gcgatccgat caacggctcc tccttcctcg accacctcgc tctgttcgag 600
 caggatcccg agacggaagc cgtgctgatg atcggcgaga tcggcgggccc gcaggaggcc 660
 gaggcctcgg cctggatcaa ggagaacttt tccaagcccg tgatcggctt cgtggcgggc 720
 ctaccgccc ccaagggccg ccgcatgggg catgccggcg cgatcatctc ggcgaccggc 780
 gacagcgcgg cggagaaggc cgagatcatg cgctcctatg gcctgaccgt ggcgcccgat 840
 ccgggctcct tcggcagcac cgtggccgac gtgctcgcgc gcgcggcgtg a 891

<210> 68
 <211> 1173
 <212> ADN
 <213> *Methylobacterium extorquens*

5

<400> 68

atggacgttc acgagtacca agccaaggag ctgctcgcga gcttcggggg cgccgtcccg 60
 aagggcgccc tggctttcag cccggatcaa gcggtctatg cggcgaccga gctcggcggc 120
 tcgttctggg cgggtgaaggc tcagatccat gccggcgcgc gcggcaaggc gggcgggatc 180

10

ES 2 599 482 T3

aagctttgcc gcacctaca tgaagtgcgc gacgccgcc gcgacctgct gggaaaacgc 240
 ctcgtgacgc tccagaccgg ccccgagggc aagccggtgc agcgcgtcta cgtcgagacc 300
 gccgaccctg tegagcgtga actctatctc ggctacgtgc tcgatcggaa ggccgagcgc 360
 gtccgtgtca tegcctccca gcgcggcggc atggatatcg aggagatcgc cgccaaggag 420
 cccgagggcg tgatccaggt cgtggtcgag ccggcggtgg gcctgcagca gttccaggcc 480
 cgcgagatcg cgttccagct cggcctcaac atcaagcagg tctcggccgc ggtgaagacc 540
 atcatgaacg cctaccgggc gttccgcgac tgcgacggca ccatgctgga gatcaaccgc 600
 ctcgtcgtca ccaaggacga ccgggttctg gcactcgacg ccaagatgtc cttcgacgac 660
 aacgccctgt tccgcgcgcg caacatcgcg gacatgcacg atccatcgca gggcgatccc 720
 cgcgaggccc aggctgcoga gcacaatctc agctatatcg gcctcgaggg cgaaattggc 780
 tgcacgtca acggcgcggg tctggccatg gcgaccatgg acatgatcaa gcacgcgggc 840
 ggcgagccgg caaacttctt ggatgtgggc ggcggtgcca gcccgaccg cgtcgccacg 900
 gccttccgcc tcgttctgtc ggaccgcaac gtgaaggcga tctctgtaa catcttcgcc 960
 ggcacaaacc gctgcgactg ggtcgcggag ggcgtggtca aggccgcgcg cgaggtgaag 1020
 atcgacgtgc cgtcatcgt gcggctcgc gccacgaacg tcgatgaagg caagaagatc 1080
 ctgcgcgaga gcgggctcga cctcatcacc gccgacacc ttacggaagc cgcgcgcaag 1140
 gctgtogaag cctgccacgg cgccaagcac tga 1173

<210> 69
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> *Methylobacterium extorquens*
 <400> 69

5

ES 2 599 482 T3

Met Ser Phe Thr Leu Ile Gln Gln Ala Thr Pro Arg Leu His Arg Ser
 1 5 10 15

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

Ala Ser Lys Ala Asp Val Ile Phe Leu Asp Leu Glu Asp Ala Val Ala
 35 40 45

Pro Asp Asp Lys Glu Gln Ala Arg Lys Asn Ile Ile Gln Ala Leu Asn
 50 55 60

Asp Leu Asp Trp Gly Asn Lys Thr Met Met Ile Arg Ile Asn Gly Leu
 65 70 75 80

Asp Thr His Tyr Met Tyr Arg Asp Val Val Asp Ile Val Glu Ala Cys
 85 90 95

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

<210> 70
 <211> 296
 <212> PRT

<213> *Methylobacterium extorquens*
<400> 70

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

Thr Gly Asp Lys Gly Thr Phe His Ala Lys Glu Met Ile Ala Tyr Gly
20 25 30

Ser Asn Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Lys Thr His
35 40 45

Cys Gly Val Pro Val Phe Asn Thr Val Lys Glu Ala Val Glu Ala Thr
50 55 60

Gly Ala Thr Thr Ser Ile Thr Phe Val Ala Pro Pro Phe Ala Ala Asp
65 70 75 80

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

Thr Asp Gly Ile Pro Ala Gln Asp Met Met Arg Val Lys Arg Tyr Leu
100 105 110

Arg Arg Tyr Pro Lys Glu Lys Arg Thr Met Val Val Gly Pro Asn Cys
115 120 125

Ala Gly Ile Ile Ser Pro Gly Lys Ser Met Leu Gly Ile Met Pro Gly
130 135 140

His Ile Tyr Leu Pro Gly Lys Val Gly Val Ile Ser Arg Ser Gly Thr
145 150 155 160

Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Ala Gln Met Lys Glu Leu Gly Ile Gly Ile
165 170 175

Ser Thr Ser Val Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Asn Gly Ser Ser Phe
180 185 190

Leu Asp His Leu Ala Leu Phe Glu Gln Asp Pro Glu Thr Glu Ala Val
195 200 205

Leu Met Ile Gly Glu Ile Gly Gly Pro Gln Glu Ala Glu Ala Ser Ala
210 215 220

Trp Ile Lys Glu Asn Phe Ser Lys Pro Val Ile Gly Phe Val Ala Gly
225 230 235 240

Leu Thr Ala Pro Lys Gly Arg Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Ile

ES 2 599 482 T3

245 250 255

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

Tyr Gly Leu Thr Val Ala Pro Asp Pro Gly Ser Phe Gly Ser Thr Val
275 280 285

Ala Asp Val Leu Ala Arg Ala Ala
290 295

5 <210> 71
<211> 390
<212> PRT
<213> *Methylobacterium extorquens*

<400> 71

ES 2 599 482 T3

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

Val Ala Val Pro Lys Gly Ala Val Ala Phe Ser Pro Asp Gln Ala Val
 20 25 30

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

Ile His Ala Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Ile Lys Leu Cys Arg
 50 55 60

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

Leu Val Thr Leu Gln Thr Gly Pro Glu Gly Lys Pro Val Gln Arg Val
 85 90 95

Tyr Val Glu Thr Ala Asp Pro Phe Glu Arg Glu Leu Tyr Leu Gly Tyr
 100 105 110

Val Leu Asp Arg Lys Ala Glu Arg Val Arg Val Ile Ala Ser Gln Arg
 115 120 125

Gly Gly Met Asp Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Glu Pro Glu Ala Leu
 130 135 140

Ile Gln Val Val Val Glu Pro Ala Val Gly Leu Gln Gln Phe Gln Ala
 145 150 155 160

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

Ala Val Lys Thr Ile Met Asn Ala Tyr Arg Ala Phe Arg Asp Cys Asp
 180 185 190

Gly Thr Met Leu Glu Ile Asn Pro Leu Val Val Thr Lys Asp Asp Arg
 195 200 205

Val Leu Ala Leu Asp Ala Lys Met Ser Phe Asp Asp Asn Ala Leu Phe
 210 215 220

Arg Arg Arg Asn Ile Ala Asp Met His Asp Pro Ser Gln Gly Asp Pro
 225 230 235 240

Arg Glu Ala Gln Ala Ala Glu His Asn Leu Ser Tyr Ile Gly Leu Glu
 245 250 255

Gly Glu Ile Gly Cys Ile Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Ala Thr
 260 265 270

Met Asp Met Ile Lys His Ala Gly Gly Glu Pro Ala Asn Phe Leu Asp
 275 280 285

Val Gly Gly Gly Ala Ser Pro Asp Arg Val Ala Thr Ala Phe Arg Leu
 290 295 300

Val Leu Ser Asp Arg Asn Val Lys Ala Ile Leu Val Asn Ile Phe Ala
 305 310 315 320

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

Arg Glu Val Lys Ile Asp Val Pro Leu Ile Val Arg Leu Ala Gly Thr
 340 345 350

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

Ile Thr Ala Asp Thr Leu Thr Glu Ala Ala Arg Lys Ala Val Glu Ala
 370 375 380

Cys His Gly Ala Lys His
 385 390

<210> 72
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> *Hyphomicrobium methylovorum*

5

<400> 72

ES 2 599 482 T3

Met Ser Tyr Thr Leu Tyr Pro Thr Arg Lys Gln Arg Leu Gln Arg Ser

ES 2 599 482 T3

1				5						10					15
Tyr	Leu	Ala	Val	Pro	Gly	Ser	Asn	Pro	Ser	Met	Ile	Asp	Arg	Ala	Leu
			20					25					30		
Lys	Ser	Ala	Ala	Asp	Tyr	Val	Phe	Leu	Asp	Cys	Glu	Asp	Ala	Val	Ala
		35					40					45			
Pro	Pro	Glu	Lys	Glu	Gln	Ala	Arg	Lys	Asn	Ile	Ile	Gln	Ala	Leu	Asn
	50					55					60				
Asp	Leu	Asp	Trp	Lys	Gly	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	Ser	Val	Arg	Ile	Asn
65					70					75					80
Gly	Leu	Asp	Thr	His	Tyr	Met	Tyr	Arg	Asp	Val	Val	Asp	Ile	Val	Glu
				85					90					95	
Gln	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Asp	Thr	Ile	Leu	Ile	Pro	Lys	Val	Gly	Val
			100					105					110		
Pro	Ala	Asp	Val	Tyr	Thr	Val	Glu	Cys	Ile	Val	Ser	Gln	Ile	Glu	Val
		115					120					125			
Ala	Lys	Gly	Leu	Pro	His	Gln	Ile	Gly	Thr	Glu	Ala	Leu	Ile	Glu	Thr
	130					135					140				
Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Asn	Val	Glu	Ala	Ile	Ala	Ser	Ala	Ser	Ser	Arg
145					150					155					160
Leu	Glu	Ser	Met	His	Phe	Gly	Val	Ala	Asp	Tyr	Ser	Ala	Phe	Asn	Lys
				165					170					175	
Ala	Arg	Thr	Val	Val	Ile	Gly	Gly	Leu	Asn	Pro	Asp	Tyr	Pro	Gly	Asp
			180					185					190		
Gln	Trp	His	Phe	Pro	Leu	Ser	Arg	Met	Thr	Val	Ala	Cys	Arg	Ala	Phe
		195					200					205			
Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Asp	Gly	Pro	Phe	Gly	Gly	Ile	Asp	Asp	Pro	Glu
	210					215					220				
Gly	Tyr	Lys	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Gly	Ala	Ala	Leu	Gly	Met	Glu	Gly
225					230					235					240
Lys	Trp	Ala	Ile	His	Pro	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Ala	Asn	Glu	Ile	Tyr
				245					250					255	
Ser	Pro	Thr	Ala	Lys	Glu	Val	Glu	Arg	Ala	Glu	Arg	Ile	Leu	Val	Ala
			260					265					270		

ES 2 599 482 T3

Leu Lys Glu Ala Glu Ala Gln Gly Lys Gly Ala Ala Ser Leu Asp Gly
 275 280 285

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

Thr Ala Glu Gln Ile Lys Lys Ala Glu Ala Ala His Ala Ala Gln Lys
 305 310 315 320

Lys

<210> 73

<211> 387

<212> PRT

<213> *Hyphomicrobium methylovorum*

<400> 73

Met Asp Val His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Ala Lys Phe Gly
 1 5 10 15

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

Tyr Arg Ala Ser Glu Leu Gly Gly Thr Val Val Val Lys Ala Gln Ile
 35 40 45

His Ser Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Cys Lys Asn
 50 55 60

Glu Lys Glu Ile Glu Asp Ala Ala Glu Phe Met Leu Gly Arg Lys Leu
 65 70 75 80

Val Thr His Gln Thr Gly Pro Ala Gly Lys Leu Val Ser Arg Leu Tyr
 85 90 95

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

Met Asp Arg Ala Ser Glu Arg Ile Val Val Val Ala Ser Ala Ala Gly
 115 120 125

Gly Met Asp Ile Glu Glu Ile Ser Ala Ser Gln Pro Asp Thr Ile Ile
 130 135 140

Arg Val Ser Val Asp Pro Ala Val Gly Met Gln Gln Phe Gln Ala Arg
 145 150 155 160

5

10

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

<210> 74
 <211> 299

<212> PRT

<213> *Hyphomicrobium methylovorum*

<400> 74

5

ES 2 599 482 T3

Met Ala Ile Phe Ile Asn Glu Lys Thr Pro Ile Leu Ile Gln Gly Phe
1 5 10 15

Thr Gly Arg Ile Gly Thr Phe His Ala Gln Glu Met Ile Asp Tyr Gly
20 25 30

Ser Asn Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Thr Ser His
35 40 45

Leu Gly Arg Pro Val Phe Asn Thr Val Lys Gly Ala Ala Asp Glu Thr
50 55 60

Gly Ala Glu Ala Ser Ile Val Phe Val Pro Pro Pro Phe Ala Ala Asp
65 70 75 80

Ala Ile Met Glu Ala Ala Asp Ala Gly Ile Lys Tyr Cys Val Cys Ile
85 90 95

Thr Asp Gly Ile Pro Ala Gln Asp Met Ile Arg Val Lys Arg Tyr Met
100 105 110

Arg Arg Tyr Lys Lys Glu Ser Arg Met Val Leu Thr Gly Pro Asn Cys
115 120 125

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

His Ile Phe Leu Pro Gly Arg Val Gly Ile Val Gly Arg Ser Gly Thr
145 150 155 160

Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Ala Gln Leu Lys Ala Leu Gly Ile Gly Val
165 170 175

Ser Thr Ser Val Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Asn Gly Ser Ser His
180 185 190

Arg Asp Ile Leu Glu Ala Phe Glu Ser Asp Pro Glu Thr Asp Ala Val
195 200 205

Leu Met Ile Gly Glu Ile Gly Gly Pro Gln Glu Ala Glu Ala Gly Leu
210 215 220

Phe Ala Lys Glu His Met Lys Lys Pro Val Ile Ala Tyr Ile Ala Gly
225 230 235 240

Leu Ser Ala Pro Lys Gly Arg Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Val
245 250 255

ES 2 599 482 T3

Ser Ala Phe Gly Glu Ser Ala Ala Glu Lys Val Glu Ile Leu Lys Gly
260 265 270

Cys Asn Val Thr Ile Ala Ala Thr Pro Ser Glu Met Gly Ser Thr Val
275 280 285

Ala Gln Val Leu Asn Gln Arg Lys Lys Val Ala
290 295

5 <210> 75
<211> 299
<212> PRT
<213> *Rhizobium* sp.

<400> 75

ES 2 599 482 T3

Met Ser Ile Leu Leu Asp Lys Asn Thr Arg Val Ile Val Gln Gly Phe
1 5 10 15

Thr Gly Lys Ile Gly Ser Phe His Ala Glu Asp Met Lys Arg Tyr Gly
20 25 30

Thr Asn Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Gln Ala His
35 40 45

Leu Gly Met Pro Val Phe Asn Thr Val Lys Gly Ala Val Gln Glu Thr
50 55 60

Gly Ala Asp Ala Ser Ile Ile Phe Val Pro Pro Pro Phe Ala Ala Asp
65 70 75 80

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

Thr Asp Gly Ile Pro Ser Gln Asp Met Ile Arg Val Lys Arg Tyr Met
100 105 110

Arg Arg Tyr Arg Phe Glu Asp Arg Met Thr Leu Ile Gly Pro Asn Cys
115 120 125

Ala Gly Met Ile Thr Pro Gly Glu Ala Met Met Gly Ile Met Pro Gly
130 135 140

Ser Ile Tyr Leu Pro Gly Arg Ile Gly Ile Val Gly Arg Ser Gly Thr
145 150 155 160

Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Ser Gln Met Lys Ala Leu Gly Val Gly Val
165 170 175

Ser Thr Ser Ile Gly Ile Gly Gly Asp Pro Val Asn Gly Ser Ser Phe

ES 2 599 482 T3

Val Leu Asp Arg Lys Ser Glu Arg Ile Met Ile Val Ala Ser Ser Ser
 115 120 125

Gly Gly Met Glu Ile Glu Glu Ile Ala Glu Ala Glu Pro Asp Ser Ile
 130 135 140

Ile Arg Ala Thr Val Asp Pro Gly Val Gly Met Gln Asp Phe Gln Ala
 145 150 155 160

Arg Glu Ile Ala Phe Gly Leu Gly Ile Asp Asn Ala Leu Ile Gly Arg
 165 170 175

Ala Thr Gln Thr Leu Leu Gly Cys Tyr Arg Ala Phe Val Asp Tyr Asp
 180 185 190

Ala Ser Met Leu Glu Ile Asn Pro Leu Val Val Thr Arg Arg Gly Asp
 195 200 205

Leu Val Ala Leu Asp Ala Lys Met Ser Phe Asp Glu Asn Ala Leu Phe
 210 215 220

Arg Arg Pro His Ile Ala Glu Met Arg Asp Lys Ser Gln Glu Asp Gln
 225 230 235 240

Arg Glu Thr Tyr Ala Ser Asp Arg Gly Leu Ser Tyr Val Gly Leu Asp
 245 250 255

Gly Asn Ile Gly Cys Ile Ile Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Ala Thr
 260 265 270

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

Ile Gly Gly Gly Ala Ser Pro Asp Arg Val Ala Lys Ser Phe Arg Ala
 290 295 300

Val Leu Thr Asp Arg Gln Val Glu Thr Ile Leu Val Asn Ile Phe Ala
 305 310 315 320

Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Val Ala Glu Gly Val Ile Lys Ala Leu
 325 330 335

Arg Glu Val Gly Val Pro Val Pro Leu Val Val Arg Leu Ser Gly Thr
 340 345 350

Asn Met Glu Glu Gly Arg Arg Ile Leu Ala Glu Ser Gly Glu Asn Ile
 355 360 365

ES 2 599 482 T3

Ile Val Ala Glu Thr Leu Ala Glu Ala Ala Asp Lys Ala Val Ala Ala
370 375 380

Trp Arg Ser Phe Thr Ala Asn Lys Ala Ala
385 390

5 <210> 77
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 77
ccctgaggag ggtccaagag atggacgtcc atgagtacca 40

15 <210> 78
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 78
gctctagatc aggctgcctg acgcca 27

25 <210> 79
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 79
ggaattcaca aaaaggataa aa 22

35 <210> 80
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador

<400> 80
tggactcat ggacgtccat ctcttgacc ctctcagg 40

45 <210> 81
<211> 897
<212> ADN
<213> *Granulibacter bethesdensis*

50 <400> 81

ES 2 599 482 T3

atgagcattc	tgatcaataa	gcagaccaag	atcatcattc	agggcttcac	cggcgacaag	60
ggcacggtcc	acggtcgcga	gatgatcgat	tacggcacca	atgtcgtcgg	tggcgtgacg	120
cccggtaaag	gcggccagac	ccatctgggt	cgccccgtgt	tcaacacggt	cgaggacgcg	180
gtgcgtgaaa	ccggtgccca	ggcgtcgatc	acctttgtgg	cacctgcctt	ttgcgccgat	240
gcgatcatgg	aaggcgccga	tgcggggctg	gagctgatct	gcacatcac	ggacggtatt	300
ccggcgcagg	atatgatgcg	cgtgaagcgt	tatctgcgcc	gctaccagaa	ggatcgtcgc	360
acgcgtctgg	tggggccgaa	ctgcgcgggc	atcatcagcc	cgggccaggc	catgctgggc	420
atcatgccgg	gccatatcta	caaggaaggc	catgtcggca	ttgtttcccg	ctcaggcacg	480
ctcggctatg	aagccgccgc	gcagctgaag	gagctgggca	tcggtgtgtc	caccagtgtg	540
ggtatcggtg	gtgaccgat	caatggttct	tccttccttg	atcaccttca	gctgttcgaa	600
gccgaccccg	agactcatgc	cgtgctgatg	atcggcgaga	tcggtggccc	gcaggaagcc	660
gaagcggcga	agtggatcag	cgagaacatg	tcgaagccgg	tggttggcta	cgttgccggc	720
ctgaccgctc	cgaaggggcg	tcgtatgggc	catgccggtg	cgatcatctc	tggcgaaggc	780
gacagcgccg	ccgaaaagag	cgagatcatg	cgctcctacg	gtctgacggt	tgctcccagc	840
ccgggtgaac	tcggctcgac	cgttgccgcg	gtgctggctg	ggcgtcaggc	agcctga	897

<210> 82
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> *Granulibacter bethesdensis*

5

<400> 82

ES 2 599 482 T3

atggacgtcc atgagtacca ggcaaaagaa ttgcttgcca gcgccggtgt ggccgtgcc 60
 cgcggtgcaa tcgctttcag cgctgatcag gccgtgatg ccgcgaccga actgggtggc 120
 tggcactggg cggtgaaagc ccagattcat gccggtgccc gcggcaaggc cggcggcatc 180
 aagctgtgca agacgtatca tgaagtgcgc gaggctgctg ccggtatgct cggcaagcgt 240
 ctggtcacgc atcagaccgg tccggaaggc aagcctgtcc agcgcgtgta tgtcgaggtc 300
 gccgatccct tcgagaaaga attctatctg ggctttgtgc tggatcgtaa gctggagcgc 360
 gtgctgtgta tcgcctccgc cgagggcggc atggagatcg aggaaatcgc ttccaagcat 420
 ccggaaaagc tgatccaggt gatcgtggag ccggcgggtg gtcttcagca gttccaggcc 480
 cgccagatcg cttcaagct gggcctgtcc agccgtcagg tacagcgtgc ggtgaccagc 540
 atcatgggcg cttatcgcc attccgcgat cacgacgcca ccatgctgga aatcaatcct 600
 ctggttctga ccaaggatga ccgtattctg gcgctcgatg cgaagatgag cttcgacgac 660
 aacgccttgt tccgtcgcaa caacgtcgcc aacatgcatg acccctctca ggacgatccg 720
 cgtgagggcg aggctgccga gcacaacctc aactatgtgg gtctggaagg cgatatcggc 780
 tgcgtggtga atggcgccgg cctggcgatg gcgaccatgg acgtcatcaa atatgcccgt 840
 ggtgagcctg ccaacttcct cgatgtcggc ggcggggcaa gccccgagcg taccgagcgc 900
 gcgttccgtc tgggtgctgtc cgacaagaac gtgaagggtg ttctggtcaa catcttcgcc 960
 ggcatacaacc gctgcgactg gatcgcggaa ggcgtggtgc acgcggtgaa agaagtcgat 1020
 ctgaagcttc cgctggtggt gcgtctggca ggcaccaatg tggaggaagg ccgccgtatt 1080
 ctgaaagaaa gcggcatttc cgatcatcatg gccgaaagcc tgaccgaagc ggccgaaaag 1140
 gccgtcgagg ccgcgaaggc cgcggcgtaa 1170

5 <210> 83
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 83
 accaggaat tcacaaaaag gataaaacaa tgagctatac cctctacca accgtaagc 59

15 <210> 84
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 84
 gccactcta gatcaggcaa ctttttctg ctgcccgaga acc 43

ES 2 599 482 T3

<210> 85
 <211> 963
 <212> ADN
 <213> *Hyphomicrobium denitrificans*

5

<400> 85

```

atgagctata ccctctaccc gaaccgtaag cagcgtctgc agcgttctta tctcgccgtg      60
ccgggctcca acccgacgat gatcgaccgc gccctcaaga gcgcccgcga ctacgttttc      120
cttgattgcg aagacgccgt cgcgcgcccc gagaaagagc aggctcgcaa gaacatcatc      180
caggctctga acgatctcga ctggaagggc gcgggcaaga gcgtctcggc ccgcatcaac      240
ggcctcgaca cgcattattg ctaccgcgac gtcgctcgaca tcgctcgagca ggctggtgcc      300
aagctcgata cgatcctcat tccgaaggtc ggcgttccgg ccgacgtcta cgccatcgaa      360
agcttcgtca gccagatcga agtcgcgaag ggtctcccgc accagatcgg catggaagcc      420
ctcatcgaaa cgcgcgtcgg catggccaac gtcgaagcca tcgctctctc caacagccgc      480
cttgagtoga tgcacttcgg cgttgccgac tactccgcat tcaacaaggc ccgcaccgtc      540
gtcatcggcg gcttgaacct cgactatccg ggtgaccagt ggcacttccc gctgtcgcgc      600
atgacggctg cctgcgcgcg attcggcttc cgtccgatcg acggcccgtt cggcggcadc      660
gacgatccgg aaggctacaa ggccgctgcg cgcctgtgtg ccgctctcgg catggaaggc      720
aagtgggcga tccacccctc gcagatcgaa ctgcccaacg aaatctactc tccgacggcg      780

aaggaatcg aacgcgccga gcgcatcctg gtcgcaactca aggaagccga agcgcagggc      840
aagggcgcag catcgctcga cggcaagatg atcgacgcgg catctgaaaa gatggcgaag      900
aacctgctgg tcacggcagc ggcgatcaag gcagggcgaag aagctcgcgc aaagagcaaa      960

taa                                                                 963
    
```

10 <210> 86
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> *Hyphomicrobium denitrificans*

15 <400> 86

ES 2 599 482 T3

atggcaatct ttatcaatga aaagacgccg atcctgatcc agggctttac cggctgcatac 60
ggcacgttcc acgcccagga aatgatcgac tacggctcca acgtcgttgg cggcgtgacg 120
cccggtaaag gcggcacctc gcatctcggc cgtccggtgt tcaacaccgt caagggcgcc 180
gtcgcagaga cgggcgctga agcctccatc gtgttcgtgc cgcgcgctt cgcggctgac 240
gcgatcatgg aagcggccga cgctgggatc aaatactgcg tctgcatcac ggaocggcatt 300
cctgctcagg atatgatccg cgtgaagcgc tacatgcgcc gctacaagaa agaagcgcgc 360
atgatcctga ccggcccga ctgcgcggc acgatctcgc caggcaaggc gatgctcggc 420
atcatgccgg gacacatcta ccttcgggc cgcgtcggca tcgtcggccg ctccggtaacg 480
ctcggctacg aagccgcgc gcagctcaag gcccttggca tcggcgtctc gacgtcggtt 540
ggtatcggcg gcgaccgat caacggctcg tcgcatcgtg acgtcctcga gcaactcagag 600
aacgatcccg agaccgacgc gatcctgatg atcggcgaaa tcggtggtcc gcaggaagcc 660
gaagccggcc tcttcgcaa agagcacatg aagaagcctg tcatcgcta catcgccggt 720
ctgtcggccc cgaagggccg ccgcatggc cacgctggcg ccatacgttc ggcattcggc 780
gagtcggctg ctgagaaggt cgagatcctg aagggtcgc gcgtcgtat cgcgccgacg 840
ccgtcggaaa tgggctcgac cgtcgcgcag gttctcggca agcagaaaaa agttgcctga 900

<210> 87
<211> 1164
<212> ADN
<213> *Hyphomicrobium denitrificans*

5

<400> 87

atggacattc atgaatacca ggccaaagag cttcttgcca agttcggcgt gccgatcgcc 60
cgcggcggac ttgcctacag ccctgaacag gccacctatc gcgccagcga gcttggcggc 120
acggtcgtcg tcaaggcgca gattcactcc ggcgcgcgcg gtaaagccgg cggcgtcaag 180
gtctgcaaga cggaaaagga aatcgaggat gcagccgagt tcatgctcgg ccgcaagctc 240
gtcacgcacc aaacgggatc ggccggcaag ctggtctcgc gcctctacat cgaagaagcg 300
acgaacatcg atcgcgaaat ctatctcggc ttcgtgatgg accgcgcttc ggagcgcatac 360

10

ES 2 599 482 T3

gtcgtcgtgg cctcggccgc gggcggcatg gacatcgagg aaatctcggc gtcgcagccc 420
gacacgatca tccgcgtcgc cgtcgacccg gcggtcggca tgcagcagtt ccaggcacgt 480
gagctggcat tcggacttgg cgtcgatcct gagatcgtca acaagctcgt gcccgcgatc 540
atgggctgct atcgcgcctt ccgcgatctc gatgcgatga tggttgaaat caacccgctc 600
gtcatcacca aggaaaagca ggtcgttgcg ctcgacgcca agatgtcgtt cgacgacaac 660
gcgctgttcc gccgtccgca catcgccgag ctgocgaca agagccagga agatccccgc 720
gaaacctacg cgtcggatcg tggctctctc tacgtcggtc tcgatggcga catcggtcgc 780
atcgtcaacg gtgccggtct cgcgatggcg acgctcgaca tgatcaagct tgcgggcggc 840
gagcctgcca acttcctcga catcggcggc ggcgcctctc ccgagcgcgt caccaagtgc 900
ttcaaggcgg ttctgcgcca caagaacgtc aaggccatcc tggccaacgt ctctgccggc 960
atcaaccggt gcgactgggt tgccaagggt gtcgtcgacg ccgtcaagga actcgatatc 1020
aagctgccga tcgtcgttcg cctcgcaggc accaacgtcg aagaaggccg caagatcatc 1080
gacaacagcg gcctgacggt catcagcgcg gaaactctcg ccgatgctgc caagcaggcg 1140
gtcgaagcgg ccaaaaaagc ctaa 1164

5 <210> 88
<211> 60
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 88
gcgggggaat tcacaaaaag gataaaacaa tgagtcatac cctgtatgaa ccaaaacacc 60

15 <210> 89
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 89
caggcgtcta gattagagtc cggccagaac tttgcgacg 40

25 <210> 90
<211> 951
<212> ADN
<213> *Nitrosomonas europaea*

30 <400> 90

ES 2 599 482 T3

atgagtcata	ccctgtatga	aaccaaaaca	ccgcgtgtac	agcgcctgca	actggctgtt	60
ccgggttccc	gtcccgaat	gtttgaaaa	gcgctgaaaa	gcggagtgga	cttcatattt	120
ctggatctgg	aggatgcagt	cgcaccagat	gacaagatcc	aggcaagaaa	aaatatcatt	180
caggcaatca	atgatctgga	ctggaaaagt	cacgggtgtca	cgctttctgt	acgcatcaat	240
ggtctcgata	cccaatatat	ggtgcgtgat	gtggtcgatc	tggtagagca	ggccgggcac	300
aagatcgata	cgttgctgat	tcccaaagta	ggtgtttatg	ctgatgttta	catggctgaa	360
gccatgctca	gccagcttga	aatgcagcag	gggctgaaaa	accgaattgg	tgtggaagca	420
ctgatcgaaa	cggcactggg	gatggccaat	gttgaagata	tcgcccgcag	aggaacggcc	480
gggctctctg	aagcattgca	tttcggtgta	gctgactacg	ctgccagcaa	tcgtgcacgt	540
accaccaata	tcggcgggct	caatccggat	tatccagggg	atcagtggca	cgcagccatc	600
agcagaatga	ccgttgccctg	ccgcgcattc	ggcctgcgac	caatcgatgg	cccatttggg	660
gacattcagg	atcccgaagg	ttacaaacag	gcagccagac	gtgctgcagc	actgggttgt	720
gaaggtaaat	gggcaattca	tccgacacag	atcgcgctgg	ccaatgaagt	ctttacgccg	780
cccacagcag	aagtcgacaa	agccaaaacgc	attctgacag	cattgaagga	agctgcagct	840
caaggtaaag	gtgcagcctc	acttgatggc	cgctgatcg	atgccgcttc	ggaagaatg	900
gcaataaca	tcgtcaaat	ggcggaagca	attgctgcca	aaagcaata	a	951

<210> 91
 <211> 888
 <212> ADN
 <213> *Nitrosomonas europaea*

 <400> 91

5

ES 2 599 482 T3

gtggcaattc tcatcaatga gcagacgcg atcatcgta agggtttac cggccggatc 60
ggcaccttcc atgctcagga aatgatcgat tacggatota atgtagtggg aggggtaacg 120
cccggcaaa gggggcagaa acacctgggg ctgccagtat tcaataccgt ccgggaagca 180
gtcgagcagg caggtgcgga agccagcatt gtattcgcc cgccggcatt tgcggctgat 240
tcgattatgg aagcagccga tgcgggtatc aaatattgcg tatccatcac cgatggcatt 300
ccaaccagc acatgatgac cgtcaaaaac ttcttacgcc tcttccctga ggaggacaga 360
atgatgctga ccggcccaaa ctgttcagge actatcagcc ccggacgggc gatgttgggc 420
atcatgccgg ggcataatta cagccgtggg gtcggttggg tcgtcggccg ttccgggtaca 480
ctgggttatg aagctgccga ccagatgccg cggtgaata tcgggatttc gacttcggta 540
ggtattggcg gagaccgat catcggcagt tcgcaccgga atgtgctgca aaagctggaa 600
gaagatccgg aaaccaagt cacgctgatg attggtgaaa ttggtggccc aatggaagta 660
gaagccggac tgttcgcaaa ggaaaacatg agcaaaccgc tggttgcta cattgccggc 720
ctgactgcac ctcccgaag acggatgggg cacgccggag caatcatctc ttcagccggt 780
gaaagcgcag cagaaaaagt ggaaagactg aaagaactgg gcgtcaccat ctgcccgact 840
ccgtctctga tgggtgaaac cgtcgcaaaa gttctggccg gactctaa 888

<210> 92
 <211> 1173
 <212> ADN
 <213> *Nitrosomonas europaea*

5

<400> 92

ES 2 599 482 T3

ttggatatcc atgaatatca ggccaaggaa atcctggctg aatacggat caagctggct 60
 gaaggcggat tggcgcacac tgtggaagaa gcggtacaac gcagccggga aatcgatggc 120
 aatgtgtggg tctgcaaggc acaaatccat tccggcgccc gtggtaaagc aggcgggtgtc 180
 aaagtatgcc ggacacatga agaaatcgaa gtcgcagctg aatcactgct ggggaaaaaa 240
 ctggtcacac accaaaaccgg cccggcgggt aaactctgct ccagactgta tatcgaagcc 300
 ggtaccgaaa ttgcccgga agtgtatctc gctttcatga tcgatcgag tcatgaacgt 360
 atcgtcatgg tgggttcgac acagggggga atggatatcg agaccctggc agccacgaat 420
 cctgatgcca tcaaaaaaat tcacatcgag cctgctgtcg gcctgcagga tttccaggca 480
 agaaccatgg cttttgact gggctctgga gatgttctgc tcaatcacgc cgtcaagacg 540
 atcagaggtt gctaccgagc catgagcgat ctggatgaga acatactcga aatcaaccgc 600
 ctggttgtca cgcgcaacaa cgagctgatc gcaactggatg cgaagatgag ctttgatgaa 660
 aatgcaactg tccggcgcca cggatttcc gaattgctg acaactcaca aatcgattcg 720
 cgcgaaattg ctgcagcggga agcaggcttg agctacgtcg ggctggatgg agacatcggc 780
 tgcgatgatca atggcgccgg gctggcaatg gccaccatgg acatgatcaa actggccggc 840
 ggcgaaccgg ccaatcttct ggatgtcggc ggcggcgcat ctgccgagcg aactgaaaaa 900
 gcattccggc tggactggc ggataacaac gtaaaagcca tgctggtcaa tatctttgcc 960
 ggtattaacc gctgtgactg gattgccgaa ggtgtggttc aggctgtacg gaatatcgga 1020
 atgacgggtc ctctggtcgt gcgcctgtct ggcaccaacg tggagaagg cgcgccgtatc 1080
 atcgtgaca gcgggttgcc gatcattact gcagaaacce tggccgatgc agcagagaaa 1140
 gtagtgacg ctcgcaacca ggctgcagtt tga 1173

5 <210> 93
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador

 <400> 93
 ggaattccat atggctgta aaatcgtct ac 32

 15 <210> 94
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Cebador

 <400> 94
 gctctagatc agaactgat tccgtgtc 29

ES 2 599 482 T3

<210> 95
 <211> 963
 <212> ADN
 <213> *Methylococcus capsulatus*

5

<400> 95

atggctgtca	agaaccgtct	acaccgcage	gaactcgcgg	tgccgggcag	caatccacgc	60
atgctcgaga	aagcgcggga	agccggcgcc	gacatcgtct	ttctggacct	ggaagatgcg	120
gttgcgccgg	atgacaagga	gcaagcgcgc	cggaacatcg	tcttcgcgct	caacacctac	180
gactggtcca	gatgcggcgt	ctccgtccgc	atcaacggcc	tcgacacca	ttacgcctac	240
cgggacctcg	ttgagatcgt	cgagtcctgc	ggcgacaagc	tcgacacccat	tctggtgccg	300
aaagtccgca	gcgccctcga	cgttctgttc	gtcgcgactt	tactttccca	gatcggaggcc	360
tacaaagggtt	tcaaaccgat	caatatccac	gtgctgatcg	aaacggccat	gggcatggcc	420
aacgtggagg	agatcgcccg	cacctgtcct	gaacgcgatg	aggccatggt	gttcggcgtg	480
gccgactacg	ctgcgtcggg	gcgcgcccgc	acgaccaaca	tcggcggcgc	caacccggat	540
tacggcatgc	tgaccgaccc	tgacgaaagc	ggtacccgcg	cctatcactg	ggccgaccag	600
tggcatttcg	gcatttcccg	catggtcgcg	gcctgccgcg	cctatgggct	tcgccccatc	660
gacggcccct	tcggcgattt	cagcgatccg	gaaggattcc	gcgcccgcagc	ccgccgtgcc	720
gcggcactgg	gctgcgaagg	gaagtgggcg	atccatccct	cccagattcc	actgtgcaac	780
gaaatcttca	caccacgcga	aaaagaggtc	acgcgggcct	accgcacccct	ggaagccatg	840
gagcagggcg	caaaggaggg	caaaggcgcg	gtgtctctgg	atgggcggct	gatcgatgcc	900
gcctcgatcc	ggatggcgga	gaacgtggtc	cgccagatga	agcagatcga	gtcgcgtcgg	960
tag						963

10 <210> 96
 <211> 903
 <212> ADN
 <213> *Methylococcus capsulatus*

15 <400> 96

ES 2 599 482 T3

atgagcgtat tcgttaacaa gcactccaag gtcactctcc agggcttcac cggcgagcac 60
 gccaccttcc acgccaagga cgccatgcgg atgggcaccc gggtaggtcgg cgggtgcacc 120
 cctggcaaag gcggcacccg ccatcccgat cccgaactcg ctcatctgcc ggtgttcgac 180
 accgtggctg aagccgtggc cgccaccggc gccgacgtct cggccgtggt cgtgcgcggc 240
 cccttcaatg cggacgcgtt gatggaagcc atagacgccg gcatccgggt cggcgtgacc 300
 atcgccgacg gcatcccgtt acacgacatg atccgactgc agcgctaccg ggtgggtaag 360
 gattccatcg tgatcggacc gaacaccccc ggcacatca cggcgggcca gtgcaagggtg 420

 ggcacatgc ctctgcacat ttacaagaag ggcaacgtcg gcatcgtgtc gcgctccggc 480
 accctcaatt acgagggcagc ggaacagatg gccgcgcttg ggtggggcat caccacctcg 540
 gtcggtatcg gcggtgacct catcaacgga accgatttcg tcaactgtcct gcgcgccttc 600
 gaagccgacc cggaaaccga gatcgtgggtg atgatcggcg aaatcggcgg cccccaggaa 660
 gtgcgcgcgg cccgctgggc caaggaaaac atgacaaagc cggtcacggy ctctcgtcgca 720
 ggccttgccg caccgaccgg ccgacgcgatg ggccatgccg gcgccatcat ctccagcgag 780
 gccgacaccg ccggagccaa gatggacgcc atggaagcct tggggctgta tctcgcgccg 840
 aacccggcac agatcggcca gaccgtgcta cgcgccgcgc aggaacacgg aatcagattc 900
 tga 903

<210> 97
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> *Methylococcus capsulatus*

 <400> 97

5

ES 2 599 482 T3

gtgaatatcc atgagtacca ggccaaggag ctgctcaaga cctatggcgt gcccgtgccc 60
gacggcgccg ttgcctattc cgacgcgcag gccgccagcg tcgcccagga gatcggcggc 120
agccgctggg tggtaaggc gcagatccat gccggcggtc gcggcaaggc cgggggcgta 180
aaggtcgccc actccatcga ggaagtcgc caatacgcg acgccatgct cggcagccac 240
ctcgtcacc atcagaccgg cccgggagc tcgctggtc agcgtctgtg ggtggaacag 300
gccagccata tcaaaaagga atactacctg ggcttcgtga tcgatcgcg caatcaacgc 360
atcaccctga tcgcctccag cgagggcggc atggaaatcg aggaagtcgc aaaggaaacc 420
ccggagaaaa tcgtcaagga agtcgtcgat ccggccatag gcctgctgga cttccagtgc 480
cgcaaggctg ccacggcgat cggcctgaaa ggcaaaactga tgcccaggc cgtcaggctg 540
atgaaggcca tctaccgctg catgcgcgac aaagatgccc tgcaggccga aatcaatcct 600
ctggccatcg tgggcgaaag cgacgaatcg ctcatggtcc tggatgcaa gttcaacttc 660
gacgacaacg ccctgtaccg gcagcgcacc atcaccgaga tgcgcgacct ggccgaggaa 720
gacccgaaag aggtcgaagc ctccggccac ggtctcaatt acatcgcct cgcagcgaac 780
atcggctgca tcgtcaatgg cgcggcctc gccatggctt cgctcgacgc catcacctg 840
catggcggcc gtccggccaa ctccctcgac gtgggcggcg gcgcctccc cgagaaggtc 900
accaatgcct gcgcgatcgt actggaagat cccaacgtcc gctgcacct ggtcaacatc 960
tttgccggca tcaaccgctg tgactggatc gccaaaggcc tgatccaggc ctgcgacagc 1020
ctgcagatca aggtgcccgt gatcgtgcgc ctggccggga cgaacgtcga cgagggcgc 1080
aagatcctgg ccgaatccg cctctccttc atcaccgcg aaaatctgga cgcgcggcc 1140
gccaaggccg tcgccatcgt caagggataa 1170

<210> 98
 <211> 2072
 <212> ADN
 <213> Gammaproteobacteria no cultivada
 <400> 98

5

ES 2 599 482 T3

atgaacattc acgaatatca ggccaaggag ctgcttcggt cttacggtgt ccccgttcca 60
 gccgggaacg tcgcctattc cgatcgccaa gcgcaggcag tggccgaaca gatcggcggg 120
 gacggatggg tagtaaaagc gcaaatccat accggcgggc gaggcaaggc cggcggcggt 180
 aaactcgccc aatccttggg ggaagtccgc aagatagccg acgaaatgat cggcaaaact 240
 ttggtgactc ctcaaaccgg gcccaaaggc aaagtgggtc ggcgcggtatt ggtggaagaa 300
 gccggttagtc cgcaacggga attgtacctt gggttggtca tcgaccggcg cagccaacgc 360
 atcaccatcg tggcttccgc ggaaggaggg gtagagatcg aggaagtggc ggccaggagt 420
 ccggagaaaa tcgtgcggga ggcgatcgac ccggccatcg gtctgcgcga ttttcaatgc 480
 cgtaaaggtcg ccgccgccat tggcctgcgc gacaaacatc taatggcgca ggcggtgcgc 540
 ctcatgcagc gcatttatcg cctgtttcgt gacaaggatg ccctccagggt ggagatcaat 600
 cctctaggca tcgtcggcag cgagccaaag ctggtttggt tggacgcaa attcaatttc 660
 gaccccaacg cccttttccg acatccggaa atcaacgagc tgcgcgattt ggaagaggaa 720
 gacccgcggg aggtggaagc cttaggtcac gggctcaact acatcgcttt agacggcgat 780
 atcggctgca tcgtcaacgg cgccggcctg gccatggcga ccatggacgc catcgtgttt 840
 catggtggtt ggccggcgaa tttcctggat atcgggggtg ggcctcgcc ggagaaagtg 900
 caaaacgctt gtcggatcgt gattcaggac cagaacgtca agactttggt ggtcaatatc 960
 tttgccggca tcaaccgctg cgattggatc gctaccggtc tagtccaggc ttacaccagc 1020
 ttgcccacatg acaagccctg cgtcgtgcgc cttgcaggaa cgaatgtaga ggaggggcta 1080
 aggatthtga ccgactcggg tcttgctttc gtaaaagcga gcaatctgga cgatcggcga 1140
 gctaaagccg tcgccatcgc tcatgggagc aacgtatgag tatttttgtc aaccgccatt 1200
 ccggggtgat catccaggga ttcaccggcc aacacgctac gtttcacgcc agcagggcga 1260
 ttcggtagcg cactcaagtg gtcggcggcg tcaccccggg caagggagga agtaagcacc 1320
 ttggattgcc ggtgttcgat acagtttctg aagcggtttc agagacgggc gccgatgtct 1380
 ctgggatttt tgtgccccca gcgtttgctg ccgacgccat catggaagcg atcgaagccg 1440
 ggatccgggt aatcgtggtg attgccgatg gcattccggt gcaagacatg attcagatgc 1500
 agcgcctaccg gctcggacgc gactgtctgg tgcttgggccc aaacacgcct ggaatcatca 1560
 ctctgggaga gtgcaaggtg gggatcatgc ctgctggaat ttaccgtcca ggaagaattg 1620
 gggtagtgtc gcggtcggga acgctgaatt acgaggccgt cgaacaattg ggcaaaactgg 1680
 gtttgggtca atccaccgcg gttggcatcg gtggggatcc ggtcaacggc accgactttg 1740

ES 2 599 482 T3

tgactgtgct caaagccttc gaacaagatc cggacaccga tgcgatcgtc atgatcggcg 1800
aaatcggcgg gccgcaagaa gtccgctgtg ccgctgggc caaagaaaat atgcaaaagc 1860
cgctcatcgg ttttgtggcg ggggcctcgg ctccaccggg gcggcgcgatg gggcatgctg 1920
gggcgatcat cgaaggtgag gaagacaccg ccaaagccaa gatggacgcg atggaggagc 1980
ttggggtata cgtggtcaga aatcccggcc ggatcggcga aacggtttta agggcgcctca 2040
aggagcgcct gggatctgca gtttctggct aa 2072

5 <210> 99
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador

 <400> 99
 gttgaacgag gagatcgtcc atgaacattc acgaatatca 40

 15 <210> 100
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Cebador

 <400> 100
 gctctagatt agccagaaac tgcgatcc 29

 25 <210> 101
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> Cebador

 <400> 101
 tgatattcgt gaatgtcat ggacgatctc ctcggtcaac 40

 35 <210> 102
 <211> 897
 <212> ADN
 <213> Gammaproteobacteria no cultivada

 40 <400> 102

ES 2 599 482 T3

atgagtatttt **ttgtcaaccg** **ccattcgcgg** **gtgatcatcc** **agggattcac** **cggccaacac** 60
gctacgtttc **acgccagcga** **ggcgattcgg** **tacggcactc** **aagtggtcgg** **cggcgtcacc** 120
ccgggcaagg **gaggaagtaa** **gcaccttggga** **ttgccgggtgt** **tcgatacagt** **ttctgaagcg** 180
gtttcagaga **cgggcgccga** **tgtctctggg** **atTTTTgtgc** **ccccagcgtt** **tgctgccgac** 240
gccatcatgg **aagcgatcga** **agccgggatc** **cgggtaatcg** **tggtgattgc** **cgatggcatc** 300
ccggtgcaag **acatgattcg** **agtgcagcgc** **taccggctcg** **gacgcgactg** **tctggtgctt** 360
gggccaaaca **cgcctggaat** **catcactcct** **ggagagtgca** **aggTggggat** **catgcctgct** 420
ggaatttacc **gtccaggaag** **aattggggta** **gtgtcgcggT** **ccggaacgct** **gaattacgag** 480
gccgtcgaac **aattgggcaa** **actgggtttg** **ggtcaatcca** **ccgcggttgg** **catcggtggg** 540
gatccggtca **acggcaccga** **ctttgtgact** **gtgctcaaag** **ccttcgaaca** **agatccggac** 600
accgatgcga **tcgtcatgat** **cggcgaaatc** **ggcgggccgc** **aagaagtgcg** **cgctgcccgc** 660
tgggccaaag **aaaatatgca** **aaagccgctc** **atcggttttg** **tggcgggggc** **ctcggtcca** 720
ccggggcggc **gcatggggca** **tgctggggcg** **atcatcgaag** **gtgaggaaga** **caccgccaaa** 780
gccaagatgg **acgcgatgga** **ggagcttggg** **gtatacgtgg** **tcagaaatcc** **cgccccgatc** 840
ggcgaaacgg **ttttaagggc** **gctcaaggag** **cgctgggat** **ctgcagtttc** **tggtctaa** 897

<210> 103
 <211> 1179
 <212> ADN
 <213> Gammaproteobacteria no cultivada
 <400> 103

5

ES 2 599 482 T3

atgaacattc acgaatatca ggccaaggag ctgcttcggt cttacggtgt ccccgttcca 60
gccgggaacg tcgcctattc cgatcgccaa gcgcaggcag tggccgaaca gatcggcggg 120
gacggatggg tagtaaaagc gcaaattcat accggcgggc gaggcaaggc cggcggcggtt 180
aaactcggcc aatccttggg ggaagtccgc aagatagccg acgaaatgat cggcaaaaact 240
ttggtgactc ctcaaaccgg gcccaaaggc aaagtgggtcc ggcgcgtatt ggtggaagaa 300
gcggttagtc cgcaacggga attgtacctt gggttgggtca tcgaccggcg cagccaacgc 360
atcaccatcg tggcttccgc ggaaggaggg gtagagatcg aggaagtggc ggccaggagt 420
ccggagaaaa tcgtgcggga ggcgatcgac ccggccatcg gtctgcgcga ttttcaatgc 480
cgtaagggtcg ccgccgccat tggcctgcgc gacaaacatc taatggcgca ggcggtgcgc 540
ctcatgcagc gcatctatcg cctgtttcgt gacaaggatg ccctccaggt ggagatcaat 600
cctctaggca tcgtcggcag cgagccaaag ctggtttggt tggacgcca attcaatttc 660
gacccaacg cccttttccg acatccgga atcaacgagc tgcgcgattt ggaagaggaa 720
gaccgcggg aggtggaagc cttaggtcac gggctcaact acatcgctt agacggcgat 780
atcggctgca tcgtcaacgg ccgccgctg gccatggcga ccatggacgc catcgtgttt 840
catggtggtt ggccggcgaa tttcctggat atcgggggtg gggcctcgcc ggagaaagtg 900
caaaacgctt gtcggatcgt gattcaggac cagaacgtca agactttggt ggtcaatc 960
ttgcccggca tcaaccgctg cgattggatc gctaccggtc tagtccaggc ttacaccagc 1020
ttgcgcatcg acaagccctg cgtcgtgcgc cttgcaggaa cgaatgtaga ggaggggcta 1080
aggatthtga ccgactcggg tcttgctttc gtaaaagcga gcaatctgga cgatgcggca 1140
gctaaagccg tcgccatcgc tcatgggagg aacgtatga 1179

5 <210> 104
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 104
gttatggt ggtcgtcag ctccctgca tgg 33

15 <210> 105
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 105
gagctgcag accaccacat aactatggag 30

ES 2 599 482 T3

5 <210> 106
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

10 <400> 106
 ggaattccag tgaacgacg gcgagcag 28

15 <210> 107
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> *Granulibacter bethesdensis*

<400> 107

Met Ser Ile Leu Ile Asn Lys Gln Thr Lys Ile Ile Ile Gln Gly Phe
 1 5 10 15

Thr Gly Asp Lys Gly Thr Phe His Gly Arg Glu Met Ile Asp Tyr Gly
 20 25 30

Thr Asn Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Gln Thr His
 35 40 45

Leu Gly Arg Pro Val Phe Asn Thr Val Glu Asp Ala Val Arg Glu Thr
 50 55 60

20 Gly Ala Gln Ala Ser Ile Thr Phe Val Ala Pro Ala Phe Cys Ala Asp
 65 70 75 80

ES 2 599 482 T3

Ala Ile Met Glu Gly Ala Asp Ala Gly Leu Glu Leu Ile Cys Thr Ile
85 90 95

Thr Asp Gly Ile Pro Ala Gln Asp Met Met Arg Val Lys Arg Tyr Leu
100 105 110

Arg Arg Tyr Gln Lys Asp Arg Arg Thr Arg Leu Val Gly Pro Asn Cys
115 120 125

Ala Gly Ile Ile Ser Pro Gly Gln Ala Met Leu Gly Ile Met Pro Gly
130 135 140

His Ile Tyr Lys Glu Gly His Val Gly Ile Val Ser Arg Ser Gly Thr
145 150 155 160

Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Ala Gln Leu Lys Glu Leu Gly Ile Gly Val
165 170 175

Ser Thr Ser Val Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Asn Gly Ser Ser Phe
180 185 190

Leu Asp His Leu Gln Leu Phe Glu Ala Asp Pro Glu Thr His Ala Val
195 200 205

Leu Met Ile Gly Glu Ile Gly Gly Pro Gln Glu Ala Glu Ala Ala Lys
210 215 220

Trp Ile Ser Glu Asn Met Ser Lys Pro Val Val Gly Tyr Val Ala Gly
225 230 235 240

Leu Thr Ala Pro Lys Gly Arg Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Ile
245 250 255

Ser Gly Glu Gly Asp Ser Ala Ala Glu Lys Ser Glu Ile Met Arg Ser
260 265 270

Tyr Gly Leu Thr Val Ala Pro Ser Pro Gly Glu Leu Gly Ser Thr Val
275 280 285

Ala Ala Val Leu Ala Gly Arg Gln Ala Ala
290 295

<210> 108
<211> 389
<212> PRT
<213> *Granulibacter bethesdensis*

5

<400> 108

ES 2 599 482 T3

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

Val Ala Val Pro Arg Gly Ala Ile Ala Phe Ser Ala Asp Gln Ala Val
 20 25 30

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

Ile His Ala Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Ile Lys Leu Cys Lys
 50 55 60

Thr Tyr His Glu Val Arg Glu Ala Ala Ala Gly Met Leu Gly Lys Arg
 65 70 75 80

Leu Val Thr His Gln Thr Gly Pro Glu Gly Lys Pro Val Gln Arg Val
 85 90 95

Tyr Val Glu Val Ala Asp Pro Phe Glu Lys Glu Phe Tyr Leu Gly Phe
 100 105 110

Val Leu Asp Arg Lys Leu Glu Arg Val Arg Val Ile Ala Ser Ala Glu
 115 120 125

Gly Gly Met Glu Ile Glu Glu Ile Ala Ser Lys His Pro Glu Lys Leu
 130 135 140

Ile Gln Val Ile Val Glu Pro Ala Val Gly Leu Gln Gln Phe Gln Ala
 145 150 155 160

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

Ala Val Thr Ser Ile Met Gly Ala Tyr Arg Ala Phe Arg Asp His Asp
 180 185 190

Ala Thr Met Leu Glu Ile Asn Pro Leu Val Leu Thr Lys Asp Asp Arg
 195 200 205

Ile Leu Ala Leu Asp Ala Lys Met Ser Phe Asp Asp Asn Ala Leu Phe
 210 215 220

Arg Arg Asn Asn Val Ala Asn Met His Asp Pro Ser Gln Asp Asp Pro
 225 230 235 240

Arg Glu Ala Gln Ala Ala Glu His Asn Leu Asn Tyr Val Gly Leu Glu
 245 250 255

Gly Asp Ile Gly Cys Val Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Ala Thr

ES 2 599 482 T3

Gln Ala Gly Ala Lys Leu Asp Thr Ile Leu Ile Pro Lys Val Gly Val
 100 105 110

Pro Ala Asp Val Tyr Ala Ile Glu Ser Phe Val Ser Gln Ile Glu Val
 115 120 125

Ala Lys Gly Leu Pro His Gln Ile Gly Met Glu Ala Leu Ile Glu Thr
 130 135 140

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

Leu Glu Ser Met His Phe Gly Val Ala Asp Tyr Ser Ala Phe Asn Lys
 165 170 175

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

Gln Trp His Phe Pro Leu Ser Arg Met Thr Val Ala Cys Arg Ala Phe
 195 200 205

Gly Leu Arg Pro Ile Asp Gly Pro Phe Gly Gly Ile Asp Asp Pro Glu
 210 215 220

Gly Tyr Lys Ala Ala Ala Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly Met Glu Gly
 225 230 235 240

Lys Trp Ala Ile His Pro Ser Gln Ile Glu Leu Ala Asn Glu Ile Tyr
 245 250 255

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

Leu Lys Glu Ala Glu Ala Gln Gly Lys Gly Ala Ala Ser Leu Asp Gly
 275 280 285

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

Thr Ala Ala Ala Ile Lys Ala Gly Glu Glu Ala Arg Ala Lys Ser Lys
 305 310 315 320

<210> 110
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> *Hyphomicrobium denitrificans*

5

<400> 110

ES 2 599 482 T3

Met Ala Ile Phe Ile Asn Glu Lys Thr Pro Ile Leu Ile Gln Gly Phe

ES 2 599 482 T3

1				5						10					15
Thr	Gly	Arg	Ile	Gly	Thr	Phe	His	Ala	Gln	Glu	Met	Ile	Asp	Tyr	Gly
			20					25					30		
Ser	Asn	Val	Val	Gly	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Thr	Ser	His
		35					40					45			
Leu	Gly	Arg	Pro	Val	Phe	Asn	Thr	Val	Lys	Gly	Ala	Val	Asp	Glu	Thr
	50					55					60				
Gly	Ala	Glu	Ala	Ser	Ile	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Pro	Phe	Ala	Ala	Asp
65					70					75					80
Ala	Ile	Met	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Gly	Ile	Lys	Tyr	Cys	Val	Cys	Ile
				85					90					95	
Thr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	Gln	Asp	Met	Ile	Arg	Val	Lys	Arg	Tyr	Met
			100					105						110	
Arg	Arg	Tyr	Lys	Lys	Glu	Ala	Arg	Met	Ile	Leu	Thr	Gly	Pro	Asn	Cys
		115					120					125			
Ala	Gly	Thr	Ile	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Met	Leu	Gly	Ile	Met	Pro	Gly
	130					135					140				
His	Ile	Tyr	Leu	Pro	Gly	Arg	Val	Gly	Ile	Val	Gly	Arg	Ser	Gly	Thr
145					150					155					160
Leu	Gly	Tyr	Glu	Ala	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Val
				165					170					175	
Ser	Thr	Ser	Val	Gly	Ile	Gly	Gly	Asp	Pro	Ile	Asn	Gly	Ser	Ser	His
			180					185					190		
Arg	Asp	Val	Leu	Glu	His	Phe	Glu	Asn	Asp	Pro	Glu	Thr	Asp	Ala	Ile
		195					200					205			
Leu	Met	Ile	Gly	Glu	Ile	Gly	Gly	Pro	Gln	Glu	Ala	Glu	Ala	Gly	Leu
	210					215					220				
Phe	Ala	Lys	Glu	His	Met	Lys	Lys	Pro	Val	Ile	Ala	Tyr	Ile	Ala	Gly
225					230					235					240
Leu	Ser	Ala	Pro	Lys	Gly	Arg	Arg	Met	Gly	His	Ala	Gly	Ala	Ile	Val
				245					250					255	
Ser	Ala	Phe	Gly	Glu	Ser	Ala	Ala	Glu	Lys	Val	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly
			260					265					270		

Cys Gly Val Ala Ile Ala Pro Thr Pro Ser Glu Met Gly Ser Thr Val
 275 280 285

Ala Gln Val Leu Gly Lys Gln Lys Lys Val Ala
 290 295

5 <210> 111
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> *Hyphomicrobium denitrificans*
 <400> 111

Met Asp Ile His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Ala Lys Phe Gly
 1 5 10 15

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

Tyr Arg Ala Ser Glu Leu Gly Gly Thr Val Val Val Lys Ala Gln Ile
 35 40 45

His Ser Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Cys Lys Thr
 50 55 60

Glu Lys Glu Ile Glu Asp Ala Ala Glu Phe Met Leu Gly Arg Lys Leu
 65 70 75 80

Val Thr His Gln Thr Gly Ser Ala Gly Lys Leu Val Ser Arg Leu Tyr
 85 90 95

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

Met Asp Arg Ala Ser Glu Arg Ile Val Val Val Ala Ser Ala Ala Gly
 115 120 125

Gly Met Asp Ile Glu Glu Ile Ser Ala Ser Gln Pro Asp Thr Ile Ile
 130 135 140

Arg Val Ala Val Asp Pro Ala Val Gly Met Gln Gln Phe Gln Ala Arg
 145 150 155 160

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

Val Pro Ala Ile Met Gly Cys Tyr Arg Ala Phe Arg Asp Leu Asp Ala
 180 185 190

Met Met Val Glu Ile Asn Pro Leu Val Ile Thr Lys Glu Lys Gln Val
195 200 205

Val Ala Leu Asp Ala Lys Met Ser Phe Asp Asp Asn Ala Leu Phe Arg
210 215 220

Arg Pro His Ile Ala Glu Leu Arg Asp Lys Ser Gln Glu Asp Pro Arg
225 230 235 240

Glu Thr Tyr Ala Ser Asp Arg Gly Leu Ser Tyr Val Gly Leu Asp Gly
245 250 255

Asp Ile Gly Cys Ile Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Ala Thr Leu
260 265 270

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

Gly Gly Gly Ala Ser Pro Glu Arg Val Thr Lys Ser Phe Lys Ala Val
290 295 300

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

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

Glu Leu Asp Ile Lys Leu Pro Ile Val Val Arg Leu Ala Gly Thr Asn
340 345 350

Val Glu Glu Gly Arg Lys Ile Ile Asp Asn Ser Gly Leu Thr Val Ile
355 360 365

Ser Ala Glu Thr Leu Ala Asp Ala Ala Lys Gln Ala Val Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Lys Ala
385

<210> 112
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> *Nitrosomonas europaea*

5

<400> 112

ES 2 599 482 T3

Met Ser His Thr Leu Tyr Glu Thr Lys Thr Pro Arg Val Gln Arg Cys
1 5 10 15

Glu Leu Ala Val Pro Gly Ser Arg Pro Glu Met Phe Glu Lys Ala Leu
 20 25 30

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

ES 2 599 482 T3

Asp Gly Arg Leu Ile Asp Ala Ala Ser Glu Arg Met Ala Asn Asn Ile
290 295 300

Val Lys Met Ala Glu Ala Ile Ala Ala Lys Ser Lys
305 310 315

- 5
<210> 113
<211> 295
<212> PRT
<213> *Nitrosomonas europaea*

<400> 113

ES 2 599 482 T3

Met Ala Ile Leu Ile Asn Glu Gln Thr Arg Ile Ile Val Gln Gly Phe
1 5 10 15

Thr Gly Arg Ile Gly Thr Phe His Ala Gln Glu Met Ile Asp Tyr Gly
20 25 30

Ser Asn Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Gln Lys His
35 40 45

Leu Gly Leu Pro Val Phe Asn Thr Val Arg Glu Ala Val Glu Gln Ala
50 55 60

Gly Ala Glu Ala Ser Ile Val Phe Val Pro Pro Ala Phe Ala Ala Asp
65 70 75 80

Ser Ile Met Glu Ala Ala Asp Ala Gly Ile Lys Tyr Cys Val Ser Ile
85 90 95

Thr Asp Gly Ile Pro Thr Gln Asp Met Met Thr Val Lys Asn Phe Leu
100 105 110

Arg Leu Phe Pro Glu Glu Asp Arg Met Met Leu Thr Gly Pro Asn Cys
115 120 125

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

His Ile Tyr Ser Arg Gly Val Val Gly Val Val Gly Arg Ser Gly Thr
145 150 155 160

Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Asp Gln Met Arg Arg Leu Asn Ile Gly Ile
165 170 175

Ser Thr Ser Val Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Ile Gly Ser Ser His
180 185 190

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

ES 2 599 482 T3

195	200	205																		
Leu	Met	Ile	Gly	Glu	Ile	Gly	Gly	Pro	Met	Glu	Val	Glu	Ala	Gly	Leu					
210						215					220									
Phe	Ala	Lys	Glu	Asn	Met	Ser	Lys	Pro	Leu	Val	Ala	Tyr	Ile	Ala	Gly					
225					230					235					240					
Leu	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Arg	Arg	Met	Gly	His	Ala	Gly	Ala	Ile	Ile					
				245					250					255						
Ser	Ser	Ala	Gly	Glu	Ser	Ala	Ala	Glu	Lys	Val	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu					
			260					265					270							
Leu	Gly	Val	Thr	Ile	Cys	Pro	Thr	Pro	Ser	Leu	Met	Gly	Glu	Thr	Val					
		275					280					285								
Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Gly	Leu														
290						295														

<210> 114
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> *Nitrosomonas europaea*
 <400> 114

5

Gly Gly Met Asp Ile Glu Thr Leu Ala Ala Thr Asn Pro Asp Ala Ile
 130 135 140

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

Arg Thr Met Ala Phe Ala Leu Gly Leu Glu Asp Val Leu Leu Asn His
 165 170 175

Ala Val Lys Thr Ile Arg Gly Cys Tyr Arg Ala Met Arg Asp Leu Asp
 180 185 190

Ala Asn Ile Leu Glu Ile Asn Pro Leu Val Val Thr Arg Asn Asn Glu
 195 200 205

Leu Ile Ala Leu Asp Ala Lys Met Ser Phe Asp Glu Asn Ala Leu Phe
 210 215 220

Arg Arg His Arg Ile Ser Glu Leu Arg Asp Asn Ser Gln Ile Asp Ser
 225 230 235 240

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

Gly Asp Ile Gly Cys Met Ile Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Ala Thr
 260 265 270

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

Val Gly Gly Gly Ala Ser Ala Glu Arg Thr Glu Lys Ala Phe Arg Leu
 290 295 300

Val Leu Ala Asp Asn Asn Val Lys Ala Met Leu Val Asn Ile Phe Ala
 305 310 315 320

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

Arg Asn Ile Gly Met Thr Val Pro Leu Val Val Arg Leu Ser Gly Thr
 340 345 350

Asn Val Glu Glu Gly Arg Arg Ile Ile Ala Asp Ser Gly Leu Pro Ile
 355 360 365

Ile Thr Ala Glu Thr Leu Ala Asp Ala Ala Glu Lys Val Val His Ala
 370 375 380

ES 2 599 482 T3

Arg Asn Gln Ala Ala Val
385 390

5 <210> 115
<211> 320
<212> PRT
<213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 115

ES 2 599 482 T3

Met Ala Val Lys Asn Arg Leu His Arg Ser Glu Leu Ala Val Pro Gly
1 5 10 15

Ser Asn Pro Arg Met Leu Glu Lys Ala Pro Glu Ala Gly Ala Asp Ile
20 25 30

Val Phe Leu Asp Leu Glu Asp Ala Val Ala Pro Asp Asp Lys Glu Gln
35 40 45

Ala Arg Arg Asn Ile Val Phe Ala Leu Asn Thr Tyr Asp Trp Ser Arg
50 55 60

Cys Ala Val Ser Val Arg Ile Asn Gly Leu Asp Thr His Tyr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Leu Ser Gln Ile Glu Ala Tyr Lys Gly Phe Lys Pro Ile Asn
115 120 125

Ile His Val Leu Ile Glu Thr Ala Met Gly Met Ala Asn Val Glu Glu
130 135 140

Ile Ala Arg Thr Cys Pro Glu Arg Met Glu Ala Met Val Phe Gly Val
145 150 155 160

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

Ala Asn Pro Asp Tyr Gly Met Leu Thr Asp Pro Asp Glu Ser Gly Thr
180 185 190

Arg Ala Tyr His Trp Ala Asp Gln Trp His Phe Gly Ile Ser Arg Met
195 200 205

Val Ala Ala Cys Arg Ala Tyr Gly Leu Arg Pro Ile Asp Gly Pro Phe
210 215 220

ES 2 599 482 T3

Gly Asp Phe Ser Asp Pro Glu Gly Phe Arg Ala Ala Ala Arg Arg Ala
 225 230 235 240

Ala Ala Leu Gly Cys Glu Gly Lys Trp Ala Ile His Pro Ser Gln Ile
 245 250 255

Pro Leu Cys Asn Glu Ile Phe Thr Pro Thr Glu Lys Glu Val Thr Arg
 260 265 270

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

Gly Ala Val Ser Leu Asp Gly Arg Leu Ile Asp Ala Ala Ser Ile Arg
 290 295 300

Met Ala Glu Asn Val Val Arg Gln Met Lys Gln Ile Glu Ser Arg Arg
 305 310 315 320

<210> 116
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> *Methylococcus capsulatus*

5

<400> 116

Met Ser Val Phe Val Asn Lys His Ser Lys Val Ile Phe Gln Gly Phe
 1 5 10 15

Thr Gly Glu His Ala Thr Phe His Ala Lys Asp Ala Met Arg Met Gly
 20 25 30

Thr Arg Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Thr Arg His
 35 40 45

Pro Asp Pro Glu Leu Ala His Leu Pro Val Phe Asp Thr Val Ala Glu
 50 55 60

Ala Val Ala Ala Thr Gly Ala Asp Val Ser Ala Val Phe Val Pro Pro
 65 70 75 80

Pro Phe Asn Ala Asp Ala Leu Met Glu Ala Ile Asp Ala Gly Ile Arg
 85 90 95

Val Ala Val Thr Ile Ala Asp Gly Ile Pro Val His Asp Met Ile Arg
 100 105 110

Leu Gln Arg Tyr Arg Val Gly Lys Asp Ser Ile Val Ile Gly Pro Asn
 115 120 125

10

ES 2 599 482 T3

Thr Pro Gly Ile Ile Thr Pro Gly Glu Cys Lys Val Gly Ile Met Pro
 130 135 140

Ser His Ile Tyr Lys Lys Gly Asn Val Gly Ile Val Ser Arg Ser Gly
 145 150 155 160

Thr Leu Asn Tyr Glu Ala Thr Glu Gln Met Ala Ala Leu Gly Leu Gly
 165 170 175

Ile Thr Thr Ser Val Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Asn Gly Thr Asp
 180 185 190

Phe Val Thr Val Leu Arg Ala Phe Glu Ala Asp Pro Glu Thr Glu Ile
 195 200 205

Val Val Met Ile Gly Glu Ile Gly Gly Pro Gln Glu Val Ala Ala Ala
 210 215 220

Arg Trp Ala Lys Glu Asn Met Thr Lys Pro Val Ile Gly Phe Val Ala
 225 230 235 240

Gly Leu Ala Ala Pro Thr Gly Arg Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile
 245 250 255

Ile Ser Ser Glu Ala Asp Thr Ala Gly Ala Lys Met Asp Ala Met Glu
 260 265 270

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

Val Leu Arg Ala Ala Gln Glu His Gly Ile Arg Phe
 290 295 300

<210> 117
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 117

5

ES 2 599 482 T3

Met Asn Ile His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Lys Thr Tyr Gly
1 5 10 15

Val Pro Val Pro Asp Gly Ala Val Ala Tyr Ser Asp Ala Gln Ala Ala
 20 25 30

Ser Val Ala Glu Glu Ile Gly Gly Ser Arg Trp Val Val Lys Ala Gln
 35 40 45

Ile His Ala Gly Gly Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Ala His
 50 55 60

ES 2 599 482 T3

Ser Ile Glu Glu Val Arg Gln Tyr Ala Asp Ala Met Leu Gly Ser His
65 70 75 80

Leu Val Thr His Gln Thr Gly Pro Gly Gly Ser Leu Val Gln Arg Leu
85 90 95

Trp Val Glu Gln Ala Ser His Ile Lys Lys Glu Tyr Tyr Leu Gly Phe
100 105 110

Val Ile Asp Arg Gly Asn Gln Arg Ile Thr Leu Ile Ala Ser Ser Glu
115 120 125

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

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

Arg Lys Val Ala Thr Ala Ile Gly Leu Lys Gly Lys Leu Met Pro Gln
165 170 175

Ala Val Arg Leu Met Lys Ala Ile Tyr Arg Cys Met Arg Asp Lys Asp
180 185 190

Ala Leu Gln Ala Glu Ile Asn Pro Leu Ala Ile Val Gly Glu Ser Asp
195 200 205

Glu Ser Leu Met Val Leu Asp Ala Lys Phe Asn Phe Asp Asp Asn Ala
210 215 220

Leu Tyr Arg Gln Arg Thr Ile Thr Glu Met Arg Asp Leu Ala Glu Glu
225 230 235 240

Asp Pro Lys Glu Val Glu Ala Ser Gly His Gly Leu Asn Tyr Ile Ala
245 250 255

Leu Asp Gly Asn Ile Gly Cys Ile Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met
260 265 270

Ala Ser Leu Asp Ala Ile Thr Leu His Gly Gly Arg Pro Ala Asn Phe
275 280 285

Leu Asp Val Gly Gly Gly Ala Ser Pro Glu Lys Val Thr Asn Ala Cys
290 295 300

Arg Ile Val Leu Glu Asp Pro Asn Val Arg Cys Ile Leu Val Asn Ile
305 310 315 320

ES 2 599 482 T3

Phe Ala Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Ile Ala Lys Gly Leu Ile Gln
325 330 335

Ala Cys Asp Ser Leu Gln Ile Lys Val Pro Leu Ile Val Arg Leu Ala
340 345 350

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

Ser Phe Ile Thr Ala Glu Asn Leu Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ala Val
370 375 380

Ala Ile Val Lys Gly
385

<210> 118

<211> 298

<212> PRT

<213> Gammaproteobacteria no cultivada

<400> 118

5

ES 2 599 482 T3

Met Ser Ile Phe Val Asn Arg His Ser Arg Val Ile Ile Gln Gly Phe
 1 5 10 15

Thr Gly Gln His Ala Thr Phe His Ala Ser Glu Ala Ile Arg Tyr Gly
 20 25 30

Thr Gln Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Ser Lys His
 35 40 45

Leu Gly Leu Pro Val Phe Asp Thr Val Ser Glu Ala Val Ser Glu Thr
 50 55 60

Gly Ala Asp Val Ser Gly Ile Phe Val Pro Pro Ala Phe Ala Ala Asp
 65 70 75 80

Ala Ile Met Glu Ala Ile Glu Ala Gly Ile Arg Val Ile Val Val Ile
 85 90 95

Ala Asp Gly Ile Pro Val Gln Asp Met Ile Arg Val Gln Arg Tyr Arg
 100 105 110

Leu Gly Arg Asp Cys Leu Val Leu Gly Pro Asn Thr Pro Gly Ile Ile
 115 120 125

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

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

ES 2 599 482 T3

Met Asn Ile His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Arg Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Val Pro Val Pro Ala Gly Asn Val Ala Tyr Ser Asp Arg Gln Ala Gln
 20 25 30

Ala Val Ala Glu Gln Ile Gly Gly Asp Gly Trp Val Val Lys Ala Gln
 35 40 45

Ile His Thr Gly Gly Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Leu Ala Gln
 50 55 60

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

ES 2 599 482 T3

Leu Val Thr Pro Gln Thr Gly Pro Lys Gly Lys Val Val Arg Arg Val
 85 90 95

Leu Val Glu Glu Ala Val Ser Pro Gln Arg Glu Leu Tyr Leu Gly Leu
 100 105 110

Val Ile Asp Arg Arg Ser Gln Arg Ile Thr Ile Val Ala Ser Ala Glu
 115 120 125

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

Val Arg Glu Ala Ile Asp Pro Ala Ile Gly Leu Arg Asp Phe Gln Cys
 145 150 155 160

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

Gln Ala Val Arg Leu Met Gln Arg Ile Tyr Arg Leu Phe Arg Asp Lys
 180 185 190

Asp Ala Leu Gln Val Glu Ile Asn Pro Leu Gly Ile Val Gly Ser Glu
 195 200 205

Pro Lys Leu Val Cys Leu Asp Ala Lys Phe Asn Phe Asp Pro Asn Ala
 210 215 220

Leu Phe Arg His Pro Glu Ile Asn Glu Leu Arg Asp Leu Glu Glu Glu
 225 230 235 240

Asp Pro Arg Glu Val Glu Ala Leu Gly His Gly Leu Asn Tyr Ile Ala
 245 250 255

Leu Asp Gly Asp Ile Gly Cys Ile Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met
 260 265 270

Ala Thr Met Asp Ala Ile Val Phe His Gly Gly Trp Pro Ala Asn Phe
 275 280 285

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

Arg Ile Val Ile Gln Asp Gln Asn Val Lys Thr Leu Leu Val Asn Ile
 305 310 315 320

Phe Ala Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Ile Ala Thr Gly Leu Val Gln
 325 330 335

ES 2 599 482 T3

Ala Tyr Thr Ser Leu Arg Ile Asp Lys Pro Cys Val Val Arg Leu Ala
 340 345 350

Gly Thr Asn Val Glu Glu Gly Leu Arg Ile Leu Thr Asp Ser Gly Leu
 355 360 365

Ala Phe Val Lys Ala Ser Asn Leu Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ala Val
 370 375 380

Ala Ile Ala His Gly Arg Asn Val
 385 390

5 <210> 120
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 120
 ccgcggtacc gtataataa gaataattat taatctgtag acaaattgtg aaagg 55

15 <210> 121
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 121
 cttttgtta taagtggga aaccgtgaat atcgtgttct tttcac 46

25 <210> 122
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 122

aagaactcta gaacaaaaag gataaaacaa tggcaaaaat gagagccggtt gacgcggcaa 60

35 **tg 62**

40 <210> 123
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

45 <400> 123
 gaccagctgc agtcaggcca gttatggtt agccattaat tccagc 46

<210> 124

ES 2 599 482 T3

<211> 69
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 124
acacaactgc agacaaaaag gataaaacaa tgaagattgt cattgcgcca gactctttaa 60
 10 **aagagagct 69**
 <210> 125
 <211> 50
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 125
 gccccaagc ttccagttt taattccctg acctattta atggcgcagg 50
 <210> 126
 <211> 62
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 126
aagaactcta gaacaaaaag gataaaacaa tggcaaaaat gagagccggtt gacgcggcaa 60
tg 62
 35 <210> 127
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 127
 gccccaagc ttccagttt taattccctg acctattta atggcgcagg 50
 45 <210> 128
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 128
 55 gactctagag gatccccggg atgacagact cggttatcaa cagtgaatta cttttcag 58
 <210> 129
 <211> 50
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

ES 2 599 482 T3

<220>
 <223> Cebador

 <400> 129
 5 gacgggacgg cggctttgtt ggcttccgcg ttatgaaaaa agtagagagc 50

 <210> 130
 <211> 49
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 130
 15 ttgagacaca acgtggcctt cccagcaagg acagcgcgcg caatgaatg 49

 <210> 131
 <211> 53
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 131
 25 atgacatga ttacgaattc tcaggaagc aggcggtagc ctggcagagt cag 53

 <210> 132
 <211> 48
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 132
 35 ttttcataa cgcggaagcc aacaagccg ccgtcccgtc aagtacgc 48

 <210> 133
 <211> 60
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 133
 45 cgcgcgctgt ccttgctggg aaagccacgt tgtgtctcaa aatctctgat gttacattgc 60
 50
 <210> 134
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 134
 60 gccgccgaat tccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa acc 43

 <210> 135
 <211> 53
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 599 482 T3

<220>
 <223> Cebador

 <400> 135
 5 atgacatga ttacgaattc tcaggaagc aggcggtagc ctggcagagt cag 53

 <210> 136
 <211> 28
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 136
 15 agtctagaga tccttttaa cccatcac 28

 <210> 137
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 137
 25 agtctagaag tcgataaaca gcaatatt 28

 <210> 138
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 138
 35 gcaacgttg ctctcatct 19

 <210> 139
 <211> 27
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 139
 50 cgggatcaa acacgcggcg gaaaaca 27

 <210> 140
 <211> 24
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 140
 60 cgggatccgt taacgcaggc tgac 24

 <210> 141
 <211> 19
 65 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 141
 gctgctggcg tactggtc 19

10 <210> 142
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador

15 <400> 142
 ctttacctt tatgcttc 19

20 <210> 143
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador

25 <400> 143
 ttgagctcga gaggtctgcc tcgtga 26

30 <210> 144
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador

35 <400> 144
 tcgcatgat gctgctgtg 19

40 <210> 145
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador

50 <400> 145
 cgggatccga cttagcgtca tcggtg 27

55 <210> 146
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Cebador

60 <400> 146
 cgggatccga tgaagattgc taacgacg 28

65 <210> 147
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

 <400> 147
 5 tgatgccgac aatattacgc 20

 <210> 148
 <211> 27
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 148
 15 cgcctcgagt gactcatacc aggcctg 27

 <210> 149
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 149
 25 cgcctcgagg caacaccttc ttcacgag 28

 <210> 150
 <211> 30
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 150
 35 atcatccagc tgtcaggcag ccatcggaag 30

 <210> 151
 <211> 18
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 151
 45 atccccgga attctgtt 18

 <210> 152
 <211> 1352
 <212> ADN
 50 <213> *Corynebacterium casei*

 <400> 152
 55

ES 2 599 482 T3

cgcctcgagc actggaaggg ttcttcaggg gaacccccgg aaaccgggga aacatctgac 60
 ttggttaaata gtcgtattat gaacacgccg aggaatgaaa accgaccgtg cacgctcgtg 120
 tgagaaagtc agctacatga gaccaactac ccgccttgag ggacgctttg agcagctgtg 180
 gctgccgctg tggccattgg caagcgatga cctccgtgag ggcatttacc gcacctcacg 240
 gaagaacgcg ctggataagc gctacgtcga agccaatccc gacgogctct ctaacctcct 300
 ggtcgttgac atcgaccagg aggacgcgct tttgcgctct ttgtgggaca gggaggactg 360
 gagacctaac gcggtggttg aaaaccctt aaacgggcac gcacacgctg tctgggcgct 420
 cgcggagcca tttaccgca ccgaatacgc caaacgcaag cctttggcct atgccgcggc 480
 tgtcaccgaa ggocctacggc gctctgtcga tggcgatagc ggatactccg ggctgatcac 540
 caaaaacccc gagcacactg catgggatag tcaactggatc accgataagc tgtatacgct 600
 cgatgagctg cgcttttggc tcgaagaaac cgctttatg ccgctgcgt cctggaggaa 660
 aacgcggcgg ttctcgccag ttggtctagg tcgtaattgc gcaactcttg aaagcgcacg 720
 tacgtgggca tatcgggagg tcagaaagca ttttgagac gctgaaggcc taggccgcgc 780
 aatccaaacc accgcgcaag cacttaacca agagctgttt gatgaaccac tacctgtggc 840
 cgaagttagc tgtattgcca ggtcaatcca taaatggatc atcaccaagt cacgcatgtg 900
 gacagacggc gccgcccgtct acgacgccac attcaccgca atgcaatccg cacgcgggaa 960
 gaaaggctgg caacgaagcg ctgaggtgcg tcgtgaggct ggacatactc tttggaggaa 1020
 cattggctaa ggtttatgca cgttatccac gcaacggaaa aacagcccgc gagctggcag 1080
 aacgtgccgg tatgtcgggtg agaacagctc aacgatggac ttccgaaccg cgtgaagtgt 1140
 tcattaaacg tgccaacgag aagcgtgctc gcgtccagga gctgocgccc aaaggtctgt 1200
 ccatgcgcgc tatcgcggca gagattggtt gctcgggtggg cacggttcac cgctacgtca 1260
 aagaagttga agagaagaaa accgcgtaaa tccagcgggt tagtcaccct cggcgtgttc 1320

aaagtccatc gtaaccaagt cagctogagg cg 1352

5 <210> 153
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 153
 ggaattcaca aaaaggataa aacaatggct gtcaagaacc gtctac 46

15 <210> 154
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

ES 2 599 482 T3

<400> 154
 cgaattctca gaatctgatt ccgtgttcct g 31

5 <210> 155
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 155
 cgagctcaag cttacaaaaa ggataaaaca atgagcacca ttgcattcat egg 53

15 <210> 156
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 156
 cgggatccct agtccagcag catgagag 28

25 <210> 157
 <211> 2727
 <212> ADN
 <213> *Rhodococcus jostii*

30 <400> 157

atgagcacca ttgcattcat cggactcggg atcatgggca gccccatggc cgttcacatc 60

gcccaaggccg gccaccagggt ggtcggatac aaccgctcgc ccgagcgcac cgcggcgcctc 120

gtcgacgccg ggggcaccgc ggccgactcc atcgccaagg ccggtgcccg cgcgcgacgtc 180

gtggccgctga tggccccga ctccccggac gtccaggccg tactcgcggg cgaggacgga 240

ES 2 599 482 T3

gtcttcgagc acgccccggc cggcgccctg atcatcgact tctccagcat cgggccccgac 300
 gtcaccaccg ccctcgccgc gcaggcaacc gagcggggct tccggctgat cgacgccccg 360
 gtatcgggtg gcgaggccgg tggggtcaac gccgcactgt cgatcatggt cggcggcggc 420
 cgggaggatt tcgaggcggc caagccgata ctcgacaccg tcggcaagac cgtggtgcac 480
 gtgggcccga acggttccgg gcagacgggtg aaggccgcga accagctgat cgtcgcgggc 540
 aacatccaac tcctcgccga ggcgatcatt ttctcgagg cctacgggtg cgacaccggc 600
 gctgcgggtc aggtgctcgg cggcgggctg gccggatcgg ccgtcctgaa ccagaaggca 660
 cagaagatgc tggaccggtc ctctgaaccg ggattccgca tcgaactgca ccacaaggac 720
 ctggccatcg tgaccagcgc cgctcgcgag gccgggtgctg tgacaccctt cggcgcggtc 780
 gtcgcccagc tgatggcctc cggccgtgcg aacgggtgatg gtggcctgga ccattcgggc 840
 ctgctgcgtg gagtggagcg gctgtccggc cggccctccc agtgaccctt tccaactcgt 900
 aatcctcgat ggagaagtga tatgcctcgt atgcgcgccg ctgacgcagc ggtcaagatt 960
 ctggaactcg aaggtgccac tcaggccttc ggccttcccg gtgcggcgat caacccttc 1020
 tacgcagcaa tgcgtaacca cggaggaatc aagcacatcc tcgcccgcca cgtcgagggc 1080
 gcctcccaca tggccgaggg attcaccggc gcccaaggccg gaaacatcgg agtctgcatc 1140
 ggcacctcgg ggcccgcggg aaccgacatg atcaccggtc tgtattcggc catggcggac 1200
 tcgatcccga tcctcgcgat caccggccaa gctcccgtgg cgcgcctgca caaggaagac 1260
 ttccaggccg tcgacatcgc ctcgatcgca ggcccgtca cgaagatggc gatgacgggtg 1320
 ctcgagccgg cccaggttcc gggagcgttc gcgcaggcat ttcaactgat gcggctcgtt 1380
 cggccaggac cgggtgctcat cgacctgccg atcgacgtgc agttggcggg gatcgacttc 1440
 gaccgcgata cctaccagcc gctgcccgtg tacaagccgg ccgcgacccg cgcgcaggcg 1500
 gagaaggcac tcgacatgct gggtgccgcc gaacgcccgc tgatcgttgc gggcgggtggc 1560
 atcatcaacg ccgacgcggc ggacctgctg gtggaactgg ccgaactgct ggacattccg 1620
 gtcgtgccga cgctgatggg ctggggcacc atcccggacg accaccgtct cgccgcggg 1680
 atggtcggac tgcagaccgc ccaccgatac ggcaacgcca cgatgctggc gtcggacttc 1740
 gtcctcggca tcggcaaccg gtgggccaac cggcacacgg gcggtctcga cacctaccgg 1800
 aagggccgca agttcgttca cgtcgacatc gaaccacccc agatcggctg cgtgttcggc 1860
 cccgactacg ggatcgtgtc cgacgccaa gctgcgctcg aactgttcgt cgccgtcggc 1920
 aaggagcgca aggcccggg aaccctggcg gaccgcagca cctgggtcga ggactgtgcc 1980
 acccgaagc ggaccatgca gcgcaagacc cacttcgacg acgtcccggc caaacgcag 2040
 cgcgtgtacg aggagatgaa ccgcgtcttc gggcgcgaca cccggtacgt gagcacgata 2100
 gggctctcgc agatcgccgg cggccagttc ctgcacgtct acaaggcccg caactggatc 2160

ES 2 599 482 T3

aactgcgggc aggccggggc gctcggctgg acgatccccg ccgctctcgg agtgggtgcc 2220
gcgagaccgg agacgcccgt cgtggcgctg tccggtgact acgacttcca gttcatgatc 2280
gaggaactgg ccgtgggcgc ccagttcaac ctgccgtaca tccacgtcgt ggtgaacaac 2340
tcctacctgg gactgatccg tcaggcacag cgcgcgttcg acatggactt ctgcgtgcaa 2400
ctgggcttcg acaacatcaa caccaggag cggagcgagc acgagacgat gcccgcggtc 2460
ccgaaggggt acggcgtcga tcacgtcaag gtcgcccagc gcctgggctg caaggccctg 2520
cgggtcaccg agccgggcga gatcgccggc gccctggaga aggcccgca actcgccgga 2580
gaacacaagg tgccggtggt cgtcgaggtc ttctcggagc gggtcaccaa catcgcgatg 2640
ggcaccgaac tcgacaacgt cgccgagttc gaggatctgg cggagagctg ggagcacgct 2700
cccacagccc tcatgctgct ggactag 2727

5 <210> 158
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 158
ccccgaggg ccgaagctgc cgagcacaat c 31

15 <210> 159
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 159
gtgctcgca gcttcggcct cgccgggatc 30

25 <210> 160
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador

35 <400> 160
ccccgaggg ccgccgctgc cgagcacaat c 31

40 <210> 161
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

45 <400> 161
gtgctcgca gcggcgccct cgccgggatc 30

ES 2 599 482 T3

5 <210> 162
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

10 <400> 162
ccccgcgagg ccctggctgc cgagcacaat c 31

15 <210> 163
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 163
gtgctcggca gccaggcct cgcggggatc 30

25 <210> 164
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

30 <400> 164
ccccgcgagg ccattgctgc cgagcacaat c 31

35 <210> 165
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

40 <400> 165
gtgctcggca gcaatggcct cgcggggatc 30

45 <210> 166
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Cebador

55 <400> 166
ccccgcgagg ccatggctgc cgagcacaat c 31

60 <210> 167
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

65 <400> 167
gtgctcggca gccatggcct cgcggggatc 30

ES 2 599 482 T3

5
<210> 168
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 168
10 ccccgcgagg ccaatgctgc cgagcacaat c 31

<210> 169
<211> 30
<212> ADN
15 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 169
20 gtgctcggca gcattggcct cgcggggatc 30

<210> 170
<211> 31
25 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

30 <400> 170
cccgcgagg cctacgctgc cgagcacaat c 31

<210> 171
<211> 30
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

40 <400> 171
gtgctcggca gcgtaggcct cgcggggatc 30

<210> 172
<211> 31
45 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

50 <400> 172
cccgcgagg ccaaagctgc cgagcacaat c 31

<210> 173
<211> 30
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

60 <400> 173
65 gtgctcggca gctttggcct cgcggggatc 30

<210> 174
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 174
 10 cccgcgagg cccgcgctgc cgagcacaat c 31
 <210> 175
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 175
 gtgctcgga ggcgggcct cgcgggatc 30
 <210> 176
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 176
 gagcccgagg cgattattca ggtcgtggc 30
 <210> 177
 <211> 31
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 177
 cacgacctga ataatcgct cgggctcctt g 31
 45 <210> 178
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 178
 55 gagcccgagg cgaatattca ggtcgtggc g 31
 <210> 179
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 179
 65 cacgacctga atattcgct cgggctcctt 30

ES 2 599 482 T3

<210> 180
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 180
 10 gagcccgagg cggatattca ggtcgtggtc g 31
 <210> 181
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 181
 cacgacctga atatccgctt cgggctcctt 30
 <210> 182
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 182
 gagcccgagg cgaaaattca ggtcgtggtc g 31
 <210> 183
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador
 <400> 183
 cacgacctga atttcgcctt cgggctcctt 30
 45 <210> 184
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 184
 55 gagcccgagg cgcgattca ggtcgtggtc g 31
 <210> 185
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 185
 65 cacgacctga atgcgcgctt cgggctcctt 30

ES 2 599 482 T3

<210> 186
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 186
 10 gagcccgagg cgcacattca ggtcgtggtc g 31
 <210> 187
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 187
 cacgacctga atgtgcgctt cgggctcctt 30
 <210> 188
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 188
 gagcccgagg cgcagattca ggtcgtggtc g 31
 <210> 189
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 189
 cacgacctga atctgcgctt cgggctcctt 30
 <210> 190
 <211> 31
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 190
 55 gagcccgagg cgccgattca ggtcgtggtc g 31
 <210> 191
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 191
 65 cacgacctga atcggcgctt cgggctcctt 30

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo productor de acetil-CoA que comprende un ciclo de producción de acetil-CoA obtenido confiriendo al menos un tipo de actividad enzimática seleccionada del grupo que consiste en malato tioquinasa, malil-CoA liasa, carboxilato carboligasa, 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa e hidroxipiruvato reductasa, a un microorganismo que no muestra ninguna de las funciones de un ciclo de fijación de dióxido de carbono que tiene una reacción enzimática de las siguientes reacciones enzimáticas (a) a (d):
- (a) malonil-CoA a malonato semialdehído o 3-hidroxipropionato;
- (b) acetil-CoA y CO₂ a piruvato;
- (c) crotonil-CoA y CO₂ a etilmalonil-CoA o glutaconil-CoA; y
- (d) CO₂ a formiato;
- en el que el microorganismo no tiene ninguna de la actividad malato tioquinasa y/o malil-CoA liasa endógena.
2. El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un ciclo de producción de acetil-CoA en el que el fosfoenolpiruvato o el piruvato se convierte en oxaloacetato, y después en 2-hidroxi-3-oxopropionato debido a acciones de la malato tioquinasa, malil-CoA liasa, glioxilato carboligasa, y después en fosfoenolpiruvato de nuevo mediante 2-fosfoglicerato.
3. El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende un ciclo de producción de acetil-CoA que comprende:
- (f) al menos una seleccionada del grupo que consiste en:
- piruvato quinasa y piruvato carboxilasa;
fosfoenolpiruvato carboxilasa; y
fosfoenolpiruvato carboxiquinasa;
- (g) malato deshidrogenasa;
- (h) malato tioquinasa;
- (i) malil-CoA liasa;
- (j) glioxilato carboligasa;
- (k) al menos una seleccionada del grupo que consiste en:
- 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa; e
hidroxipiruvato isomerasa e hidroxipiruvato reductasa;
- (1) al menos una seleccionada del grupo que consiste en:
- glicerato 2-quinasa; y
fosfoglicerato mutasa y glicerato 3-quinasa; y
- (m) enolasa.
4. El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el microorganismo es un microorganismo que pertenece a *Enterobacteriaceae* o un microorganismo que pertenece a bacterias corineformes.
5. El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el microorganismo es bacterias *Escherichia* o bacterias *Pantoea* que pertenecen a *Enterobacteriaceae*, o el microorganismo es bacterias *Corynebacterium* que pertenecen a bacterias corineformes.
6. El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo es una bacteria *Escherichia* en que una actividad de lactato deshidrogenasa poseída por la bacteria *Escherichia* está inactivada o reducida.
7. El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el microorganismo es una bacteria *Escherichia* en que una actividad de al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en isocitrato liasa y malato sintasa poseída por la bacteria *Escherichia* está inactivada o reducida.
8. El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el microorganismo es una bacteria *Escherichia* en que una actividad tiolasa, una actividad CoAtransferasa y una actividad acetoacetato descarboxilasa está conferida o potenciada.

- 5 9. El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el microorganismo es una bacteria *Escherichia* en que una actividad tiolasa, una actividad CoAtransferasa, una actividad acetoacetato descarboxilasa y una actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa está conferida o potenciada.
- 10 10. El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo es una bacteria *Pantoea* en que:
- 10 (i) las actividades de fumarato hidratasa A y fumarato hidratasa C poseídas por la bacteria *Pantoea* están inactivadas o reducidas; o
- 10 (ii) una actividad de malato sintasa poseída por la bacteria *Pantoea* está inactivada o reducida.
- 15 11. El microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la malato tioquinasa usada es una malato tioquinasa obtenida modificando mtkB derivado de *Methylobacterium extorquens* para alterar un aminoácido correspondiente al 144° aminoácido en isoleucina, asparagina, ácido aspártico, lisina, arginina, histidina, glutamina o prolina, y/o para alterar el 244° aminoácido en ácido glutámico, alanina, leucina, isoleucina, metionina, asparagina, tirosina, lisina o arginina.
- 20 12. Un método de producción de acetil-CoA, que comprende producir acetil-CoA a partir de un material de fuente de carbono usando el microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 25 13. Un método de producción de acetona, que comprende producir acetona a partir de un material de fuente de carbono usando el microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con la reivindicación 8, reivindicación 9 o reivindicación 11.
- 30 14. Un método de producción de alcohol isopropílico, que comprende producir alcohol isopropílico a partir de un material de fuente de carbono usando el microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con la reivindicación 9 o reivindicación 11.
15. Un método de producción de glutamato, que comprende producir glutamato a partir de un material de fuente de carbono usando el microorganismo productor de acetil-CoA de acuerdo con la reivindicación 5, reivindicación 10 o reivindicación 11.

FIG.1

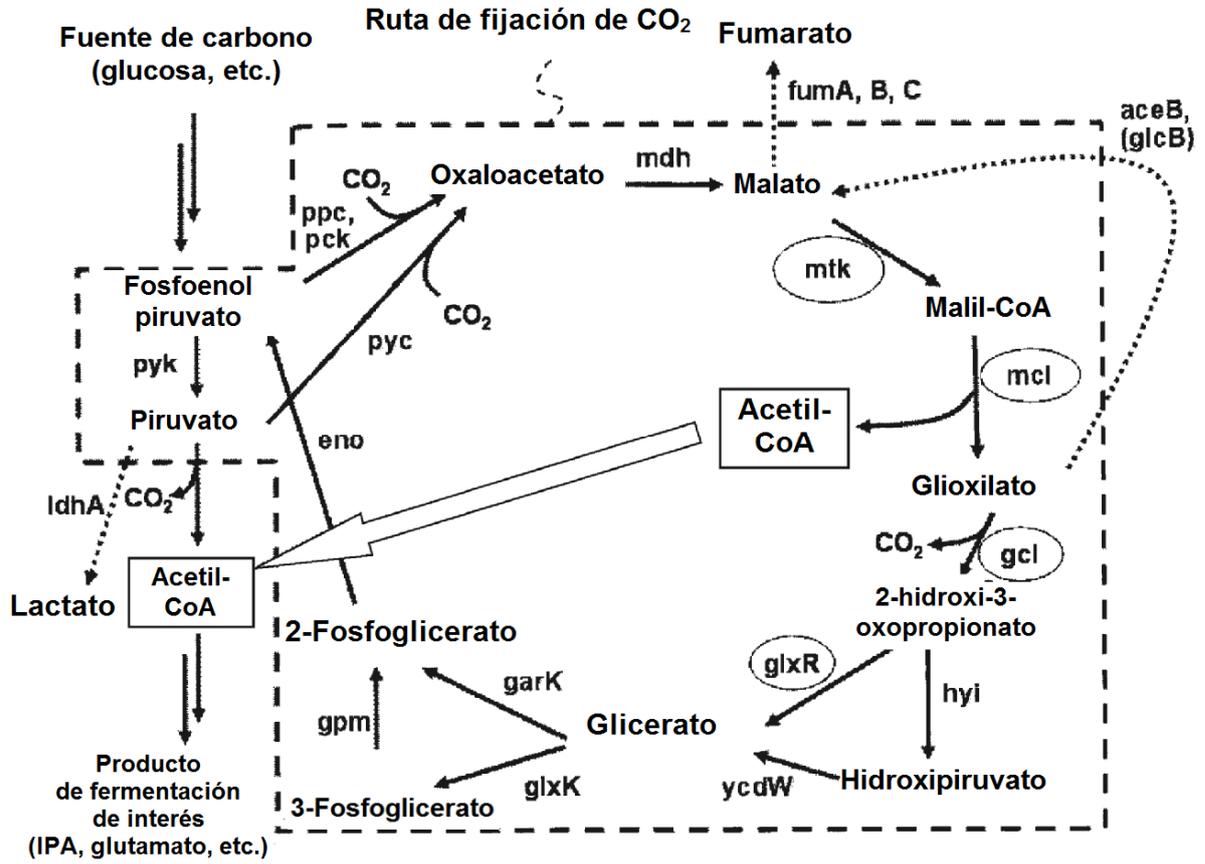


FIG.2A

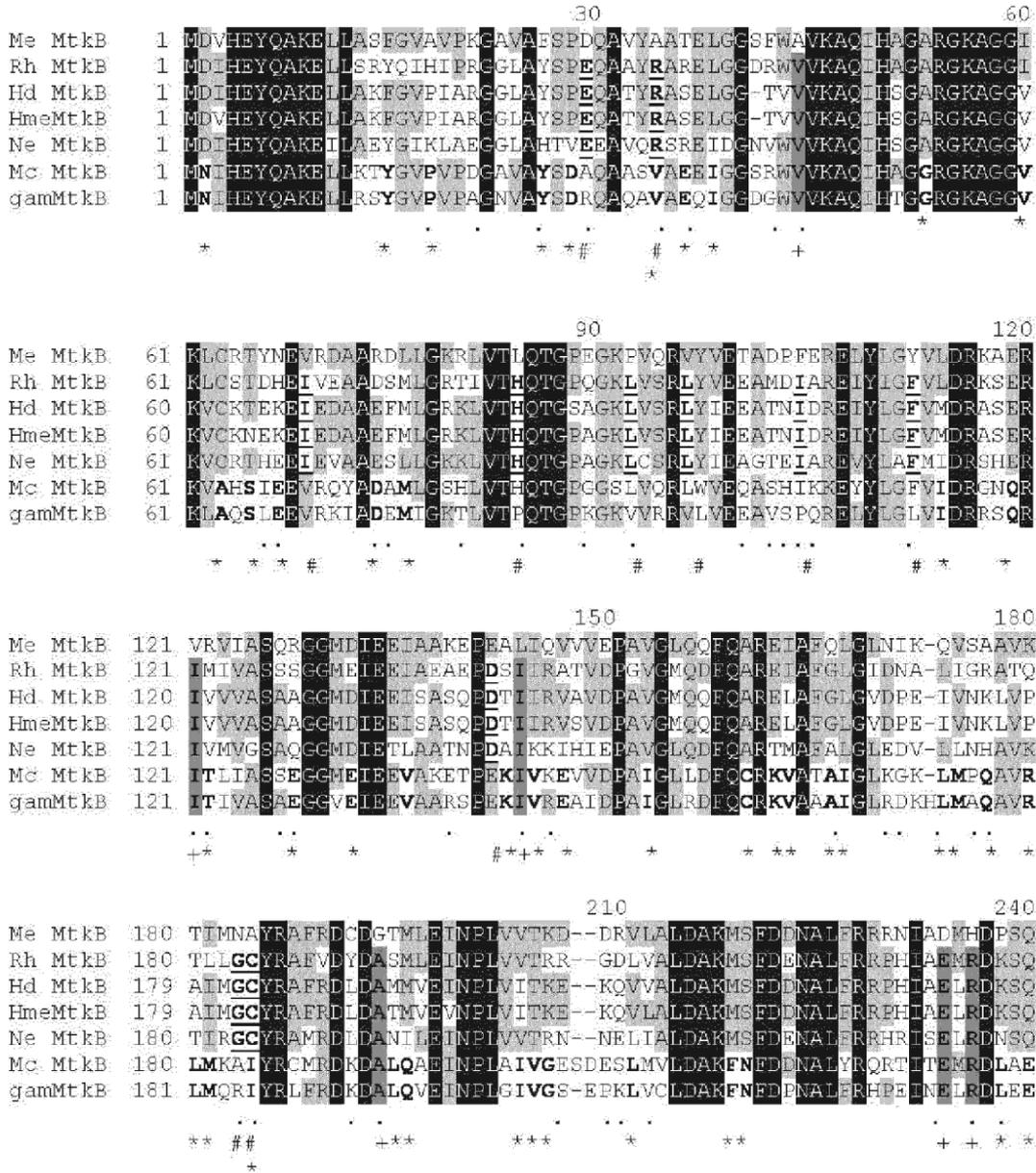
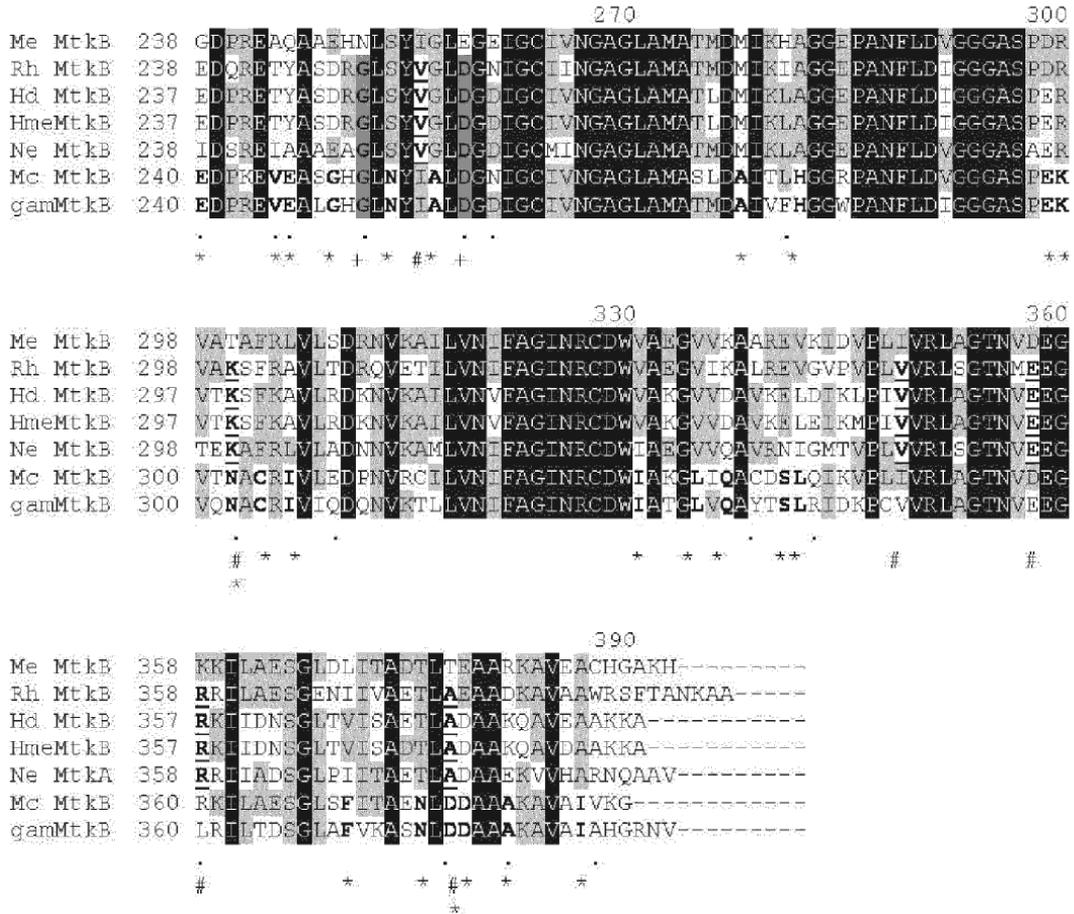


FIG.2B



Aminoácidos conservados en todas las especies

Secuencias comunes en Rh, Hd, Hme, Ne, Mc, gam

Aminoácidos conservados en algunas especies

Secuencias comunes en Rh, Hd, Hme, Ne

Secuencias comunes en Mc, gam

FIG.3A

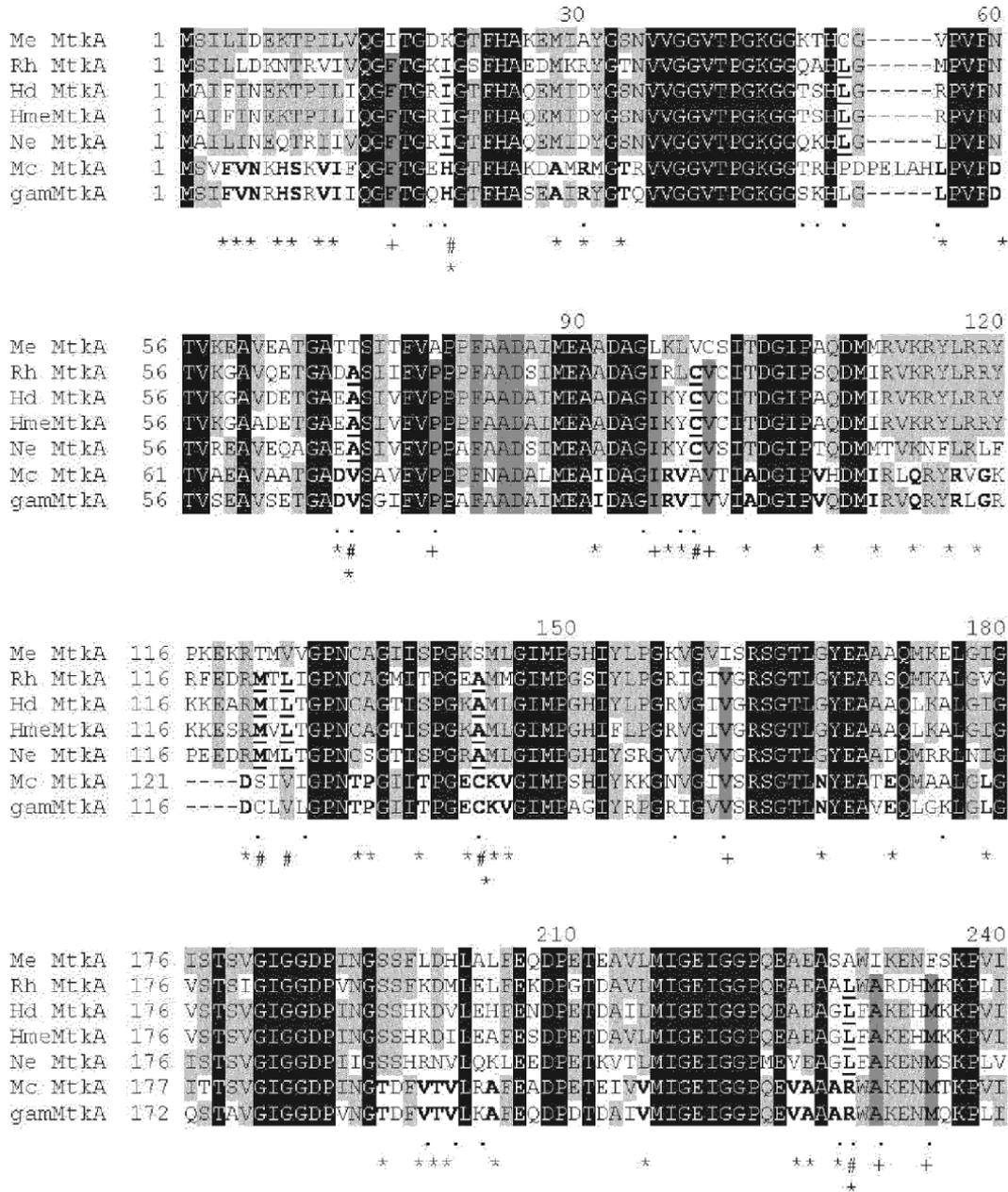


FIG.3B

```

                270                                300
Me MtkA 236 GFVAGLTAPKGRRMCHAGAIISATGDSAAEKAEIMRSYGLTVADDEGSEFGSTVADVLARA
Rh MtkA 236 AYIAGLSAPKGRRMCHAGAIISAFGEESAQEVELKSAGVIVPTESSEFGRTVADVLSAM
Hd MtkA 236 AYIAGLSAPKGRRMCHAGAIISAFGEESAAERVEILKGCGVAIAPTESSEMGSTVAQVLGKQ
HmeMtkA 236 AYIAGLSAPKGRRMCHAGAIISAFGEESAAERVEILKGCVVIAATESEMGSTVAQVLNQR
Ne MtkA 236 AYIAGLTAPPGRRMCHAGAIISAFGEESAAERVEIRLKELGVITICPTESLMGRTVAKVLAGL
Mc MtkA 237 GFVAGLAAPTGRRMCHAGAIISSEADTAGAKMDAMEALGLYVARNPAQIGQTVLRAAQEH
gamMtkA 232 GFVAGASAPKGRRMCHAGAIIEGEDTAKAKMDAMEELGVYVVRNEARISETVLRALKER
    ###                                * ## * ##### * ## * # *   *** *
                                * * * * *
    
```

```

Me MtkA 296 A-----
Rh MtkA 296 SKAA---
Hd MtkA 296 KKVA---
HmeMtkA 296 KKVA---
Ne MtkA 296 -----
Mc MtkA 297 GIRF---
gamMtkA 292 LGSAVSG
    
```

Aminoácidos conservados en todas las especies

Secuencias comunes en Rh, Hd, Hme, Ne, Mc, gam

Aminoácidos conservados en algunas especies

Secuencias comunes en Rh, Hd, Hme, Ne

Secuencias comunes en Mc, gam

FIG.4

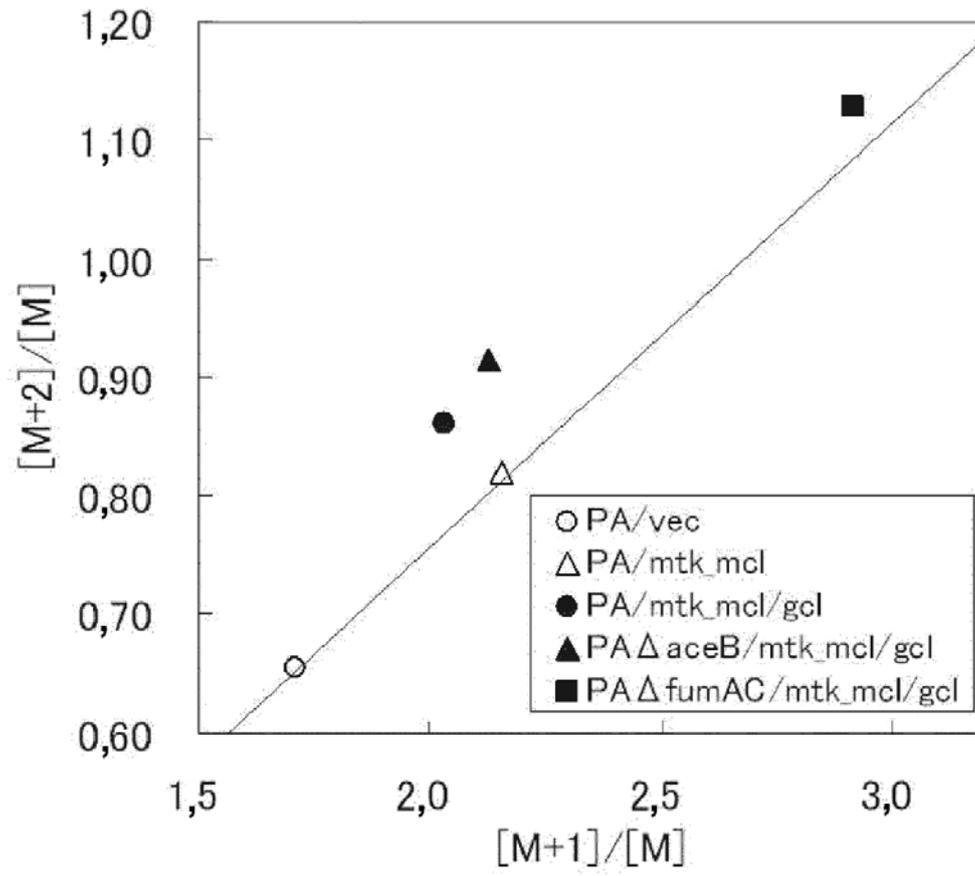


FIG.5

