

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 730**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/EP2013/051516**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13110797**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13701767 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2807253**

54 Título: **Nuevas enzimas de metanol deshidrogenasas procedentes de Bacillus**

30 Prioridad:

25.01.2012 GB 201201178

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

19.03.2018

73 Titular/es:

**SINTEF TTO AS (33.3%)
Postboks 4764 Sluppen
7465 Trondheim, NO;
RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN (33.3%) y
ETH ZURICH (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BRAUTASET, TRYGVE;
HEGGESET, TONJE MARITA BJERKAN;
KROG, ANNE;
QUAX, WILHELMUS JOHANNES;
SIBBALD, MARK JAN JACOBUS BERNHARD;
VORHOLT, JULIA;
MÜLLER, JONAS;
KIEFER, PATRICK;
POTTHOFF, EVA;
WENDISCH, VOLKER F;
LESSMEIER, LENNART;
HEUX, STÉPHANIE y
PORTAIS, JEAN-CHARLES**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 659 730 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

Nuevas enzimas de metanol deshidrogenasas procedentes de *Bacillus*

La presente invención se refiere a enzimas metanol deshidrogenasas (MDH) desconocidas previamente identificadas en bacterias metilotróficas, y se refiere en particular a nuevos genes que codifican MDH identificados en *Bacillus methanolicus* MGA3 y *Bacillus methanolicus* PB1. La invención se basa en el sorprendente hallazgo de que existen múltiples isoformas de MDH en esas cepas de *B. methanolicus* que se diferencian en sus propiedades bioquímicas. Dichos nuevos genes que codifican isoformas de MDH previamente desconocidas se pueden utilizar en la modificación genética de microorganismos huésped, por ejemplo, en el contexto de la utilización de metanol y/u otros compuestos C1 como sustrato de crecimiento. Por lo tanto, se pueden utilizar los nuevos genes/enzimas para introducir o modificar, por ejemplo, hacer posible/aumentar la actividad de MDH en un microorganismo huésped.

Los microorganismos metilotróficos pueden utilizar fuentes de un carbono (C1) tales como el metano y metanol como única fuente de energía y la generación de biomasa y existe una variedad de enzimas y rutas diferentes para el metabolismo de C1 entre los metilotróficos. Se han aislado varios bacilos termotolerantes Gram-positivos con la capacidad para crecer en metanol a temperaturas hasta de 60 °C y se han clasificado como *Bacillus methanolicus*. El *B. methanolicus* es un denominado metilótrofo restringido que implica que puede utilizar pocas fuentes multicarbono para la energía y el crecimiento. El interés científico en esos organismos se ha enfocado principalmente a su potencial como factorías celulares para la producción industrial de aminoácidos, sobre todo L-lisina, y L-glutamato, a partir de metanol a temperaturas elevadas, pero también se ha propuesto su uso potencial como huéspedes para la producción de otros productos útiles, que incluyen vitaminas, citocromos, coenzimas y proteínas recombinantes.

El *B. methanolicus* MGA3 (ATCC 53907) se aisló originalmente de muestras de suelo en Minnesota (Schendel, Bremmon y col. (1990) Appl Environ Microbiol 56(4): 963-970) y ha sido la cepa modelo principal utilizada para la modificación metabólica de esta bacteria (Brautaset, Jakobsen y col. (2007) Appl Microbiol Biotechnol 74(1): 22-34; Jakobsen, Brautaset y col. (2009) Appl Environ Microbiol 75(3): 652-661; Brautaset, Jakobsen y col. (2010) Appl Microbiol Biotechnol 87(3): 951-964). El *B. methanolicus* tiene varios rasgos únicos incluyendo un metanol deshidrogenasa dependiente de NAD (MDH) para la oxidación del metanol (de Vries, Arfman y col. (1992) J Bacteriol 174(16): 5346-5353; Arfman, Hektor y col. (1997) Eur J Biochem 244(2): 426-433; Hektor, Kloosterman y col. (2002) J Biol Chem 277(49): 46966-46973). La actividad de la metanol deshidrogenasa (MDH) es un atributo clave para el crecimiento metilótrofo y está implicado en la primera etapa de la fermentación del metanol, a saber, la oxidación de metanol a formaldehído. El formaldehído es un intermediario en el metabolismo del metanol y la detoxificación de este metabolito tóxico celular por tanto, es muy importante. El formaldehído se puede asimilar mediante la ruta RuMP. También se ha propuesto una ruta desemejante para la conversión directa del formaldehído en CO₂. Se asume que las rutas desemejantes son importantes para la generación de energía total en las células al crecer en metanol. Junto con la ruta RuMP, las rutas desemejantes también pueden tener papeles en la regulación del formaldehído por debajo de niveles tóxicos en las células. Por lo tanto, la oxidación eficaz del metanol y la asimilación concomitante del formaldehído es de importancia crucial para el crecimiento y flujo de energía en el metabolismo primario y para la producción de productos deseados. Además, todo esto se tiene que sopesar cuidadosamente con el fin de asegurar la conversión eficaz de metanol y al mismo tiempo evitar la acumulación tóxica de formaldehído en las células. A este respecto, la MDH tiene un papel crucial en la metilotrofia bacteriana.

Las MDH bacterianas se pueden dividir en grupos de acuerdo con sus mecanismos de reacción y el uso de un cofactor(es). Las más estudiadas son las quinoproteína MDH dependientes de dos subunidades pirroloquinolina quinona (PQQ), que se encuentra ampliamente en las bacterias metilotróficas Gram-negativas. Los metilótrofos Gram-positivos codifican comúnmente metanol deshidrogenasas dependientes de NAD(P)⁺ y además de la MDH de la cepa MGA3 expuesta anteriormente, se ha identificado una MDH dependiente de NAD⁺ en otra cepa de *B. methanolicus*, la cepa C1 (Vonck, Arfman y col (1991) J Biol Chem 266(6): 3949-3954; de Vries, Arfman y col. (1992) J Bacteriol 174(16): 5346-5353). La MDH de *B. methanolicus* presenta una similitud de secuencia primaria con las alcohol deshidrogenasas que contienen hierro, y por lo tanto se ha clasificado en la familia III de alcohol deshidrogenasas dependientes de NAD. La enzima está compuesta de diez subunidades idénticas que contiene cada una, una molécula de NAD(H) unida fuertemente, pero no covalentemente además de un ion Zn²⁺ y 1-2 iones Mg²⁺.

Se ha descubierto que la metilotrofia en *B. methanolicus* MGA3 es dependiente de plásmidos e implica el reclutamiento concertado de genes plasmídicos y cromosómicos. Los trabajos en *B. methanolicus* MGA 3 han identificado un plásmido pBM19 que alberga *mdh* y cinco genes de la ruta RuMP; la cura del pBM19 da como resultado la pérdida de capacidad para crecer en metanol (Brautaset y col. (2004) J Bacteriol 186(5): 1229-1238). En el trabajo que se lleva a cabo en la presente invención, y que no se había informado previamente, se ha presentado un plásmido análogo correspondiente, denominado pBM20, en el modelo alternativo de cepa PB1 (NCIMB 13113) fisiológicamente muy diferente.

Se ha demostrado que las enzimas MDH dependientes de NAD se activan catalíticamente por la proteína activadora Act que se clasifica dentro de la familia nudix hidrolasa.

La oxidación del metanol es un cuello de botella principal en los intentos para modificar la metilrotrofia en microorganismos huéspedes. Además, incluso en el contexto de microorganismos huéspedes que son metilrotrofos naturales, por ejemplo, *B. methanolicus*, la modificación de la actividad o expresión de MDH puede ser beneficiosa para mejorar el crecimiento y/o rendimiento de los productos deseados. Por lo tanto existe una continua necesidad de enzimas MDH, y en particular nuevos genes *mdh* que se puedan utilizar para modificación genética de microorganismos, especialmente dichos genes que codifican nuevas enzimas que tienen propiedades alteradas o mejoradas con respecto a las enzimas MDH de la técnica, por ejemplo, con actividad o estabilidad mejoradas, o que pueden ser de alguna manera beneficiosas para su uso en la modificación genética de huéspedes deseados.

En vista de entender mejor la fisiología de la célula huésped metilrotrofica de *B. methanolicus*, los presentes inventores han secuenciado el genoma de la MGA3 y la cepa PB1 de tipo silvestre alternativa. Sorprendentemente, en el curso de la secuenciación se ha descubierto que ambas cepas poseen múltiples isoformas de MDH; en ambas cepas se han identificado tres genes que codifican tres proteínas MDH dependientes de NAD diferentes. Por lo tanto, en *B. methanolicus* MGA3, además del gen *mdh*-MGA3 que codifica el plásmido informado previamente, se han identificado dos genes nuevos, que se denominan en el presente documento *mdh2*-MGA3 y *mdh3*-MGA3. De manera interesante, estos nuevos genes *mdh* están localizados en el cromosoma. En el *B. methanolicus* PB1, se han identificado tres nuevos genes, denominados en el presente documento *mdh*-PB1, *mdh1*-PB1 y *mdh2*-PB1, el primero albergado en el plásmido (en el plásmido pBM20) y los dos últimos cromosómicos. Todos estos genes se han expresado recombinantemente, se han purificado y caracterizado bioquímicamente *in vitro*. Aunque presentan algunas similitudes, está claro que estas enzimas MDH diferentes pueden tener diferentes propiedades, que incluyen su actividad. Basándose en estos estudios, y en particular en el análisis de secuencias, se han identificado dos sub-familias de MDH diferentes.

La primera sub-familia incluye el gen *mdh* albergado en el plásmido descrito previamente de la cepa MGA3 (*mdh*-MGA3), y dos genes de la cepa PB1, *mdh*-PB1 y *mdh1*-PB1 (siendo el *mdh*-PB1 el albergado en el plásmido y siendo el *mdh1*-PB1 cromosómico) y se identifica en el presente documento como la "familia tipo *mdh/mdh1*". La segunda sub-familia incluye los nuevos genes cromosómicos *mdh2*-MGA3, *mdh3*-MGA3 y *mdh2*-PB1 y se identifica en el presente documento como la "familia tipo *mdh2/mdh3*". Es esta última familia la que forma el objeto de la presente invención.

Los miembros de la familia tipo *mdh2/mdh3* tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia entre ellas a nivel de ADN (véase la Figura 1) y a nivel de secuencia de aminoácidos con respecto a las proteínas codificadas (véase la Figura 2). En particular, las secuencias codificantes de *mdh2*-MGA3 (SEQ ID NO: 1) y *mdh3*-MGA3 (SEQ ID NO: 3) comparten un 96 % de identidad de secuencia de ADN y los polipéptidos deducidos Mdh2-MGA3 (SEQ ID NO: 2) y Mdh3-MGA3 (SEQ ID NO: 4) comparten el 96 % de identidad de aminoácidos (véase la Figura 2B). El polipéptido deducido Mdh2-PB1 (SEQ ID NO: 6) es un 91 % idéntica al polipéptido deducido Mdh2-MGA3 (SEQ ID NO: 2) y un 92 % idéntica al polipéptido deducido Mdh3-MGA3 (SEQ ID NO: 4) (véase la Figura 2B).

Por otra parte, la identidad de secuencia entre los miembros de las dos sub-familias diferentes es mucho menos, en la región del 60-68 %. Por ejemplo la secuencia codificante *mdh2*-MGA3 (SEQ ID NO: 1) es un 65 % idéntica a la secuencia codificante *mdh*-MGA3 (SEQ ID NO: 7) y el polipéptido deducido Mdh2-MGA3 (SEQ ID NO: 2) es un 61 % idéntico al polipéptido deducido Mdh-MGA3 (SEQ ID NO: 8). La secuencia codificante del gen *mdh3*-MGA3 (SEQ ID NO: 3) es un 66 % idéntica a la secuencia codificante de *mdh*-MGA3 (SEQ ID NO: 7) y el polipéptido deducido Mdh3 (SEQ ID NO: 4) es un 62 % idéntico al Mdh-MGA3 (SEQ ID NO: 8).

Como se ha señalado anteriormente, los estudios de caracterización bioquímica han revelado diferencias entre las enzimas MDH de la familia tipo *mdh2/mdh3* y las de la familia tipo *mdh/mdh1*. Por ejemplo, Mdh3-MGA3 (SEQ ID NO: 4) y Mdh2-PB1 (SEQ ID NO: 6) tienen una termoestabilidad mejorada. También se han observado diferencias en la especificidad de sustrato y en el nivel de actividad sobre diferentes sustratos alcohólicos. Esto abre la posibilidad de la utilización de dichas enzimas en la oxidación de diferentes alcoholes (por ejemplo, etanol o propanol) y no solo el metanol.

También se han llevado a cabo estudios para expresar los genes de manera heteróloga en diferentes huéspedes no metilrotrofos. Estos estudios establecen la utilidad de las nuevas secuencias de la familia tipo *mdh2/mdh3* de la invención en la modificación genética de una variedad de diferentes células huéspedes para introducir una actividad MDH y de esta manera hacer posible la utilización de metanol. Se ha propuesto que la presente invención tiene una aplicabilidad amplia en tanto que se han implicado diferentes células huéspedes y en los estudios descritos en el presente documento se han utilizado dos cepas bacterianas huéspedes bien caracterizadas biotecnológicamente y muy diversas filogenéticamente, es decir, la Gram-negativa *Escherichia coli*, y el *Bacillus subtilis* Gram-positivo, y cada uno de los microorganismos huéspedes modificados genéticamente han demostrado que presentan un aumento de la actividad de MDH cuando se modifican para que expresen las nuevas enzimas MDH de la presente invención, específicamente enzimas de la familia tipo *mdh2/mdh3* de *B. methanolicus* MGA3 y *B. methanolicus* PB1.

Notablemente, los resultados que se presentan en el presente documento presentan que diferentes enzimas particulares pueden presentar una actividad mejorada en diferentes huéspedes. Por ejemplo, para la expresión de la actividad de MDH en el huésped *E. coli*, el Mdh2-MGA3 (SEQ ID NO: 1) daba los mejores resultados. La elección de la enzima MDH también puede depender de las circunstancias de la expresión y la naturaleza precisa de la célula

huésped y/o las condiciones de cultivo, por ejemplo, si se co-expresa un gen *act* particular. Por lo tanto, las nuevas enzimas de la invención y sus secuencias codificantes proporcionan ventajosamente un nuevo repertorio expandido de enzimas MDH y moléculas de ácido nucleico codificantes para su uso en la oxidación de alcoholes, incluyendo el metanol, y en particular para su uso en la modificación genética de células huésped, (por ejemplo, para la producción de células huésped recombinantes), por ejemplo, para introducir o modificar la actividad de alcohol deshidrogenasa en una célula huésped, particularmente la actividad MDH, o para introducir la metilotropía en una célula huésped. Como se describe adicionalmente posteriormente, las moléculas de ácido nucleico que codifican las nuevas enzimas de la presente invención se pueden utilizar solas o en combinación.

En consecuencia, en un primer aspecto de la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico, particularmente una molécula de ácido nucleico, que codifica un polipéptido (o proteína) que tiene una actividad alcohol deshidrogenasa, en particular, actividad metanol deshidrogenasa, que comprende o tiene (por ejemplo, que consiste en) una secuencia de nucleótidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

(i) una secuencia de nucleótidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 (*mdh2*-MGA3), 3 (*mdh3*-MGA3), o 5 (*mdh2*-PB1);

(ii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, más particularmente al menos un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia, con una secuencia de nucleótido que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3 o 5;

(iii) una secuencia de nucleótido que está degenerada con respecto a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 5;

(iv) una secuencia de nucleótidos que es una parte de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 o 5 o de una secuencia de nucleótidos que está degenerada con una secuencia de SEQ ID NO: 1, 3 o 5.

(v) una secuencia de nucleótidos que codifica todo o parte de un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 (*Mdh2*-MGA3), 4 (*Mdh3*-MGA3) o 6 (*Mdh2*-PB1); y

(vi) una secuencia de nucleótidos que codifica todo o parte de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6;

o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementario con la secuencia de nucleótidos de uno cualquiera de (i) a (vi).

En un aspecto adicional de la presente invención proporciona un polipéptido que tienen actividad alcohol deshidrogenasa, en particular actividad metanol deshidrogenasa, y que comprende o tiene (por ejemplo, que consiste en) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) todo o parte de una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6; y

(ii) todo o parte de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención permiten ventajosamente la introducción o modificación de alcohol deshidrogenasa, y en particular actividad MDH en un microorganismo huésped. Esto se puede conseguir modificando el microorganismo para que exprese una o más moléculas de ácido nucleico de la invención. Como se ha señalado anteriormente, dichas moléculas de ácido nucleico se pueden obtener, o derivar de los genes *mdh* de las cepas de *B. methanolicus*, en particular las cepas MGA3 y PB1. En una realización particular, se pueden utilizar en combinación moléculas de ácido nucleico que codifican o se derivan de moléculas de ácido nucleico que codifican diferentes enzimas MDH (por ejemplo, isoenzimas diferentes, o enzimas de diferentes cepas, o variantes polipeptídicas diferentes, etc.). Por lo tanto, se pueden co-expresar dos o más moléculas de ácido nucleico diferentes.

La presente invención proporciona por lo tanto un procedimiento para introducir o modificar la actividad MDH en un microorganismo huésped, expresando en dicho microorganismo una o más moléculas de ácido nucleico de la invención. En particular, la molécula de ácido nucleico puede ser heteróloga, o no nativa del microorganismo huésped. Se puede expresar bajo el control de un promotor nativo o no nativo.

En consecuencia, en otro aspecto más la presente invención proporciona un procedimiento para introducir o modificar la actividad alcohol deshidrogenasa, y en particular la actividad MDH, en un microorganismo huésped, comprendiendo dicho procedimiento la introducción de dicho microorganismo una molécula de ácido nucleico de la invención como se ha definido anteriormente en el presente documento y cultivando dicho microorganismo en condiciones en las que se exprese dicha molécula de ácido nucleico.

Se verá que en este aspecto, la invención también puede ser para proporcionar un procedimiento para producir un polipéptido que tenga actividad alcohol deshidrogenasa, y en particular actividad MDH, comprendiendo dicho

procedimiento la introducción en un microorganismo huésped de una molécula de ácido nucleico de la invención como se ha definido anteriormente en el presente documento y cultivar dicho microorganismo en condiciones en las que se produzca dicho polipéptido. El microorganismo huésped puede ser un microorganismo que no posee actividad MDH nativamente (por ejemplo, en su tipo silvestre) (es decir, no tiene o posee una MDH endógena), y por lo tanto en dicha realización la invención proporciona la introducción de la actividad MDH en un huésped. En una vista alternativa, en dicha realización el huésped se puede modificar para introducir la capacidad de convertir el metanol en formaldehído, o en otras palabras para modificar un huésped para permitir la etapa inicial de la utilización de una fuente de carbono C1, particularmente la utilización del metanol.

En una realización alternativa el microorganismo huésped puede tener o poseer una enzima MDH endógena, y el procedimiento de la invención puede por lo tanto implicar la modificación de la actividad MDH en dicho huésped introduciendo una molécula de ácido nucleico que codifica más enzima MDH o adicional, que puede por ejemplo ser heteróloga respecto al huésped. También se engloba la sobre-expresión de la actividad MDH en un microorganismo huésped introduciendo en dicho microorganismo una molécula de ácido nucleico que codifique una enzima MDH nativa (es decir, en el que la molécula de ácido nucleico introducida codifica una enzima MDH endógena).

El microorganismo huésped modificado se puede cultivar o desarrollar utilizando cualquier fuente de carbono como sustrato incluyendo pero sin limitarse a metanol o un alcohol más alto. Un procedimiento de la invención puede por tanto en una realización comprender el cultivo o desarrollo de un microorganismo huésped que contiene una o más moléculas de ácido nucleico que codifica una MDH introducido exógenamente como se define en el presente documento.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un microorganismo huésped en el que se ha introducido una molécula de ácido nucleico de la invención como se ha definido anteriormente en el presente documento, en el que dicha molécula de ácido nucleico está unida operativamente con una secuencia de control de la expresión heteróloga (es decir, una secuencia de control de la expresión heteróloga respecto a la molécula de ácido nucleico de la invención, o un vector como se describe posteriormente en el presente documento).

En este aspecto de la invención, la secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido de la alcohol deshidrogenasa (por ejemplo, MDH) también puede ser heterólogo respecto al microorganismo huésped. La molécula de ácido nucleico introducida también puede comprender adicionalmente alguna otra secuencia heteróloga respecto al huésped (por ejemplo, un vector o secuencia marcadora. En el caso de un microorganismo huésped que expresa endógenamente una enzima alcohol deshidrogenasa, el huésped modificado se puede distinguir del huésped no modificado porque contiene una copia adicional de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de alcohol deshidrogenasa. En otras palabras puede contener más copias de la secuencia de nucleótidos codificante que un huésped no modificado.

Como se ha mencionado anteriormente, las moléculas de ácido nucleico que codifican las nuevas enzimas MDH de la presente invención se puede obtener, por ejemplo, aislar o clonar, a partir de *B. methanolicus*, en particular las cepas MGA3 y PB1. Por lo tanto, la enzima MDH puede ser Mdh2 o Mdh3 de MGA3 (SEQ ID NO: 2 o 4, respectivamente), o Mdh2 de PB1 (SEQ ID NO: 6). Sin embargo, además de las secuencias específicas nativas ("de tipo silvestre") que se indican anteriormente, también se incluyen variantes de estas secuencias que tengan al menos un 90% de identidad de secuencia de nucleótidos con las mismas y que mantengan la actividad alcohol deshidrogenasa, y particularmente MDH. Dichas variantes pueden incluir variantes naturales, por ejemplo, diferentes variantes que pueden existir en las cepas de la naturaleza o que se pueden obtener de otras cepas de *B. methanolicus*, y que codifican polipéptidos MDH que son funcionalmente equivalentes a los polipéptidos MDH de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6. De manera alternativa, las variantes pueden ser sintéticas o variantes artificiales, por ejemplo, que se obtienen o derivan por modificación (por ejemplo, una mutación) de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6 o las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, 3 o 5. Como se señala anteriormente se pueden utilizar combinaciones de dos o más moléculas de ácido nucleico diferentes que codifiquen un polipéptido que tenga actividad alcohol deshidrogenasa, como se define en el presente documento, o complementarias de las mismas. Las modificaciones se pueden seleccionar basándose en una actividad metanol deshidrogenasa de la variante correspondiente o alternativamente se puede construir basándose en algoritmos de diseño proteico utilizando estructuras o modelos moleculares para predecir la actividad enzimática mejorada.

El polipéptido MDH de la presente invención puede incluir también un polipéptido codificado por un fragmento (una parte) de la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, 3 o 5, o puede comprender o consistir en un fragmento (o una parte) de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6. Una "parte" de una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de la invención puede incluir o comprender al menos un 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % o más de nucleótidos o aminoácidos contiguos de la secuencia.

El microorganismo huésped puede ser cualquier microorganismo adecuado. Puede ser cualquier organismo procarionte, pero particularmente será una bacteria. Se puede utilizar cualquier bacteria Gram-positiva o Gram-negativa, pero se puede hacer una mención particular a las siguientes clases o géneros: *Escherichia*, *Corynebacterium* y *Bacillus*. Los microorganismos huésped representativos incluyen *E. coli*, *B. subtilis* y *C. glutamicum*. Como se ha señalado anteriormente, se pueden utilizar también *B. methanolicus* u otros

microorganismos huésped metilotróficos, por ejemplo, *Methylomonas*, *Methylobacillus*, *Methylobacterium*, *Methylophilus* o *Methylococcus*. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos microorganismos y se extiende a cualquier microbio huésped.

5 El *C. glutamicum* es una bacteria con forma de bastón, no patógeno y Gram-positivo. Crece en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y es auxótrofo para biotina. El *C. glutamicum* es capaz de crecer sobre una variedad de sustratos como fuentes de carbono y energía únicas o combinadas. Entre los sustratos metabolizados hay azúcares como glucosa, fructosa o sacarosa y ácidos orgánicos tales como L-lactato y acetato. Además, el *C. glutamicum* es capaz de crecer en etanol como única fuente de carbono. Se utiliza ampliamente para la producción industrial a gran escala de los aminoácidos L-glutamato y L-lisina. Recientes estudios de modificación metabólica han demostrado que *C. glutamicum* también es capaz de producir una variedad de otros compuestos de interés comercial, por ejemplo, otros L-aminoácidos, D-aminoácidos, diaminas tales como cadaverina o putrescina, ácidos orgánicos tales como succinato y biocombustibles tales como etanol o isobutanol.

15 De acuerdo con la presente invención, una o más moléculas de ácido nucleico de la invención pueden expresarse en el microorganismo huésped, incluyendo en particular al menos una molécula de ácido nucleico heteróloga (es decir, una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es heteróloga respecto al huésped), y en particular que comprenden una secuencia heteróloga que codifica un polipéptido MDH. Por lo tanto, el microorganismo huésped puede modificarse para que exprese una o más copias de una molécula de ácido nucleico o de manera alternativa se pueden modificar para que exprese una o más copias de varias moléculas del ácido nucleico de la invención diferentes.

20 Por lo tanto, el microorganismo que está modificado (o "manipulado") para que exprese MDH de acuerdo con la presente invención contendrá una molécula de ácido nucleico que codifica MDH introducida exógenamente como se define en el presente documento. En otras palabras, el microorganismo se puede transformar con dicha molécula de ácido nucleico que codifica MDH y puede considerarse como un microorganismo transgénico o recombinante. Como se ha señalado anteriormente, la molécula de ácido nucleico puede codificar una enzima MDH que es homóloga o heteróloga (es decir, nativa o no nativa) respecto a ese huésped. Por lo tanto, se puede introducir una copia adicional (o más) de un gen que es nativo respecto al huésped. La molécula de ácido nucleico que se introduce puede comprender una secuencia de nucleótidos derivada del gen nativo, o de una fuente diferente.

La MDH puede expresarse en combinación con otras enzimas para permitir nuevas actuaciones del microorganismo.

30 "Expresión" como se utiliza en el presente documento se refiere a la transcripción de una secuencia de nucleótidos en un ARNm y la traducción posterior de dicho ARNm en un producto polipeptídico.

35 Como se hace referencia en el presente documento, "sobre-expresión" significa que la expresión de la secuencia de nucleótidos está aumentada en comparación, o respecto al, nivel de expresión que se produce en un microorganismo que no se ha modificado con respecto a la invención. La expresión se puede considerar en términos de la cantidad de producto polipeptídico (por ejemplo, enzima MDH) producido, que se puede determinar por cualquier procedimiento conveniente conocido en la técnica. Por ejemplo, la expresión se puede determinar midiendo la actividad proteica (es decir, la actividad del polipéptido MDH expresado). De manera alternativa, la cantidad de proteína producida se puede medir para determinar el nivel de expresión, por ejemplo transferencia de Western u otros sistemas de detección de anticuerpos o además por cualquier procedimiento de evaluación o cuantificación proteica. También se puede utilizar la PCR en tiempo real. El ensayo puede ser un ensayo *in vivo* o *in vitro*.

40 La actividad se puede determinando la actividad de la alcohol deshidrogenasa por procedimientos conocidos en la técnica y se describe en la bibliografía, por ejemplo como se detalla en los Ejemplos posteriores. La actividad de MDH de una proteína codificada puede catalizar, por ejemplo, la conversión de metanol a formaldehído y dicha actividad se define en el presente documento como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 mmol de NADH por minuto para lo que se pueden utilizar distintos alcoholes como sustrato, por ejemplo, etanol, metanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isopropanol y 1,3-propanodiol. Las actividades de la alcohol deshidrogenasa se puede medir espectrofotométricamente como se ha descrito previamente por Hektor y col. (2002; Chem 277(49): 46966-46973).

45 Un polipéptido de alcohol deshidrogenasa se puede expresar, o sobre-expresar, por cualquier medio conocido en la técnica, tal como introduciendo una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MDH, por ejemplo, una copia de un gen nativo, por ejemplo que se expresa a partir de un promotor más fuerte o no regulado con respecto al gen nativo, y/o introduciendo múltiples copias de una molécula de ácido nucleico que codifica MDH.

El microorganismo también se puede modificar para introducir elementos reguladores alternativos.

55 En una realización particular, una molécula de ácido nucleico que codifica MDH se puede expresar a partir de un promotor no nativo o heterólogo (es decir, un promotor que es heterólogo respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica MDH, es decir no es el promotor genético de MDH nativo) y particularmente un promotor fuerte, no nativo o heterólogo. Por lo tanto, en una realización particular, el gen que codifica MDH no se utiliza con su promotor

nativo. Se puede introducir un gen que codifica MDH que está bajo el control de un promotor no nativo. Como se hace referencia en el presente documento, un promotor fuerte es el que expresa un gen a un alto nivel, o al menos a un nivel más alto que si se afectara por su promotor nativo. La expresión "promotor fuerte" es una expresión bien conocida y que se utiliza ampliamente en la técnica y se conocen muchos promotores fuertes en la técnica, o se pueden identificar por experimentación de rutina. De manera alternativa, el promotor es un promotor *mdh* de *B. methanolicus*. Sin embargo la elección del promotor no está particularmente limitada.

De manera alternativa, se puede expresar un gen MDH utilizando un promotor nativo. La invención engloba el uso de un microorganismo que puede expresar de manera endógena un gen *mdh* o uno que no lo hace. En el caso del primero, se pueden introducir una o más copias adicionales del gen nativo o una variante del mismo o de otra MDH o molécula de ácido nucleico codificante, y estos se pueden introducir bajo el control de un promotor nativo o no nativo. Con un promotor nativo se puede utilizar por ejemplo, un vector multi-copia. En el caso del último, se introduce una MDH (o molécula de ácido nucleico codificante) que es heteróloga respecto de ese huésped, pero que puede estar bajo el control de un promotor que es nativo o no nativo respecto al gen de MDH del que se deriva la molécula de ácido nucleico codificante.

Los procedimientos para introducir los genes o moléculas de ácido nucleico se conocen bien en la técnica y se describen ampliamente en la bibliografía y se puede utilizar cualquier procedimiento deseado. El gen (molécula de ácido nucleico) puede de esta manera introducirse utilizando un vector, que puede ser un vector de replicación autónoma o un vector que permita al gen (molécula de ácido nucleico) que se integre en el genoma del huésped (por ejemplo, en un cromosoma). El gen (molécula de ácido nucleico) que se va a expresar puede por tanto introducirse en un vector de expresión y el vector de expresión se puede introducir entonces en la célula huésped. Los procedimientos para construir vectores de expresión y la introducción de los mismos en células huésped se conocen bien en la técnica. Convenientemente, el gen que codifica la MDH se puede introducir utilizando un vector plásmido y se puede transformar un microorganismo huésped con el plásmido, por ejemplo, por electroporación. La elección del procedimiento puede depender del microorganismo que se utilice. Los procedimientos para la introducción de ácidos nucleicos y vectores en los microorganismos se conocen bien y están ampliamente descritos en la bibliografía.

La molécula de ácido nucleico codifica preferentemente un polipéptido o proteína que es una MDH o una parte de la misma que tiene actividad MDH.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico como se define en las partes (i) a (vi) anteriores codifica un polipéptido o proteína que tiene o mantiene la función o actividad de propiedades del polipéptido MDH como se define por las secuencias de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento e incluye cualquier longitud de cadena de aminoácidos (es decir, cualquier polímero u oligómero de aminoácidos).

Como se ha señalado anteriormente, la invención se extiende a partes o fragmentos funcionales de secuencias de nucleótidos que se han definido anteriormente, por lo tanto significa partes o fragmentos que codifican una proteína o polipéptido que tiene la misma o sustancialmente la misma o sustancialmente la misma actividad (por ejemplo, actividad catalítica o enzimática) que el polipéptido/proteína de longitud completa como se ha definido anteriormente. Los ensayos para determinar si una proteína/polipéptido codificada por dicha parte o fragmento tiene la misma o sustancialmente la misma actividad (por ejemplo, actividad catalítica o enzimática) que el polipéptido/proteína de longitud completa que se ha definido anteriormente que incluye los expuestos anteriormente. Normalmente, las partes o fragmentos funcionales de las moléculas de ácido nucleico solo tendrán pequeñas eliminaciones con respecto a la molécula de ácido nucleico de longitud completa, por ejemplo, eliminaciones de menos de 50, 40, 30, 20 o 10 nucleótidos, por ejemplo en el extremo 5' que codifican el extremo N de la proteína, el extremo 3' que codifica el extremo C de la proteína o internamente en la región codificante, aunque también se pueden llevar a cabo eliminaciones mayores, por ejemplo, de al menos 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600 o 700 nucleótidos, o eliminaciones de menos de 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600 o 700 nucleótidos, si el fragmento tiene la misma o sustancialmente la misma actividad (por ejemplo, actividad catalítica o enzimática) que la proteína de longitud completa que se ha definido anteriormente. La actividad de del polipéptido o proteína codificado se puede ensayar fácilmente para determinar si comparte la misma actividad que el polipéptido o proteína de longitud completa, por ejemplo, como se ha expuesto anteriormente.

Las partes o fragmentos representativos pueden comprender al menos un 50 %, y preferentemente al menos un 60, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de nucleótidos contiguos de las secuencias de nucleótidos que se exponen en SEQ ID NO: 1, 3 o 5. Los tamaños ejemplares de la parte o fragmento incluye al menos 620, 700, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100 y 1150 nucleótidos.

Se pueden utilizar fragmentos más cortos de la molécula de ácido nucleico de la invención como sondas, por ejemplo para protocolos de PCR o hibridación. Los fragmentos más cortos pueden tener por ejemplo 10-30, 20-25 nucleótidos de longitud. Dichas sondas son útiles en protocolos para identificar moléculas de ácido nucleico adicionales que comparten homología con moléculas de ácido nucleico de la invención.

5 La expresión "molécula de ácido nucleico" como se utiliza en el presente documento se refiere a un polímero de ARN o ADN que es de cadena sencilla o doble, que incluye opcionalmente bases sintéticas, no naturales o alteradas. Ejemplos de dichos polinucleótidos incluyen ADNc, ADN genómico y dsARN, *inter alia*. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico es ADN. Aunque las secuencias de ácido nucleico a las que se hace referencia en el presente documento comprenden nucleótidos timidina ("t"), se entenderá que la invención también se refiere a las secuencias correspondientes en las que la timidina está remplazada por uridina ("u").

10 Como se ha señalado anteriormente, la invención incluye moléculas de ácido nucleico que son variantes de las moléculas de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 1, 3 o 5, particularmente variantes funcionalmente equivalentes. Las moléculas de ácido nucleico "variantes" por tanto pueden tener cambios de nucleótido únicos o múltiples en comparación con las moléculas de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, 3 o 5. Por ejemplo, las variantes pueden tener 1, 2, 3, 4 o 5 o más adiciones, sustituciones, inserciones o eliminaciones de nucleótidos.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una proteína (o polipéptido) que tiene una alcohol deshidrogenasa, particularmente actividad MDH, como se ha definido anteriormente en el presente documento.

15 La proteína o polipéptido preferentemente es una MDH o una parte de la misma que tiene actividad MDH. Más particularmente, la parte mantienen la función o actividad de propiedades de la MDH de la que se deriva (como se define en referencia a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 4 o 6).

La proteína o polipéptido se puede definir alternativamente en referencia a las secuencias de ácido nucleico codificantes ya que dicha proteína o polipéptido de la invención puede codificarse por cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de la invención, como se ha descrito anteriormente.

20 La invención se extiende a partes o fragmentos funcionales de las moléculas de proteína de longitud completa, por lo que se quiere decir partes o fragmentos que tienen la misma o sustancialmente la misma actividad que las proteínas de longitud completa como se ha definido anteriormente, es decir, se deberían considerar variantes funcionalmente equivalentes. Como se ha señalado en otra parte del presente documento, la actividad se puede ensayar de distintas formas de manera directa. Normalmente estos fragmentos funcionales tendrán solo 25 eliminaciones pequeñas con respecto a la molécula de proteína de longitud completa, por ejemplo, de menos de 50, 40, 30, 20 o 10 aminoácidos, aunque como se ha señalado anteriormente en conexión con las moléculas de ácido nucleico, pueden ser apropiadas eliminaciones mayores, por ejemplo, de hasta 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 aminoácidos o al menos 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 aminoácidos. En todos los casos, los fragmentos deberían tener la misma o sustancialmente la misma actividad que las proteínas de longitud completa como se ha definido 30 anteriormente, es decir, se deberían considerar que son variantes funcionalmente equivalentes. Estas eliminaciones pueden ser en el extremo N, el extremo C o pueden ser eliminaciones internas.

Las partes o fragmentos representativos pueden comprender al menos un 50 %, y preferentemente al menos un 60, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos como se expone en las SEQ ID NO: 2, 4 o 6.

35 El polipéptido de la invención como se ha definido anteriormente incluye por tanto variantes de las secuencias de SEQ ID NO: 2, 4 o 6, por ejemplo, secuencias que tienen ciertos niveles de identidad de secuencia con las secuencias expuestas. Dichas variantes podrían ser variantes de origen natural, tal como proteínas u homólogos comparables que se encuentran en otras especies o más particularmente variantes encontradas en otros microorganismos, (que comparten las propiedades funcionales de la proteína codificada como se ha definido en otra 40 parte del presente documento).

Las variantes de los polipéptidos de origen natural como se define en el presente documento también se pueden generar sintéticamente, por ejemplo, utilizando técnicas de biología molecular convencionales que se conocen en la técnica, por ejemplo, técnicas de mutagénesis convencional tales como mutagénesis aleatorias dirigidas al sitio (por ejemplo utilizando transposición genética o PCR tendente a error). Dichas técnicas de mutagénesis se pueden 45 utilizar para desarrollar enzimas que tienen propiedades catalíticas mejoradas o diferentes.

También se pueden utilizar derivados de los polipéptidos como se define en el presente documento. Por derivado se quiere decir un polipéptido como se ha descrito anteriormente o una variante del mismo que en vez de aminoácidos de origen natural, contiene un análogo estructural de ese aminoácido. La derivación o modificación (por ejemplo, marcado, glicosilación, metilación de los aminoácidos de la proteína) también se puede producir a condición de que 50 la función de la proteína no se afecta de manera adversa.

"Análogo estructural" quiere decir un aminoácido no convencional. Ejemplos de dichos aminoácidos no convencionales o análogos estructurales que se pueden utilizar son aminoácidos D, isoésteres amida (tal como N-metil amida, amida retro-inversa, tioamida, tioéster, fosfonato, cetometileno, hidroximetileno, fluorovinilo, (E)-vinilo, metilenoamino, metilenotio o alcanos), L-N metil aminoácidos, D- α -metil aminoácidos, D-N-metil aminoácidos.

55 La identidad de secuencia se puede evaluar por cualquier procedimiento conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de identidad de secuencia entre secuencias, pueden ser útiles los programas de computadora que hacen múltiples alineamientos de secuencias, por ejemplo, Clustal W (Thompson y col., (1994) Nucleic Acids Res., 22:

4673-4680). Programas que comparan y alinean pares de secuencias como ALIGN (Myers y col., (1988) CABIOS, 4: 11-17), FASTA (Pearson y col., (1988) PNAS, 85:2444-2448; Pearson (1990), Methods Enzymol., 183: 63-98) y también son útiles para este fin BLAST con huecos (Altschul y col., (1997) Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402). Además, el servidor del Instituto Europeo de Bioinformática ofrece alineamientos basados en la estructura de secuencias proteicas (Holm (1993) J. Mol. Biol., 233: 123-38; Holm (1995) Trends Biochem. Sci., 20: 478-480; Holm (1998) Nucleic Acid Res., 26: 316-9).

Se pueden determinar múltiples alineamientos de secuencia y cálculos del porcentaje de identidad utilizando los parámetros de referencia de BLAST, (utilizando secuencias de todos los organismos disponibles, matriz Blosum 62, costes de huecos: existencia 11, extensión 1). De manera alternativa se puede utilizar el siguiente programa: Programa: Align Plus 4, versión 4.10 (Sci Ed Central Clone Manager Professional Suite). Comparación de ADN: Comparación global, matriz de Valoración Lineal Estándar, penalización de no coincidencia = 2, penalización de hueco abierto = 4, penalización de hueco extendido = 1. Comparación de aminoácidos: comparación global, matriz de valoración BLOSUM 62.

Una realización adicional de la invención proporciona una construcción, por ejemplo, una construcción recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, como se define en el presente documento, unida operativamente a una secuencia de control de la expresión heteróloga. En este contexto se entenderá que la secuencia de control de la expresión será heteróloga (es decir, no nativa) respecto a la molécula de ácido nucleico, más particularmente heteróloga respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de alcohol deshidrogenasa. A este respecto cuando la secuencia de nucleótidos codificante no es una secuencia de origen natural, la secuencia de control de la expresión será heteróloga respecto a la secuencia de nucleótidos de la que se deriva. Como se ha señalado anteriormente, se pueden utilizar combinaciones de diferentes moléculas de ácido nucleico.

Dicha secuencia de control de la expresión será normalmente un promotor. En consecuencia la construcción comprenderá preferentemente un promotor no nativo, particularmente un promotor no nativo fuerte. Opcionalmente, la construcción puede contener adicionalmente uno o más genes adicionales, y/o una o más secuencias reguladoras adecuadas. El uno o más genes opcionales pueden estar bajo el control del mismo promotor que la molécula de ácido nucleico que codifica MDH de la invención. La una o más secuencias reguladoras opcionales pueden ser secuencias reguladoras no nativas (es decir no son nativas con respecto a la secuencia de nucleótidos codificante, o secuencia de nucleótidos).

En el contexto de la presente invención, la expresión "unida operativamente" se refiere a la asociación de dos o más moléculas de ácido nucleico en un fragmento de ácido nucleico único de manera que la función de uno está afectada por el otro. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante cuando es capaz de afectar la expresión de esa secuencia codificante (es decir, la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes se pueden unir operativamente a secuencias reguladoras en una orientación en sentido o antisentido.

La expresión "secuencias reguladoras" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas corriente arriba (secuencias no codificantes 5'), en, o corriente abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que tienen influencia en la transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, operadores, amplificadores y secuencias líderes de la traducción. Como se utiliza en el presente documento, el término "promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN. En general, una secuencia codificante se localiza 3' respecto a una secuencia promotora. Los promotores se pueden derivar en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores que se encuentran en la naturaleza, o incluso comprenden segmentos de nucleótidos sintéticos. Se reconoce adicionalmente que como en la mayoría de los casos los límites de las secuencias reguladoras no han sido definidos completamente, fragmentos de ácido nucleico de diferentes longitudes pueden tener una actividad promotora idéntica.

Una realización adicional de la invención proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico o construcción como se define en el presente documento.

Más particularmente, se pueden construir vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico que codifica MDH de la invención (o construcción de la invención). La elección del vector puede depender el microorganismo huésped, el procedimiento que se utilizará para transformar las células huésped, el procedimiento que se utiliza para la expresión proteica, o de otro uso del vector que se pretenda. El experto es bien consciente de los elementos genéticos que deben estar presentes en un vector con el fin de transformar seleccionar y propagar satisfactoriamente las células huésped que contienen la molécula de ácido nucleico o construcción que codifica MDH de la invención. El experto también se dará cuenta de que diferentes eventos de transformación independientes darán como resultados diferentes niveles y patrones de expresión y por tanto de que puede ser necesario explorar múltiples eventos con el fin de obtener que las células presenten el nivel y patrón de expresión deseados. Dicha exploración se puede conseguir, *inter alia*, por análisis de Southern de ADN, análisis de Northern de la expresión de ARNm, análisis de Western de la expresión proteica.

La invención proporciona adicionalmente un microorganismo o huésped, que puede ser cualquier microorganismo huésped como se ha expuesto anteriormente, por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis* y *C. glutamicum*, que contenga una o más de las moléculas de ácido nucleico de la invención, en el que al menos una de dichas moléculas de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión heteróloga (es decir, una secuencia de control de la expresión heteróloga respecto a la molécula de ácido nucleico de la invención), o vectores de la invención. El huésped se modifica genéticamente de manera que se introduce o se altera la expresión de MDH. Esto se puede conseguir introduciendo una o más copias de un ácido nucleico que codifica MDH de la invención bajo el control de un promotor no nativo preferentemente fuerte. Por lo tanto, el material genético está presente en el microorganismo huésped pero no está presente en el microorganismo de origen natural (es decir, hay material genético exógeno presente).

En general, el material genético exógeno se introduce utilizando el procedimiento de transformación. La transformación implica normalmente un plásmido u otro vector que contendrá también un gen capaz de la identificación de los microorganismos transformados satisfactoriamente, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos (por ejemplo contra ampicilina) o algún otro marcador. Otros procedimientos para seleccionar los transformantes son conocidos por el experto e incluyen el uso de un vector sensible a la luz, un gen lux, que produce colonias positivas que se iluminan en oscuridad. Otros vehículos adecuados para la transformación de bacterias incluyen cósmidos y moléculas de bacteriófagos.

La invención se describirá ahora adicionalmente en referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes.

En los Ejemplos se hace referencia a las siguientes Figuras:

Figura 1: Alineamiento de secuencia de nucleótidos de *mdh*-MGA3, *mdh2*-MGA3, *mdh3*-MGA3, *mdh*-PB1, *mdh1*-PB1 y *mdh2*-PB1 de *B. methanolicus*.

Figura 2: (A) Alineamientos de secuencia primaria de las proteínas deducidas Mdh, Mdh2 y Mdh3 de *B. methanolicus* MGA3, y Mdh, Mdh1 y Mdh2 de PB1. (B) Alineamientos de secuencia primaria de la sub-familia *mdh2/mdh3* (es decir, proteínas Mdh2 y Mdh3 de *B. methanolicus* MGA3 y Mdh2 de PB1).

Figura 3: Actividades catalíticas de Mdh (negro), Mdh2 (gris oscuro) y Mdh3 (gris claro) purificadas en distintos alcoholes (200 mM) ensayadas *in vitro*. (A) Se analizó la especificidad de sustrato para las MDH de *B. methanolicus* MGA3 *in vitro*. Los sustratos alcohólicos se utilizaron a concentraciones de 500 mM excepto para el pentanol (300 mM) y hexanol (50 mM). Los datos se calcularon a partir del valor medio de dos experimentos que se hicieron por triplicado. (B) Se analizó la especificidad de sustrato para MDH de *B. methanolicus* PB1 *in vitro*. Los sustratos alcohólicos se utilizaron a concentraciones de 500 mM excepto para el pentanol (300 mM) y hexanol (50 mM). Los datos se calcularon a partir del valor medio de dos experimentos que se hicieron por triplicado.

Figura 4: (A) Determinación de la temperatura óptima para la actividad catalítica de Mdh, Mdh2 y Mdh3 *in vitro*. (B) La determinación de las condiciones de temperatura óptima para la catálisis por las proteínas MDH de *B. methanolicus* PB1 se llevó a cabo *in vitro*: la actividad específica se calculó en 500 mM de etanol; las mediciones se hicieron por triplicado.

Figura 5: (A) Se ensayó la temperatura de estabilidad de MGA3 Mdh, Mdh2 y Mdh3 *in vitro*. Las enzimas se incubaron a 45 °C o a 60 °C antes del ensayo enzimático. (B) La temperatura de estabilidad para Mdh, Mdh1 y Mdh2 de PB1 se ensayó *in vitro*. Las enzimas se incubaron a 45 °C o a 60 °C antes del ensayo enzimático.

Figura 6: Se ensayó la actividad catalítica de Mdh, Mdh2 y Mdh3 en presencia de Act y se comparó con el nivel de la actividad medida cuando Act no estaba presente. (A) La activación de las MDH con Act de *B. methanolicus* MGA3 se ensayó *in vitro*. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado con 500 mM de alcohol y 5 µg/ml de MDH y proteínas Act. (B) La activación de las MDH con Act de *B. methanolicus* PB1 *in vitro*. Se llevaron los ensayos por triplicado con 500 mM de alcohol y 5 µg/ml de MDH y proteínas Act.

Figura 7: (A) Estrategias de clonación. (B) Mapa físico del plásmido *act*-pHCMC04.

Figura 8: Actividades *in vitro* de cepas recombinantes de *B. subtilis* cuando se ensayan utilizando etanol y metanol como sustratos.

Figura 9: % de masa de la fracción isotopomérica M1 de diferentes metabolitos antes (es decir, el momento cero) y después (es decir en puntos de tiempo de 30 y 90 minutos) de la adición de ¹³C-metanol. Las tres líneas representan los resultados de tres repeticiones biológicas independientes. A: *C. glutamicum* delta ald pEKEX3; B: Cepa de *C. glutamicum* delta ald que expresa Mdh2 (pVWEx1-Mdh2), Hps y Phi (pEKEX3 - Hps + Phi). PEP: fosfoenolpiruvato; 2/3 P: 2- y 3-fosfoglicerato; FBP: fructosa-bis-fosfato; R5P: ribosa-5-fosfato.

Figura 10: Marcado metabólico utilizando ¹³C-metanol o ¹³C-formaldehído como sustrato. (A) Células ΔfrmA que expresan *mdh2* y *hps phi* con ¹³C-metanol como fuente de carbono. (B) Células ΔfrmA que expresan *hps* y *phi* con ¹³C-formaldehído como fuente de carbono.

Figura 11: Construcción del operón sintético. Se introduce cada gen consecutivo en los sitios de restricción SwaI/BglIII. El último gen en el operón contiene el marcador His6. Para los experimentos con marcado por ¹³C (véase el Ejemplo 18) se utilizaron los plásmidos AMAhXB- y AMABGFTPrpe-pHCMC04. RBS: sitio de unión al ribosoma.

Figura 12: SDS-PAGE de las proteínas purificadas expresadas en *B. subtilis* 168. Se utilizaron cepas de *B. subtilis* que contenían una cualquiera de las construcciones que se muestran en la Figura 11. Las proteínas se purificaron utilizando una columna HisTrap y se concentraron utilizando columnas Vivaspin. Las bandas proteicas se indican en cuadros. M: marcador de peso molecular.

Figura 13: % de masa de la fracción isotopomérica M1 de diferentes metabolitos (es decir en el momento cero) y después (es decir, en los puntos de tiempo de 30 y 90 minutos) de la adición de ^{13}C -metanol. Las dos líneas representan los resultados de dos repeticiones biológicas independientes. (A): *B. subtilis* 168 pHCMC04; (B): *B. subtilis* 168 AM3AhxB-pHCMC04; (C): *B. subtilis* 168 AM3ABGFTPrpe-pHCMC04. PEP: fosfoenolpiruvato; 2/3 PG: 2- y 3-fosfoglicerato; FBP: fructosa-bis-fosfato.

5

Ejemplos

Tabla 1: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en el presente estudio

Cepa o plásmido	Descripción	Referencia(s) o fuente
<i>B. methanolicus</i> MGA3	Cepa de tipo silvestre ATCC53907	ATCC
<i>B. methanolicus</i> PB1	Cepa de tipo silvestre ATCC	ATCC
<i>E. coli</i> DH5 α	Huésped de clonación general	Bethesda Research Laboratories
<i>E. coli</i> ER2566	Alberga el gen cromosómico para la T7 ARN polimerasa	New England Biolabs
pHP13	Vector lanzadera de <i>E. coli</i> - <i>B. methanolicus</i> , Cm ^r	(Haima, Bron y col. (1987) Mol Gen Genet 209(2): 335-342; Jakobsen, Benichou y col. (2006) J Bacteriol 188(8): 3063-3072)
pGEM-T	Vector de clonación de <i>E. coli</i> ; Amp ^r	Promega
pLITMUS28	Vector de clonación de <i>E. coli</i> ; Amp ^r	Promega
pET21a	Vector de expresión de <i>E. coli</i> , marcador seis-His, promotor T7, Amp ^r	Novagen
pTMB1	pLITMUS28 con el gen <i>mdh2</i> de MGA3	Este estudio
pTMB2	pLITMUS28 con el gen <i>mdh3</i> de MGA3	Este estudio
pET21a_MGA3- <i>mdh</i>	pET21a con la región codificante <i>mdh</i> de MGA3 bajo el control de T7 y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
pET21a_MGA3- <i>mdh2</i>	pET21a con la región codificante <i>mdh2</i> de MGA3 bajo el control de T7 y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
pET21a_MGA3- <i>mdh3</i>	pET21a con la región codificante <i>mdh3</i> de MGA3 bajo el control de T7 y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
pET21a_MGA3-act	pET21a con la región codificante <i>act</i> de MGA3 bajo el control de T7 y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
pET21a_PB1- <i>mdh</i>	pET21a con la región codificante <i>mdh</i> de PB1 bajo el control de T7 y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
pET21a_PB1- <i>mdh1</i>	pET21a con la región codificante <i>mdh1</i> de PB1 bajo el control de T7 y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
pET21a_PB1- <i>mdh2</i>	pET21a con la región codificante <i>mdh2</i> de PB1 bajo el control de T7 y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
pET21a_PB1-act	pET21a con la región codificante <i>act</i> de PB1 bajo el control de T7 y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
pET21a-nudF	pET21a con la región codificante <i>nudF</i> de <i>B. subtilis</i> bajo el control de T7 y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
<i>B. subtilis</i> 168	Cepa de tipo silvestre 168	Kunst y col. (1997) Nature 390: 249-256

(continuación)

Cepa o plásmido	Descripción	Referencia(s) o fuente
pHB201	Vector lanzadera <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> , Cm ^r , Em ^r	Bron y col. (1998) J Biotech 64: 3-13
pHCMC04	Vector lanzadera <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> , Cm ^r	Nguyen y col. (2005) Plasmid 54: 241-248
act-pHCMC04	pHCMC04 con el gen codificante <i>act</i> de <i>B. methanolicus</i> MGA3 bajo el control del promotor inducible por xilosa y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
<i>mdh</i> -pHCMC04	pHCMC04 con el gen codificante <i>mdh</i> de <i>B. methanolicus</i> MGA3 bajo el control del promotor inducible por xilosa y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
<i>mdh2</i> -pHCMC04	pHCMC04 con el gen codificante <i>mdh2</i> de <i>B. methanolicus</i> MGA3 bajo el control del promotor inducible por xilosa y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
<i>mdh3</i> -pHCMC04	pHCMC04 con el gen codificante <i>mdh3</i> de <i>B. methanolicus</i> MGA3 bajo el control del promotor inducible por xilosa y fusionado al marcador seis-His	Este estudio
<i>Amdh</i> -pHCMC04	pHCMC04 con los genes codificantes <i>act</i> y <i>mdh</i> de <i>B. methanolicus</i> MGA3 bajo el control del promotor inducible por xilosa y <i>mdh</i> fusionado al marcador seis-His	Este estudio
<i>Amdh2</i> -pHCMC04	pHCMC04 con los genes codificantes <i>act</i> y <i>mdh2</i> de <i>B. methanolicus</i> MGA3 bajo el control del promotor inducible por xilosa y <i>mdh2</i> fusionado al marcador seis-His	Este estudio
<i>Amdh3</i> -pHCMC04	pHCMC04 con los genes codificantes <i>act</i> y <i>mdh3</i> de <i>B. methanolicus</i> MGA3 bajo el control del promotor inducible por xilosa y <i>mdh3</i> fusionado al marcador seis-His	Este estudio
Amp ^r , resistencia a la ampicilina; Cm ^r , resistencia a cloranfenicol		

Materiales y procedimientos

Materiales biológicos, modificación de ADN, y condiciones de cultivo

- 5 Las cepas bacterianas y plásmidos que se utilizan en este estudio se han enumerado en la Tabla 1. Se utilizó la *E. coli* DH5 α como un huésped de clonación convencional mientras que se utilizó la *E. coli* ER2566 como huésped para la expresión recombinante de proteínas MDH, Act y NudF. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en general a 37 °C en medio de Luria-Bertani (LB) líquido o sólido (Sambrook (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press) suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) o cloranfenicol (10 μ g/ml) cuando era apropiado. Los procedimientos en *E. coli*
- 10 recombinante se llevaron a cabo como se ha descrito por Sambrook y Russell (2001; Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se llevaron a cabo las PCR utilizando el sistema de PCR Expand High Fidelity (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) y la secuenciación de ADN se llevó a cabo por Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania, www.eurofins-na.com). El aislamiento del ADN total de *B. methanolicus* MGA3 y PB1 y la producción recombinante de proteínas MDH, Act y NudF en *E. coli* ER2566 se llevó a cabo como se había descrito anteriormente (Brautaset y col., (2004) J Bacteriol 186(5): 1229-1238; Brautaset y col., (2010) Appl Microbiol Biotechnol 87(3): 951-964). La
- 15 transformación de *B. methanolicus* MGA3 se llevó a cabo por electroporación Jakobsen y col., (2006) J Bacteriol 188(8): 3063-3072). Las células de *B. methanolicus* se cultivaron a 50 °C en 100 ml de medio MeOH₂₀₀, que contenía 200 mM de metanol, en medio Mann₁₀ que contenía 10 g/litro de manitol, o medio SOBsuc (Jakobsen y col., (2006) J Bacteriol 188(8): 3063-3072), y se añadió cloranfenicol (5 μ g/ml) si era apropiado.

20 Construcción de vectores de expresión

pET21a *mdh*-MGA3, pET21a *mdh2*-MGA3, pET21a *mdh3*-MGA3 y pET21a *act*-MGA3:

Debido a la alta similitud de secuencia entre las regiones codificantes *mdh2* y *mdh3* de MGA3, se diseñaron cebadores para la amplificación por PCR y la clonación concomitante basándose en secuencias únicas que representan las regiones que rodean los genes respectivos, y son los siguientes:

- 5 con16_rev: 5'-AACCATGGATGAGGAGGATGTTTGTATGAC-3' (SEQ ID NO: 13) y
 con18_rev: 5'-AACCATGGCAAACAAAGGGGATGTATGTATG-3' (SEQ ID NO: 14);
 con41_rev: 5'-AGGATCCCCTCCGTTTTGTCGTATTAC-3' (SEQ ID NO: 15) y
 con43_rev: 5'-TGGATCCTCTTCGTCTTTGGCGAATTAC-3' (SEQ ID NO: 16).

10 Se digirieron los respectivos fragmentos de ADN con NcoI + BamHI (los sitios de reconocimiento están subrayados en las secuencias de cebador), y se ligaron en los sitios correspondientes de pLITMUS28 resultando en el plásmido, pTMB1 que alberga *mdh2* y pTMB2 que alberga *mdh3*. Los genes de MDH clonados en ambos plásmidos se secuenciaron entonces. A continuación, las regiones codificantes de *mdh* y *act* se amplificaron por PCR a partir del ADN total de *B. methanolicus* MGA3, y las regiones codificantes de *mdh2* y *mdh3* se amplificaron por PCR a partir de los plásmidos pTMB1 y pTMB2, respectivamente, utilizando los pares de cebadores de PCR siguientes:

- 15 *mdh_fwd*-MGA3: 5'-CATATGACAACAACTTTTTTCATTCC-3' (SEQ ID NO: 17) y
mdh_rev-MGA3: 5'-CTCGAGCATAGCGTTTTTGTATGATTTGTG-3' (SEQ ID NO: 18);
mdh2_fwd-MGA3: 5'-CATATGACAACACTCAAAGTGC-3' (SEQ ID NO: 19) y
mdh2_rev-MGA3: 5'-CTCGAGCATCGCATTTTTAATAATTTGG-3' (SEQ ID NO: 20);
mdh3_fwd-MGA3: 5'-CATATGAAAAACTCAAAGTGCATTTTAC-3' (SEQ ID NO: 21) y
mdh_rev-MGA3: 5'-CTCGAGCATAGCGTTTTTGTATGATTTGTG-3' (SEQ ID NO: 22);
 20 *act_fwd*-MGA3: 5'-AAACATATGGGAAAATTATTTGAGG-3' (SEQ ID NO: 23) y
act_rev-MGA3: 5'-AACTCGAGTTTATTTTTGAGAGCCTCTTG-3' (SEQ ID NO: 24);

25 Se subrayan en los cebadores directos e inversos los sitios de restricción para NdeI y XhoI, respectivamente. Los productos de la PCR resultantes *mdh*-MGA3 (1149 pb), *mdh2*-MGA3 (1163 pb), *mdh3*-MGA3 (1165 pb) y *act*-MGA3 (570 pb) se unieron A/T directamente en el vector de clonación general pGEM-T, y las inserciones clonadas respectivas se verificaron por secuenciación de ADN. Los vectores resultantes se digirieron entonces con XhoI y NdeI y las inserciones se ligaron en los sitios correspondientes en fase con la secuencia del marcador de seis-His del plásmido pET21a para dar lugar a los plásmidos pET21a_*mdh*-MGA3, pET21a_*mdh2*-MGA3, pET21a_*mdh3*-MGA3, y pET21a_*act*-MGA3, respectivamente.

pET21a_mdh-PB1, pET21a_mdh1-PB1, pET21a_mdh2-PB1, y pET21a_act-PB1:

30 Las regiones codificantes de los genes *mdh*-PB1, *mdh1*-PB1 y *mdh2*-PB1 se amplificaron por PCR a partir del ADN total de PB1 utilizando los siguientes pares de cebadores:

- 35 *mdh_fwd*-PB1: 5'-ATACATATGACGCAAAGAACTTTTTTCATTCC-3' (SEQ ID NO: 25) y
mdh_rev-PB1: 5'-ATACTCGAGCAGAGCGTTTTTGTATGATTTG-3' (SEQ ID NO: 26);
mdh1_fwd-PB1: 5'-ATACATATGACTAAAACAAAATTTTTTCATTCC-3' (SEQ ID NO: 27) y
mdh_rev-PB1 (véase anteriormente);
mdh2_fwd-PB1: 5'-ATACATATGACAACACTCAAAGTATATTTTAC-3' (SEQ ID NO: 28) y
mdh2_rev-PB1: 5'-ATACTCGAGCATAGCATTTTTTAATAATTTGTATAAC-3' (SEQ ID NO: 29)

40 Los tres productos de la PCR resultante *mdh*-PB1 (1164 pb), *mdh1*-PB1 (1164 pb) y *mdh2*-PB1 (1170 pb) se ligaron A/T en el plásmido pGEM-T. Los plásmidos resultantes se digirieron con XhoI y NdeI (los sitios de restricción están subrayados en los cebadores) y se ligaron en los sitios correspondientes del plásmido pET21a, dando lugar a los plásmidos pET21a_*mdh*-PB1, pET21a_*mdh1*-PB1, y pET21a_*mdh2*-PB1, respectivamente. La región codificante *act*-PB1 se amplificó a partir del ADN total de PB1 utilizando el par de cebadores:

- act_frw*-PB1: 5'-TTTTCATATGGGAAAATTATTTGAGGAAA-3' (SEQ ID NO: 30) y
act_rev-PB1: 5'-TTTTCTCGAGTTTATTTTTGAGAGCCTCTTG-3' (SEQ ID NO: 31).

45 El producto de la PCR *act*-PB1 se digirió con NdeI y XhoI (los sitios de restricción están subrayados en los cebadores) y se ligaron en los sitios correspondientes del pET21a, dando como resultado el plásmido pET21a_*act*-PB1.

pET21a_nudF:

50 La región codificante *nudF* se amplificó por PCR a partir del ADN total de *B. subtilis* utilizando el siguiente par de cebadores:

- nudF*-fwd: 5'-TTTTCATATGAAATCATTAGAAGAAAAACAATTG-3' (SEQ ID NO: 32) y
nudF-rev: 5'-TTTTCTCGAGTTTTTGTGCTTGGAGCGCTT-3' (SEQ ID NO: 33).

El producto de la PCR resultante (572 pb) se ligó A/T en el pGEM-T y la inserción clonada se verificó por secuenciación de ADN. El vector resultante se digirió con XhoI y NdeI (los sitios de restricción están subrayados en

los cebadores) y la inserción se ligó en los sitios correspondientes de pET21a, dando como resultado el plásmido pET21a_nudF.

Todos los vectores construidos se transformaron en el huésped de expresión *E. coli* ER2566.

Purificación por afinidad de las proteínas recombinantes

5 Las seis proteínas MDH diferentes, dos proteínas Act diferentes y NudF se purificaron de los extractos celulares de las cepas respectivas de *E. coli* ER2566 recombinantes utilizando cromatografía de afinidad, esencialmente como se había descrito anteriormente (Brautaset y col., (2010) Appl Microbiol Biotechnol 87(3): 951-964). Las concentraciones de proteínas se estimaron espectrofotométricamente en un espectrofotómetro NanoDrop, (Nano Drop Technologies, Wilmington, Delaware) con los ajustes de peso molecular y coeficiente de extinción calculados para las proteínas MDH, Act y NudF (datos no mostrados) utilizando la herramienta ExPASy Prot Param (expasy.org/tools/protparam.html) (Gasteiger y col. (2003) Nucleic Acids Res. 31(13): 3784-3788). La pureza de las proteínas purificadas se analizó por electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) (Sambrook y Russel, (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press), seguido por la inspección visual de las imágenes resultantes. Las proteínas purificadas se congelaron instantáneamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se descongelaban sobre hielo y se utilizaban en los análisis bioquímicos.

Ensayos enzimáticos

Se midieron las actividades alcohol deshidrogenasa espectrométricamente esencialmente como se había descrito anteriormente (Hektor, Kloosterman y col. (2002) Chem 277(49): 46966-46973) y la mezcla de reacción contenía: 100 mM de Glicina-KOH pH 9,5 (a menos de que se establezca otra cosa), 5 mM de MgSO₄, 0,5 mM de NAD⁺ y 500 mM de alcohol (metanol, etanol, propanol, 1,3-propanodiol, o butanol). El NAD⁺ se sustituyó con concentraciones iguales de NADP⁺, FMN⁺, y FAD⁺, cuando estaba indicado. La mezcla de reacción para las mediciones de actividad formaldehído reductasa contenía: 50 mM de tampón de fosfato potásico pH = 6,7, 0,15 mM de NADH, 1 mM de DTT y 11,6 mM (0,1-116 mM) de formaldehído. Los componentes del ensayo se mezclaron en la cubeta y se precalentaron a 45 °C, a menos de que se establezca otra cosa. Las reacciones se iniciaron por la adición de 5-40 µg de proteínas MDH purificadas, y se controló la producción de NADH a 340 nm durante 4 minutos. Una unidad de actividad MDH se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un mmol de NADH por minuto en las condiciones descritas anteriormente. Se añadieron proteínas Act purificadas (0,1-40 µg) o NudF (20 µg) a las mezclas de reacción como se indica en el texto.

Caracterización bioquímica *in vitro* de enzimas purificadas

30 Las proteínas MDH y Act purificadas (20 µg) se utilizaron en los experimentos cinéticos llevando a cabo los ensayos de metanol deshidrogenasa y formaldehído deshidrogenasa esencialmente como se ha descrito anteriormente. Para la determinación de la K_m para el metanol (K_{mMeOH}) y la V_{máx}, se mantuvo la concentración de NAD⁺ a un nivel de saturación (0,5 mM o 0,15 mM), mientras que la concentración de metanol variaba (0,1- 2000 mM). Para la determinación de la K_m para NAD⁺ (K_{mNAD+}) y V_{máx}, la concentración de metanol se mantuvo constante a un nivel de saturación (500 mM), mientras que la concentración de NAD⁺ variaba (5-1000 µM). Para la determinación de K_m para el formaldehído K_{mFA}) y V_{máx}, la concentración de NADH se mantuvo a nivel de saturación (0,5 mM o 0,15 mM), mientras que la concentración de formaldehído variaba desde (0,1-40 mM). Se añadía Act (20 µg) a las mezclas de reacción para la determinación de los valores de K_m, MeOH y V_{máx} en presencia de este activador, como se indica en el texto. En general la pendiente de actividad frente al tiempo era lineal en el periodo medido (datos no mostrados).

40 Los valores de K_m y V_{máx} se calcularon utilizando una regresión no lineal con la herramienta Excel solver de Microsoft para fijar los datos medidos a la ecuación de Michaelis-Menten, como se había descrito previamente (Jakobsen y col., (2009) Appl Environ Microbiol 75(3): 652-661). Los valores obtenidos de la regresión se compararon entonces con los valores obtenidos por lo gráficos de Lineweaver-Burk y Hanes-Woolf para asegurar que se había encontrado el mínimo global, no un mínimo local.

45 Aislamiento de ARN total, síntesis de ADNc y PCR en tiempo real

Los experimentos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo esencialmente como se había descrito previamente (Brautaset y col., (2010) Appl Microbiol Biotechnol 87(3): 951-964). Se aisló el ARN total de células de MGA3 y PB1 cultivadas en crecimiento exponencial (DO₆₀₀ = 1,0) con manitol o metanol como única fuente de carbono, utilizando el kit RNAqueous (Ambion). La concentración de ARN se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop (Nano Drop Technologies, Wilmington, Delaware), y la integridad del ARN total se evaluó con un Bioanizador 2100 Agilent y el kit RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). El ADNc se sintetizó a partir del ARN total aislado utilizando un kit de síntesis de primera cadena de ADNc (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se utilizaron como matrices para los experimentos de PCR en tiempo real. Los análisis de PCR en tiempo real se llevaron a cabo utilizando el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM 7700 con sus ajustes por defecto (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los cebadores de la PCR utilizados se escogieron con la ayuda del software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) y eran los siguientes:

mdh-MGA3 fwd: 5'- ATTCCACCAGCCAGCGTAAT-3' (SEQ ID NO: 34) y
mdh-MGA3 rev: 5'- CTTAGCTCCAATTTGCTTAAGTCTTG-3' (SEQ ID NO: 35);

mdh2-MGA3 fwd: 5'-GGATACATGTCAAACACTCAAAGTGC-3' (SEQ ID NO: 36) y
mdh2-MGA3 rev: 5'- TCTAGACACCATCGCATTITTTAATAATTTGG-3' (SEQ ID NO: 37);
mdh3-MGA3 fwd: 5'- GGATACATGTAAAACACTCAAAGTGC-3' (SEQ ID NO: 38) y
mdh3-MGA3 rev: 5'- TCTAGACACCATAGCATTITTTAATAATTTGGATG-3' (SEQ ID NO: 39);
5 *mdh*-PB1 fwd: 5'-TCCACCAGCTAGCGTAATTGG-3' (SEQ ID NO: 40) y
mdh-PB1 rev: 5'-AACCTGTGCCATGAAGAAATGC-3' (SEQ ID NO: 41);
mdh1-PB1 fwd: 5'-TCCATCATCCACTGTATTTGG-3' (SEQ ID NO: 42) y
mdh1-PB1 rev: 5'-ACCTGTGCTGTGAAGGAATGC-3' (SEQ ID NO: 43);
10 *mdh2*-PB1 fwd: 5'-CGTGAAGCTGGTGTGGAAGTATT-3' (SEQ ID NO: 44) y
mdh2-PB1 rev: 5'-TCCAAACCTTCTGCGACGTT-3' (SEQ ID NO: 45).

Con respecto a la cuantificación de los genes en cuestión se llevó a cabo normalizando los resultados, con respecto a ARN 16s (control endógeno) y una muestra de calibración, utilizando un procedimiento Ct comparativo (procedimiento 2- $\Delta\Delta$ Ct) como se había descrito previamente (Heid, Stevens y col. (1996) *Genome Res* 6(10): 986-994; Jakobsen, Benichou y col. (2006) *J Bacteriol* 188(8): 3063-3072; Brautaset, Jakobsen y col. (2010) *Appl Microbiol Biotechnol* 87(3): 951-964). Las diferencias relativas en los niveles de transcripción de los tres genes se determinaron calculando los valores de Δ CT que se dan de la siguiente manera: *mdh2* (Ct *mdh2*- Ct *mdh*) y el valor Δ CT de *mdh3* (Ct *mdh3*-Ct *mdh*). La eficacia del cebador de los tres genes se ensayó antes de llevarse a cabo los otros experimentos.

Modelo en 3D de las proteínas MDH deducidas

20 Se hicieron modelos estructurales de proteínas Mdh y Mdh2 de MGA3 utilizando el servidor de modelo-homología estructural proteica totalmente automático SWISS-MODELO (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Peitsch (1995) *Bio-Technology* 13(7): 658-660; Arnold, Bordoli y col. (2006) *Bioinformatics* 22(2): 195-201; Kiefer, Arnold y col. (2009) *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D387-392). Debido a la alta homología entre las estructuras primarias deducidas de las proteínas Mdh2 y Mdh3 de MGA3, no se realizó ninguna búsqueda de modelo para Mdh3. Las búsquedas blast con huecos (Altschul y col (1997) *J Mol Biol* 215(3): 403-410; Schäffer y col. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(14): 2994-3005) daban como resultado 9 éxitos de matriz comunes con valores de E que variaban de $1 \cdot e^{-98}$ (pdb: 3bfj, 1,3-propanodiol oxidorreductasa) a $1 \cdot e^{-17}$ (pdb: 1oj7, *E. coli* K12 YQHD) para Mdh y desde $1 \cdot e^{-112}$ (pdb: 3bfj) hasta $2 \cdot e^{-14}$ (pdb: 1oj7) para Mdh2. Los alineamientos 3D de los archivos de matriz utilizando vista Deep/visor Swiss pdb (Guex y Peitsch (1997) *Electrophoresis* 18(15): 2714-2723) mostraban que tenían todas plegamientos muy similares y los modelos estructurales basados en la matriz 3 bfj, que tenía la mayor puntuación de similitud de aminoácidos tanto para Mdh y Mdh2, se escogieron para representar Mdh y Mdh2. La vista Deep/visor Swiss pdb también se utilizó para visualizar los modelos estructurales de las MDH.

Ejemplo 1: Organización genética de metanol deshidrogenasas y genes activadores de proteínas en las cepas de *B. methanolicus* de tipo silvestre MGA3 y PB1

35 La exploración *in silico* de la secuencia genómica del *B. methanolicus* MGA3 (Heggeset y col., 2011) identificó *mdh* codificada por el plásmido pBM19, denotado en el presente documento como *mdh*-MGA3, y dos más supuestos genes codificantes de MDH en el genoma de MGA3, denotados en el presente documento como *mdh2*-MGA3 y *mdh3*-MGA3, localizados a distancia en el cromosoma. Las secuencias codificantes *mdh2*-MGA3 y *mdh3*-MGA3 eran un 96 % idénticas entre ellas y un 65 % y 66 % idénticas, respectivamente a la secuencia codificante *mdh*-MGA3. El alineamiento de las secuencias primarias de los polipéptidos deducidos Mdh2-MGA3 y Mdh3-MGA3 revelaban que eran un 96 % idénticas entre ellas, y un 61 % y 62 % idénticas, respectivamente, a Mdh-MGA3 (Figura 2).

45 Los inventores han obtenido resultados de fermentación semi-continua en metanol que demuestran que las dos cepas de *B. methanolicus* de tipo silvestre MGA3 y PB1 son sustancialmente diferentes con respecto a las propiedades metilotróficas. La inspección de la secuencia genómica de PB1 confirma la presencia de tres genes que codifican MDH diferentes y un gen *act*, análogo a MGA3. El gen *mdh*-PB1 que se localiza en el plásmido pBM20 era un 92 % idéntico al gen *mdh*-MGA3 de la MGA3 y los productos genéticos respectivos presentaban un 93 % de identidad de secuencia primaria (Figura 2). Al contrario que con MGA3, las secuencias de los dos genes cromosómicos de PB1, denotados como *mdh1*-PB1 y *mdh2*-PB1, no eran muy similares. El gen *mdh1*-PB1 codifica una supuesta proteína Mdh1 con un 92 % de identidad de secuencia primaria con la Proteína Mdh de MGA3 mientras que el *mdh2*-PB1 codifica una supuesta proteína Mdh2 con un 91 % y 92 % de identidad de secuencia primaria respecto a las proteínas Mdh2 y Mdh3 de MGA3, respectivamente. Basándose en estos análisis de secuencia, parece como si MGA3 y PB1 posean dos subtipos de genes codificantes de MDH; el tipo "*mdh/mdh1*" y el tipo "*mdh2/mdh3*". La cepa MGA3 tiene solo un gen tipo *mdh/mdh1* (pBM19) y dos genes tipo *mdh2/mdh3* (cromosoma), mientras que la cepa PB1 tiene dos genes tipo *mdh/mdh1* (pBM20 y cromosoma) y un gen tipo *mdh/mdh3* (cromosoma). El impacto biológico de estas diferentes se investigó adicionalmente posteriormente.

Ejemplo 2: El modelo 3D indica que las MDH de *B. methanolicus* pertenecen a la súper-familia de alcohol deshidrogenasas dependientes de Fe-NAD tipo III.

Las secuencias primarias de Mdh, Mdh2 y Mdh3 de MGA3 se sometieron a comparaciones de secuencia con las proteínas de las bases de datos utilizando BLAST (Altschul, Gish y col. (1990) J Mol Biol 215(3): 403-410), indicando que presumiblemente pertenecen a las alcohol deshidrogenasas tipo III (ADH) (de Vries, Arfman y col. (1992) J Bacteriol 174(16): 5346-5353), que es una superfamilia de ADH que contienen hierro. La homóloga más cercana de las MDH con una estructura 3D conocida era la 1,3-propanodiol deshidrogenasa de *Klebsiella pneumoniae* (PDB ID: 3BFJ, que presentaba una identidad de secuencia primaria con Mdh y un 52 % de identidad de secuencia primaria con Mdh2 y Mdh3. Esta 1,3-propanodiol deshidrogenasa es una alcohol deshidrogenasa dependiente de Fe-NAD tipo III que cataliza la conversión de 3-hidroxi-propanal a 1,3-propanodiol (1,3-PD). La estructura de la MDH de *B. methanolicus* C1 se había analizado previamente por microscopía electrónica y se concluyó que era un decámero en el que las 10 subunidades se organizaban en dos anillos de 5 (Vonck, Arfman y col. (1991) J Biol Chem 266(6): 3949-3954). De manera interesante, se ha demostrado experimentalmente recientemente que la 1,3-PD deshidrogenasa tiene una estructura cuaternaria similar. Basándose en esto, los inventores decidieron utilizar la información de la estructura 3D resuelta de la 1,3-PD deshidrogenasa para predecir la estructura 3D de la Mdh de *B. methanolicus* MGA3, para aprender más acerca de los sitios catalíticos activos de la alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD. La secuencia primaria de aminoácidos de Mdh de MGA3 se envió a Swissmodel, y se construyó un modelo. Los monómeros de 1,3-PD deshidrogenasa se plegaban en dos dominios estructurales que están separadas por una hendidura. El dominio del extremo N contiene el sitio de unión del cofactor NAD⁺ y el dominio del extremo C incluye los restos implicados en la unión al hierro. También está presente un motivo conservado GGGSX2DX2K implicado en la unión al cofactor NAD⁺ se encontraba en la región del extremo N de MDH de *B. methanolicus* C1. Este motivo también está presente en Mdh de *B. methanolicus* MGA3, en la posición 95-104 y también se encuentra en la región del extremo N de la 1,3-PD deshidrogenasa de *K. pneumoniae*. La región 258-290 de MDH de *B. methanolicus* C1 contenía varios restos His, y por lo tanto se predijo que estaba implicada en la unión al metal. Esto está de acuerdo con los hallazgos en la 1,3-PD de *K. pneumoniae*, donde se encontraron 4 restos responsables de la coordinación de la posición del metal de hierro. Estos restos están conservados y se corresponden con los restos Asp193, His197, His262 y His276 en la Mdh de *B. methanolicus* MGA3, y son los más probable los responsables de la unión al zinc en esta enzima. En conclusión, estos datos indican que las MDH de *B. methanolicus* pertenecen a las alcohol deshidrogenasas dependientes de NAD-Fe tipo III, lo que estaba apoyado por los resultados experimentales proporcionados en el presente estudio (véase posteriormente).

Ejemplo 3: Las proteínas MDH purificadas de MGA3 y PB1 presentan una actividad MDH dependiente de NAD *in vitro*

Las regiones codificantes *mdh*-MGA3, *mdh2*-MGA3, *mdh3*-MGA3, *mdh*-PB1, *mdh1*-PB1, y *mdh2*-PB1 se amplificaron por PCR y se clonaron en el vector de *E. coli* pET21a, dando como resultado los plásmidos de expresión pET21a_*mdh*-MGA3, pET21a_*mdh2*-MGA3, pET21a_*mdh3*-MGA3, pET21a_*mdh*-PB1, pET21a_*mdh1*-PB1, y pET21a_*mdh2*-PB1, respectivamente. En los vectores resultantes los genes recombinantes se transcriben a partir del fuerte promotor T7, y se fusionan en fase con una secuencia codificante de un marcador 6-His en sus extremos 3' para simplificar la purificación. Los genes *act* de MGA3 y PB1 y el gen *nudF* de *B. subtilis* análogo se clonaron de manera similar en el pET21a, dando como resultado los plásmidos pET21a_*act*-MGA, pET21a_*act*-PB1 y pET21a-*nudF*, respectivamente (Tabla 1). Todos los vectores de expresión construidos se transformaron en *E. coli* ER2566, y las cepas recombinantes resultantes se cultivaron en matraces con agitado para la producción de las proteínas recombinantes respectivas. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad hasta un 95 % de pureza como se comprobó por SDS-PAGE (datos no mostrados), y las proteínas Act y NudF se almacenaron para su uso posterior (véase posteriormente).

Las seis proteínas MDH purificadas se ensayaron entonces utilizando metanol como sustrato y los resultados demostraban que eran catalíticamente activas (véase la Figura 3). Para descartar si estas proteínas podían utilizar cofactores alternativos, se repitieron los ensayos sustituyendo el NAD⁺ por FAD⁺, FMN⁺ y NADP⁺. En todos los casos no se detectó actividad catalítica (datos no mostrados), confirmando que no podía utilizarse ninguno de estos co-factores alternativos por parte de las MDH en estas condiciones. Estos resultados demostraban que tanto la cepa MGA3 como PB1 de *B. methanolicus* tienen tres genes diferentes, uno localizado en un plásmido y dos localizados en el cromosoma, que codifican MDH activas dependientes de NAD.

Ejemplo 4: Todas las MDH tienen especificidades de sustrato amplias y diferentes preferencias de alcoholes *in vitro*

Las proteínas MDH purificadas se ensayaron en cuanto a las actividades catalíticas utilizando distintos alcoholes alternativos, y todas las enzimas presentaban actividad sobre etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isopropanol, y 1,3-propanodiol como sustratos (Figura 3). Sorprendentemente, las actividades catalíticas relativas en la mayoría de estos sustratos alternativos eran sustancialmente mayores que en el metanol para las seis MDH. Las actividades catalíticas relativas en cada alcohol diferente variaban sustancialmente entre las tres MDH, indicando preferencias de sustrato diferentes entre estas proteínas. Por ejemplo, Las actividades de las enzimas Mdh3-MGA3 y la Mdh2-PB1 con propanol eran aproximadamente 25 a 35 veces mayores que su actividad sobre el metanol. De

manera interesante, estas dos enzimas presentaban una actividad catalítica significativamente más alta que el resto de las enzimas en todos estos sustratos, en las condiciones ensayadas. Las seis enzimas también presentaban actividades formaldehído y acetaldehído reductasa, que se investigó adicionalmente posteriormente. Basándose en estos datos, se hizo un intento para clasificar estas proteínas como ADH más que como MDH, capaces de catalizar la conversión de un amplio intervalo de diferentes alcoholes primarios y secundarios en aldehídos y cetonas.

Ejemplo 5: Las proteínas MDH presentaban un pH y temperatura óptimos similares *in vitro*

Con el fin de establecer unas condiciones de ensayo fiables para las caracterizaciones bioquímicas comparativas, las seis proteínas MDH se analizaron en cuanto al pH y temperatura óptimos. Debido a las actividades catalíticas mucho más altas sobre el etanol en comparación con el metanol (véase la Figura 3), se llevaron a cabo estos experimentos con etanol como sustrato para aumentar la sensibilidad de los datos. Se había informado anteriormente que la proteína Mdh de la cepa C1 de *B. methanolicus* tenía un pH óptimo de 9,5 (Kloosterman, Vrijbloed y col. (2002) J Biol Chem 277(38): 34785-34792), y las seis MDH purificadas (20 µg) se ensayaron por lo tanto en cuanto a su actividad a pH que variaban entre 8,5 y 10,5. Todas las enzimas presentaban la mayor actividad catalítica a pH entre 9,5 y 10 (datos no mostrados). A continuación, se ensayaron las MDH a pH 9,5 en cuanto a su actividad a temperaturas que variaban desde 25 °C a 50 °C, y los resultados demostraban que todas tenían una temperatura óptima entre 45 °C y 50 °C (Figura 4). Basándose en estos datos todos los ensayos de MDH posteriores se llevaron a cabo a un pH de 9,5 y 45 °C.

Ejemplo 6: Mdh3-MGA3 y Mdh2-PB1 presentan la estabilidad de temperatura más amplia en comparación con el resto de MDH *in vitro*

La estabilidad térmica de las seis MDH se ensayó mediante la pre-incubación de las proteínas a 45 °C y 60 °C y se tomaron muestras en diferentes momentos para los ensayos enzimáticos. Como se esperaba, todas las enzimas mantenían esencialmente toda la actividad catalítica con pre-incubaciones a 45 °C (Figura 5). Las actividades catalíticas de Mdh-MGA3, Mdh2-MGA3, Mdh-PB1 y Mdh1-PB1 estaban fuertemente reducidas (hasta un 90 %) con pre-incubaciones a 60 °C durante 6 minutos aunque este tratamiento tenía presumiblemente solo efectos negativos moderados en las actividades catalíticas de Mdh-MGA3 y Mdh2-PB1 (Figura 5). Una selección de los experimentos se repitió en presencia de cantidades iguales de Act purificada, y no tenía efecto sobre la estabilidad a la temperatura para ninguna de las MDH (datos no mostrados).

Ejemplo 7: Las seis proteínas MDH se estimulan catalíticamente por Act *in vitro*

Tanto las secuencias genómicas de MGA3 como de PB1 solo tenían un gen *act* posicionado en el cromosoma similar al gen *act* clonado previamente de MGA3 (Brautaset, Jakobsen y col. (2004) J Bacteriol 186(5): 1229-1238). Por lo tanto, era de interés investigar si las respectivas proteínas Act podían estimular la actividad catalítica de las proteínas MDH *in vitro*. Para establecer condiciones fiables, primero se ensayó la Mdh-MGA3 junto con Act-MGA3 a concentraciones relativas diferentes de las proteínas (1:2 – 20:1), y utilizando el metanol como sustrato. Se alcanzó la activación completa a una concentración relativa de entre 1:1 y 5:1 y no se observó ninguna inhibición debido a las concentraciones relativamente altas de activador (datos no mostrados). Para los ensayos adicionales, se utilizaron siempre las mismas concentraciones de MDH y Act (1:1). A continuación, se llevaron a cabo ensayos similares con las seis MDH utilizando metanol como sustrato y los datos demostraban que la actividad de MDH se inducían 5 a 7 veces más para las MDH de MGA3 (Figura 6A) y 4 a 10 veces más para las MDH de PB1 (Figura 6B), en presencia de Act.

Los inventores entonces llevaron a cabo análisis similares pero utilizando etanol como sustrato y los resultados demostraban que las actividades catalíticas estaban aumentadas 6 a 8 veces para las MDH de MGA3 (Figura 6B) y 2 a 6 veces para las MDH de PB1 (Figura 6B), en presencia de Act. De manera interesante cuando se utiliza el formaldehído o acetaldehído como sustratos, la presencia de Act o producía una estimulación significativa de actividades catalíticas para ninguna de las MDH (datos no mostrados). Por lo tanto, la Act aumenta la relación de actividad deshidrogenasa respecto a la reductasa en las seis proteínas MDH *in vitro*.

Ejemplo 8: La Mdh también puede estimularse catalíticamente por la proteína NudF de *B. subtilis* *in vitro*

Los genes de la Nudix hidrolasa se encontraban dispersos en los genomas bacterianos y el gen *act* de *B. methanolicus* es el único miembro de esta familia que se sabe que codifica una proteína reguladora. El producto del gen *nudF* de *B. subtilis*, NudF, presenta un 33 % de identidad de secuencia primaria total con Act y se ha verificado experimentalmente que la Nudf pertenece a la subfamilia de la ADP-ribosa pirofosfatasa. NudF y Act son idénticas en los restos documentados como importantes para la unión al inhibidor y/o sustrato, unión metálica y el sitio catalítico. Se investigó si la NudF podía sustituirse por Act en la activación de las MDH de *B. methanolicus* *in vitro*. Se cultivó la cepa recombinante ER2566 de *E. coli* (pET-21a-nudF) para la producción recombinante y la purificación concomitante de NudF. Se escogió la Mdh-MGA3 como proteína modelo y se ensayó junto con NudF utilizando etanol como sustrato, como se ha descrito anteriormente, y los resultados demostraron claramente que la actividad de Mdh se estimulaba igualmente bien (aproximadamente 8 veces) con NudF que con Act en estas condiciones (Datos no mostrados). Estos resultados muestran en primer lugar que una hidrolasa Nudix heteróloga pueden funcionar como una proteína activadora, y esto también debería tener un impacto en el entendimiento actual del

papel biológico de las distintas clases de proteínas.

Ejemplo 9: Las MDH tienen $V_{m\acute{a}x}$ y K_{mMeOH} similares *in vitro* en ausencia de Act

Las MDH se sometieron a caracterizaciones cinéticas para determinar los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y valores de K_m , y para obtener los datos biológicamente relevantes de estos experimentos se llevaron a cabo utilizando metanol como sustrato. Las tres proteínas MDH se ensayaron en cuanto a tasas de reacción iniciales en condiciones de ensayo optimizadas como se ha descrito anteriormente y con concentraciones variables de metanol (véase Materiales y procedimientos), y los datos demostraban que presentaban cinéticas de Michaelis-Menten similares y no lineales. Estos resultados están de acuerdo con la caracterización bioquímicamente análoga de MDH de *B. methanolicus* C1 (Hektor, Kloosterman y col. (2002) Chem 277(49): 46966-46973; Kloosterman, Vrijbloed y col. (2002) J Biol Chem 277(38): 34785-34792). Ellos proponían que la MDH en estado no activado presenta un mecanismo de reacción tipo Ping-pong en el que el cofactor activo redox funciona como un depósito de electrones temporal, mientras que la MDH en estado activado cataliza una reacción independiente de cofactor que presenta un mecanismo de reacción de complejo ternario. Los valores K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se calculaban utilizando regresión no lineal utilizando la herramienta solver de Microsoft Excel para fijar los datos medidos a la ecuación de Michaelis-Menten. Los valores de K_m para el metanol eran similares y entre 150 mM y 250 mM para las MDH de MGA3 y entre 160 mM y 220 mM para las MDH de PB1. Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ correspondientes estaban entre 0,04 U/mg y 0,09 U/mg para las MDH de MGA3 y estaban entre 0,013 y 0,065 U/mg para las MDH de PB1 (Tabla 2). En conjunto, estos datos indicaban que las constantes cinéticas para las seis MDH eran relativamente similares en las condiciones ensayadas. Los inventores también escogieron para el ensayo las tres MDH de MGA3 para las tasas de reacción inicial con concentraciones de NAD⁺ variables, demostrando que presentaban cinéticas de Michaelis-Menten lineales (datos no mostrados). A partir del ajuste no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten, se determinó que los valores de K_{mNAD^+} estaban entre 14 μ M y 40 μ M (Tabla 2).

Tabla 2: Constantes cinéticas *in vitro* de MDH de *B. methanolicus* purificadas en presencia y ausencia de Act. Los ensayos se llevaron a cabo a 45 °C y a un pH de 9,5.

MGA3:						
Sustratos variables	Mdh		Mdh2		Mdh3	
	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)
Metanol	200	0,08	150	0,04	250	0,09
NAD ⁺	14 μ M		22 μ M			40 μ M
Metanol + Act	12	0,5	200	0,15	150	0,45
Formaldehído	1	1,4	5	1,5	15	5
PB1:						
Sustratos variables	Mdh		Mdh1		Mdh2	
	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)
Metanol NAD ⁺	220	0,03	168	0,013	164	0,065
Metanol + Act	13,9	0,2	2,3	0,056	36	0,24
Formaldehído	2,5	0,45	11,5	0,53	1,3	1,12

Ejemplo 10: Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ para las MDH están aumentadas 4 a 6 veces en presencia de Act

Se llevaron a cabo entonces experimentos cinéticos utilizando concentraciones iguales de MDH y Act en las mezclas de reacción (20 μ g de MDH + 20 μ g de Act). Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ estaban aumentados 4-6 veces en comparación con los ensayos enzimáticos sencillos (Tabla 2) confirmando que las actividades catalíticas de las seis MDH están estimuladas por Act. Estos datos están de acuerdo con los que se presentan en la Figura 6.

Ejemplo 11: Los valores de $K_{m,MeOH}$ para Mdh-MGA3, Mdh-PB1 y Mdh1-PB1 están sustancialmente reducidos (hasta 70 veces) en presencia de Act

De manera interesante, la $K_{m,MeOH}$ estaba reducida drásticamente (17 veces) a 12 mM para Mdh-MGA3 cuando se añadía Act a la reacción, mientras que los correspondientes valores de $K_{m,MeOH}$ para Mdh2-MGA3 y Mdh3-MGA3 permanecían esencialmente iguales que cuando se ensayaban sin Act. Para las tres enzimas de PB1 esto era diferente. Para Mdh-PB1 y Mdh1-PB1 los valores de K_m MeOH estaban sustancialmente reducidos (16 veces y 70 veces, respectivamente) en presencia de Act, y este valor estaba moderadamente reducido (4 veces) por Act para Mdh2-PB1 (Tabla 2). De manera interesante, las proteínas Mdh-MGA3, Mdh-PB1 y Mdh1-PB1 fueron enumeradas por los inventores en un subgrupo de MDH basándose en los alineamientos de secuencia (véase anteriormente), y el impacto biológico de estos hallazgos se expone (véase posteriormente).

Ejemplo 12: Las MDH en general tienen valores de $V_{\text{máx}}$ mayores y valores de K_m menores para el formaldehído en comparación con el metanol

La significación biológica de MDH para la oxidación del metanol durante el crecimiento metilotrófico no es ambigua, mientras que el papel biológico de esta enzima como un sistema de detoxicación del formaldehído en las células que consumen metanol está menos investigado. Se demostró aquí que todas las enzimas presentaban ambas actividades formaldehído y acetaldehído reductasa (véase anteriormente), y los inventores escogieron para caracterizar esta propiedad cinéticamente. Utilizando el formaldehído como sustrato los valores de K_m son 1 mM, 5 mM y 15 mM y los valores correspondientes de $V_{\text{máx}}$ eran 1,4 U/mg, 1,5 U/mg y 5 U/mg para las proteínas Mdh, Mdh2 y Mdh3 de MGA3, respectivamente (Tabla 2). Para las proteínas de PB1 los valores de K_m para el formaldehído eran 2,5 mM, 4 mM y 1,3 mM, respectivamente, y los valores de $V_{\text{máx}}$ correspondientes eran 0,45 U/mg, 0,53 U/mg y 1,12 U/mg, respectivamente. En conjunto estos resultados muestran que las seis MDH en general tienen una afinidad mayor y una $V_{\text{máx}}$ mayor cuando el formaldehído es el sustrato, en comparación con cuando el metanol es el sustrato.

Ejemplo 13: Los tres genes *mdh* se transcriben a diferentes niveles en células de *B. methanolicus* en crecimiento exponencial

Se había demostrado previamente que la transcripción de *mdh*-MGA3 es presumiblemente muy alta en las células de *B. methanolicus* y ligeramente regulada positivamente (aproximadamente 3 veces) en células que se cultivan sobre metanol frente a manitol, mientras que los niveles de transcripción de *act* eran similares en ambas condiciones de crecimiento (Jakobsen y col., (2006) J Bacteriol 188(8): 3063-3072). Aquí, las tres MDH que codificaban los genes de MGA3 se incluyeron en análisis similares y los resultados demostraban que los niveles de transcripción relativos de *mdh*-MGA3 y *mdh2*-MGA3 eran 2 veces y 3 veces mayores en metanol en comparación con el manitol. El nivel de transcripción de *mdh3*-MGA3 era esencialmente similar en las dos condiciones de cultivo diferentes. Para *mdh* este resultado era diferente de alguna manera en comparación con los datos previos (Jakobsen y col., (2006) J Bacteriol 188(8): 3063-3072), y la razón de esto es desconocida. De manera interesante, los valores de Ct obtenidos en condiciones convencionales para los tres genes eran altamente diferentes, con *mdh*-MGA3 representando con mucho los menores valores que indican niveles de transcripción más altos. Se encontró que Ct *mdh2*- Ct *mdh* era 8 y Ct *mdh3*- Ct *mdh* era 14 (teniendo en cuenta una eficacia de cebador de aproximadamente el 100 % en todos estos experimentos, estos números deberían implicar que los niveles de transcripción *mdh2*-MGA3 y *mdh3*-MGA3 eran aproximadamente 250 veces y 10.000 veces menores que el nivel de transcripción de *mdh*, respectivamente, en las condiciones ensayadas).

Las secuencias codificantes *mdh2*-MGA3 y *mdh3*-MGA3 son un 96 % idénticas a nivel de ADN y para descartar cualquier hibridación cruzada de los cebadores de la rt-PCR en estos experimentos, los respectivos pares de cebadores de rt-PCR (véase Materiales y procedimientos) se ensayaron hacia los ADN plasmídicos, pTMB1 y pTMB2, que albergaban las secuencias genéticas respectivas de *mdh2* y *mdh3*. Los resultados muestran claramente que no se obtenía ningún producto de PCR cuando se utilizaban los cebadores específicos de *mdh2* junto con ADN pTMB2, o alternativamente cuando se utilizaban los cebadores específicos de *mdh3* junto con la matriz de ADN pTMB1 (datos no mostrados). Estos datos confirmaban que los cebadores de rt-PCR utilizados para *mdh2*-MGA3 y *mdh3*-MGA3 son específicos para sus dianas específicas, confirmando que los datos obtenidos deberían ser fiables.

Se llevó a cabo un análisis similar para los *mdh* de PB1 y los resultados demostraron que los niveles de transcripción de *mdh*-PB1 y *mdh2*-PB1 eran esencialmente similares en el cultivo en manitol frente en metanol. Sorprendentemente, el nivel de transcripción de *mdh1*-PB1 en manitol era 14 veces mayor que en metanol, y el impacto biológico de esto seguía siendo desconocido. Como para la MGA3, los inventores se dieron cuenta que el nivel de transcripción relativa de estos tres genes en PB1 era presumiblemente muy diferente, y el gen *mdh*-PB1 se transcribía a niveles mucho mayores que *mdh1*-PB1 y *mdh2*-PB1 (datos no mostrados).

Ejemplo 14: Expresión de genes *mdh* de *B. methanolicus* en *E. coli***Construcción de vectores de expresión**

Los genes codificantes para Mdh y la proteína Act activadora de Mdh se amplificaron a partir de plásmidos pET21a que albergaban genes de las cepas MGA3 (*mdh*-MGA3, *mdh2*-MGA3, *mdh3*-MGA3 y *act*-MGA3) y PB1 (*mdh*-PB1, *mdh1*-PB1 y *mdh2*-PB1) de *B. methanolicus*. Los genes se clonaron entonces en el plásmido pSEVA424 (genes *mdh*) o en el plásmido pSEVA131 (gen *act*). Para la clonación de *mdh*-MGA3, *mdh*-PB1, *mdh1*-PB1 y *act*-MGA3, se utilizaron sitios de restricción EcoRI y HindIII, mientras que los *mdh2*-MGA3, *mdh2*-PB1 y *mdh3*-MGA3 se clonaron utilizando los sitios de restricción EcoRI y PstI. Los vectores de restricción resultantes se transformaron en *E. coli* K-12 (BW25113) ts electrocompetentes y en *E. coli* K-12 (BW25113) con un gen *frmA* eliminado.

Experimentos de expresión

Para los experimentos de expresión, se cultivaron las células en medio Luria-Bertani (LB) para los ensayos *in vitro* o en medio M9 para los ensayos *in vivo*, conteniendo ambos 20 µg/ml de estreptomina para pSEVA424. Cuando se co-expresaba Act el medio se suplementaba con 100 µg/ml de ampicilina. La expresión se indujo cuando las células alcanzaban una DO de 0,5 (para los ensayos *in vitro*) o DO 1 (para los ensayos *in vivo*) añadiendo 0,1 mM de IPTG

(de concentración final) durante 6 horas Las células se recolectaron entonces por centrifugación. Para los ensayos *in vitro*, se preparó un extracto celular en bruto lisando las células en una prensa de French seguida por ultracentrifugación. De manera alternativa las células se re-suspendieron en medio M9 sin glucosa para las mediciones de actividad *in vivo*.

5 Ensayos enzimáticos

Mediciones de la actividad *in vitro*: Para la determinación de la actividad de Mdh en extractos celulares en bruto, se controló la Mdh dependiente de la formación de NADH a 340 nm. Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C o 45 °C en soluciones tampón pre-calentadas. El ensayo de Mdh contenía 10-20 µg de enzima, 50 mM de tampón K₂HPO₄, pH 7,4, 2,5 mM de MgCl y 0,5 mM de NAD⁺ (concentraciones finales). Después de 5 min de pre-incubación, se inició la reacción con 1 M de metanol (concentración final).

Mediciones *in vivo* de la actividad de Mdh: Para la determinación de la actividad de Mdh en las suspensiones celulares, las células se recolectaron después de la inducción de IPTG, se lavaron y re-suspendieron en medio M9 sin glucosa e IPTG. La DO₆₀₀ se fijó en 1 para la normalización. El ensayo se llevó a cabo a 37 °C o 45 °C en un baño de agua con agitado. El ensayo se inició por la adición de 1 M de metanol y posterior medición del formaldehído acumulado en el sobrenadante resultante de la oxidación de metanol catalizada por la metanol deshidrogenasa. Las actividades calculadas se basaban en que se asumía que 11 de un cultivo de DO1 contiene 0,3 g de biomasa de la cual 50 % es proteína.

Resultados

Las actividades *in vivo* e *in vitro* de diferentes Mdh de cepas MGA3 y PB1 de *B. methanolicus* en *E. coli* se resumen en la Tabla 3 posterior. Se clonó el Act de MGA3 de *B. methanolicus*.

Tabla 3: Actividades *in vivo* e *in vitro* de diferentes Mdh de cepas MGA3 y PB1 de *B. methanolicus* expresadas recombinantemente en *E. coli*

		<i>In vitro</i> [mU/mg]				<i>In vivo</i> [mU/mg]			
		45 °C		37 °C		42 °C		37 °C	
		+Act	-Act	+Act	-Act	+Act	-Act	+Act	-Act
MGA3	Mdh	1260	251	464	48	1	3	1	1
	Mdh2	1910	310	672	59	11,3	45	9	32
	Mdh3	867	113	327	21	24	31	11	24
PB1	Mdh	n.d.	78	n.d.	26	n.d.	n.d.	n.d.	1
	Mdh1	n.d.	219	n.d.	100	n.d.	n.d.	n.d.	0
	Mdh2	n.d.	103	n.d.	33	n.d.	n.d.	n.d.	3

n.d. = no disponible

In vitro, todas las Mdh presentaban una mayor actividad a 45 °C que a 37 °C. Además las actividades *in vitro* de las Mdh de MGA3 aumentaban drásticamente cuando se co-expresaban con Act. *In vivo*, el efecto de la temperatura era mucho menor en comparación con el efecto *in vitro* y la influencia beneficiosa de Act no era detectable. La Mdh2-MGA3 presentaba las actividades totales más altas tanto *in vitro* como *in vivo* entre todos los genes ensayados. Para las Mdh de PB1, la imagen parece diferente. Aquí la Mdh1, que está estrechamente relacionada con la Mdh de MGA3, muestra la mayor actividad para la mayoría de condiciones ensayadas. Sorprendentemente todas las Mdh de PB1 no presentaban o solo una actividad muy débil cuando se ensayaban *in vivo*. Este hallazgo es sorprendente debido a que las actividades *in vitro* a 37 °C parecen prometedoras. La razón para esto no está clara. Basándose en los datos disponibles, el *mdh2*-MGA3 parece que es la mejor elección en total para la actividad metanol deshidrogenasa maximizada en *E. coli* ensayada tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ejemplo 15: Expresión de genes *mdh* de *B. methanolicus* en *B. subtilis*

35 Construcción de los vectores de expresión

Todas las etapas de clonación se hicieron utilizando células de *E. coli* DH5α. El gen *act*-MGA3 se clonó a partir del ADN genómico de *B. methanolicus* MGA3 con un cebador directo que contenía el sitio de unión ribosómico (RBS) *mntA* de *B. subtilis* y un cebador inverso que contiene un engarce corto que contiene los sitios de restricción SwaI y BglII, y un marcador His6 (Figura 7A). El gen se insertó en los plásmidos pHB201 y pHCMC04 utilizando los sitios de restricción SpeI y BamHI. De la misma manera el gen *mdh*-MGA3 se clonó a partir del plásmido pBM19 de *B. methanolicus* MGA3 y los genes *mdh2*-MGA3 y *mdh3*-MGA3 se clonaron a partir del ADN genómico de *B. methanolicus* MGA3. Estos tres genes se ligaron también en los plásmidos pHB201 y pHCMC04.

Para la construcción de los vectores para la co-expresión de *act* y los tres genes de metanol deshidrogenasa diferentes, los genes metanol deshidrogenasa se amplificaron por PCR con un cebador directo que contiene un codón de parada y el RBS *mntA* de *B. subtilis* y un cebador inverso que contiene un engarce corto que contienen los sitios de restricción *SwaI* y *BglIII* (Figura 7B). Los genes respectivos se digirieron en el extremo entonces con *StuI* y *BglIII* y se ligaron en los sitios *SwaI* y *BglIII* del vector *act*-pHB201. De esta manera se introduce un codón de parada después del gen *act* y los genes metanol deshidrogenasa contiene ahora el marcador His6. Después de secuenciar los genes se transfirieron al plásmido pHCMC04 (Figura 7B) utilizando los sitios de restricción *SpeI* y *BamHI*. Las inserciones se confirmaron por secuenciación.

Establecimiento de células de *B. subtilis* recombinantes que expresan metanol deshidrogenasa

Se transformaron células 168 de *B. subtilis* con los plásmidos de expresión *act*-MGA3, *mdh*-MGA3, *mdh2*-MGA3 y *mdh3*-MGA3, y los vectores análogos que co-expresaban cada uno de los genes de metanol deshidrogenasa con el gen *act*-MGA3. Se recogieron las colonias positivas de la placa y se aisló el plásmido y se comprobaron por restricción los clones positivos. Las colonias se recogieron de la placa y se cultivaron durante una noche a 37 °C (250 rpm) y se diluyeron hasta una $DO_{600} = 0,1$ en 20 ml de LB que contenía cloranfenicol (5 µg/ml). Después de 3 h de cultivo a 37 °C (250 rpm), se añadieron al cultivo 500 µl de xilosa al 40 % para inducir la expresión. El cultivo se cultivó durante otras 3 h y se tomaron muestras de 2 ml. La muestra se centrifugó durante 2 min, 11.000 x g y se retiró el sobrenadante. El aglomerado se re-suspendió en 300 µl de Birnboim A para *B. subtilis* (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; un 20 % de sacarosa; 50 mM de NaCl; 0,25 mg/ml de lisozima; inhibidor de proteasa) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Las muestras se almacenaron a -80 °C antes de su uso. Además, los inventores se aprovecharon de las células de *E. coli* recombinantes construidas en el proyecto que expresan *mdh*-MGA3, *mdh2*-MGA3, *mdh3*-MGA3 y *act*-MGA3 a partir del plásmido pET21a en los ensayos *in vitro*.

Ensayos *in vitro* para la actividad de metanol deshidrogenasa

Las actividades de las proteínas Mdh se midieron siguiendo la formación de NADH espectrofotométricamente. La mezcla de reacción contenía:

- 100 µl Glicina-KOH (pH 9,5)
- 100 µl de Metanol 5 M (o etanol 5 M)
- 5 µl $MgSO_4$ 1 M
- 10 µl de NAD^+ 50 mM
- 10 µl de muestra
- (10 µl de lisado de *E. coli act*-pET21a)
- 775 µl H_2O

Las cubetas y mezcla de reacción sin lisado celular se pre-incubaron a 50 °C. La formación de NADH se siguió durante 10 minutos a 340 nm a 50 °C. La actividad total se calculó dividiendo el aumento en unidades de absorción por minutos por el coeficiente de extinción ($6,23 \text{ cm}^{-1} \text{ mm}^{-1}$) y la concentración total de proteína en U/mg de proteína total. Todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando tanto metanol como etanol como sustrato alternativos.

Resultados

Los tres genes ensayados, *mdh*-MGA3, *mdh2*-MGA3, y *mdh3*-MGA3 expresaban metanol deshidrogenasas activas en el huésped *B. subtilis*, mientras que el *act*-MGA3 solo no expresa actividad metanol deshidrogenasa detectable (Figura 8). En general, las actividades eran significativamente mayores cuando se utiliza etanol en vez de metanol como sustrato, para los tres genes ensayados (esto es similar a los que se observa cuando estas enzimas se han purificado a partir de células de *E. coli* recombinante). En todos los casos, las actividades metanol deshidrogenasa estaban estimuladas significativamente por Act. Cuando los genes *act* y de metanol deshidrogenasa se co-expresaban a partir del mismo plásmido en *B. subtilis* 168, parece que la proteína Mdh2 es la más activa. Sin embargo, los inventores se dieron cuenta de que cuando se suministra Act de los lisados de *E. coli*, entonces el gen *mdh*-MGA3 es el más activo. Por lo tanto, el gen *mdh2*-MGA3 - co-expresado junto con *act*-MGA3 – es en total la mejor elección para la actividad metanol deshidrogenasa maximizada en *B. subtilis* cuando se ensaya *in vitro*.

Ejemplo 16: Incorporación de metanol en *C. glutamicum* modificado genéticamente

Experimentos de marcado con ^{13}C

Para los experimentos de marcado los inventores utilizaron la cepa delta ald de *C. glutamicum* que expresa Mdh2-MGA3 (pVWEx1-Mdh2), Hps y Phi (pEKEX3 - Hps + Phi). Como control negativo se utilizó la cepa delta ald de *C. glutamicum* con el plásmido pEKEX3 vacío. Todas las cepas de *C. glutamicum* se cultivaron en medio M8 que contenía (por litro) 3,48 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$, 0,60 g de KH_2PO_4 , 0,51 g de NaCl, 2,04 g de NH_4Cl , 0,10 g de $MgSO_4$, 4,38 mg de $CaCl_2$, 15 mg de $Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$, 4,5 mg de $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,3 mg de $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$, 1 mg de $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$, 1 mg de H_3BO_3 , 0,4 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$, 3 mg de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ y 0,3 mg de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$. Para todos los cultivos (M9 o LB), se utilizó 1 mM de IPTG como inductor y se añadieron 100 µg/ml de espectinomycin y 25 µg/ml de kanamicina en el medio como marcadores de resistencia. Todos los cultivos se llevaron a cabo a 30 °C. Se colocaron en placas las cepas celulares a partir de glicerol como materia prima en una

placa de LB agar (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl, y 16 g/l de agar) y se cultivaron a partir de entonces en un medio LB líquido durante 6 horas. Los pre-cultivos líquidos que contenían medio M9 más 3 g/l de ribosa se inocularon a partir de cultivos LB a una DO_{600} final de 0,6 durante 12 horas. Para los experimentos de marcado, los cultivos líquidos que contenían medio M9 se inocularon a partir de cultivos M9 (+ ribosa) a una DO_{600} final de 0,8. Se tomó una muestra del cultivo antes de la adición de ^{13}C -metanol (es decir, en el momento 5 cero), entonces se añadieron 40 mM de ^{13}C -metanol y se tomaron dos muestras del cultivo a los 30 y 90 minutos. Con el fin de inactivar la actividad metabólica y la extracción de metabolitos intracelulares, las muestras del cultivo se dispensaron en una solución fría (-20 °C) de acetonitrilo/metanol/0,1 M de ácido fórmico (40/40/20 vol/vol). Los patrones de marcado de los metabolitos intracelulares se midieron utilizando un sistema Dionex ICS 2000 (Dionex, 10 Sunnyvale, USA) acoplado a un espectrofotómetro de masas cuadrupole QTrap 4000 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Resultados

Como se esperaba, no se detectó ninguna marca en la masa de la fracción isotopomérica M1 (es decir, las moléculas que tienen un átomo de carbono marcado) en la cepa tipo silvestre después del pulso con ^{13}C -metanol 15 (Figura 9A). La incorporación de marcador significativa en los metabolitos se observó en el mutante que expresa las dos reacciones recombinantes de la ruta RuMP (Hps y Phi) y la metanol deshidrogenasa dependiente de NAD de *B. methanolicus* MGA3 (Mdh2-MGA3) (Figura 9B). Mientras aumentaba el contenido marcado en fructosa-bis-fosfato y ribosa-5-fosfato entre 30 y 90 minutos, se mantenía constante en fosfoenolpiruvato y 2/3-fosfoglicerato. Estos datos demuestran claramente que la ruta metilotrónica introducida opera *in vivo*, dando lugar a la asimilación de metanol en 20 el metabolismo del carbono central.

Se debería señalar que en estos y otros experimentos adicionales descritos posteriormente, las limitaciones técnicas significan que no era posible examinar la marcación por ^{13}C del formaldehído directamente. Sin embargo, también expresando las enzimas corriente abajo de la ruta RuMP, era posible analizar la incorporación del ^{13}C en los metabolitos y de esta manera detectar la asimilación de metanol marcado con ^{13}C indirectamente. Además, la actividad de la Mdh expresada recombinantemente había demostrado *in vitro* en los experimentos descritos 25 anteriormente, véase por ejemplo los Ejemplos 3-6 anteriores.

Ejemplo 17: Incorporación de metanol en *E. coli* modificada genéticamente

Resultados

Los inventores utilizaron experimentos de marcado metabólico para probar que Mdh, Hps y Phi eran funcionales en 30 células vivas. Las células que expresan las tres proteínas se alimentaron con metanol marcado con ^{13}C o ^{13}C formaldehído y se podía demostrar la incorporación de ambos compuestos C-1 en varios metabolitos.

Para los experimentos los inventores utilizaron células de *E. coli* que carecían del gen para la formaldehído deshidrogenasa (Δ frmA) que expresaba *mdh2*, *hps* y *phi* o *hps* y *phi* solas a partir de diferentes plásmidos pSEVA (424 y 131). Todos los genes utilizados para los experimentos se derivaban de *B. methanolicus* MGA3. Se obtuvieron pre-cultivos a 37 °C en medio mínimo M9 optimizado que contenía ribosa como única fuente de carbono. Para los 35 experimentos las células se transfirieron en medio M9 reciente sin ribosa. Los experimentos comenzaron por adición de metanol marcado con ^{13}C o formaldehído. Para controlar la incorporación, se tomaron muestras en diferentes momentos, se paró el metabolismo por inactivación por frío y las muestras se analizaron posteriormente por análisis LC-MS.

40 Cuando se añadió metanol como único sustrato (Figura 10A) se podía detectar el marcado en varios metabolitos tales como pentosa 5-fosfatos, hexosa-6-fosfato, fosfoenolpiruvato y acetil-CoA. Análisis más en profundidad revelaban que varios metabolitos necesarios para el ciclo RuMP, por ejemplo, pentosa-5-fosfato, mostraban la incorporación de múltiples compuestos de carbono marcados, indicando la operación de un ciclo funcional completo. Cuando se utilizó el formaldehído (Figura 10B) la incorporación de átomos de C marcados también se producía (de 45 hecho, se producía más rápido con respecto a la incorporación de metanol sugiriendo que Hps y Phi trabaja más rápido que la Mdh o que la cantidad de moléculas precursoras C-5 necesarias para la incorporación de formaldehído o la concentración de formaldehído producidas a partir del metanol era limitada). En un experimento de control utilizando el metanol marcado con ^{13}C como sustrato, se descubrió que la expresión de Hps y Phi solo no permitía la asimilación de metanol marcado con ^{13}C (datos no mostrados).

50 Los hallazgos muestran claramente que los tres módulos metilotrónicos introducidos se expresaban funcionalmente. Los inventores demostraron también que la expresión de las tres proteínas daba lugar a la incorporación de metanol y formaldehído en la biomasa mediante el ciclo RuMP establecido. Utilizando metanol o formaldehído como fuente de carbono los presentes inventores pudieron demostrar que la asimilación de formaldehído mediante Hps y Phi es mucho más rápida que la asimilación de metanol pero puede estar limitada por la disponibilidad de moléculas 55 precursoras de C5.

Ejemplo 18: Incorporación de metanol en *B. subtilis* modificado genéticamente**Construcción de los vectores de expresión**

Todas las etapas de clonación se hicieron utilizando células de *E. coli* DH5 α . El gen *act*-MGA3 se clonó a partir del ADN genómico de *B. methanolicus* MGA3 con un cebador directo que contenía el sitio de unión ribosómico (RBS) *mntA* de *B. subtilis* y un cebador inverso que contiene un engarce corto que contiene los sitios de restricción SwaI y BglIII, y un marcador His6 (Figura 7A). El gen se insertó en el plásmido pHB201 utilizando los sitios de restricción SpeI y BamHI.

Para la construcción de los vectores para la co-expresión de *act*, *mdh3*, *hxlA*, *hxlB*, *glpX*, *fba*, *tkl*, *pfk* y *rpe*, los genes se amplificaron por PCR con un cebador directo que contiene un codón de parada y el RBS *mntA* de *B. subtilis* y un cebador inverso que contiene un engarce corto que contienen los sitios de restricción SwaI y BglIII (Figura 11). Para la amplificación de *act* y *mdh3* se utilizó el ADN genómico de *B. methanolicus* MGA3, para los genes *glpX*, *fba*, *tkl*, *pfk* y *rpe* se utilizó el plásmido pBM19 de *B. methanolicus* MGA3, y para los genes *hxlA* y *hxlB* se utilizó el ADN genómico de *B. subtilis* 168. Los genes respectivos se digirieron en el extremo entonces con StuI y BglIII y se ligaron en los sitios SwaI y BglIII del vector. Los genes se introdujeron secuencialmente en el vector, construyendo de esta manera un operón sintético de nueve genes (Figura 11). De esta manera se introduce un codón de parada después de cada gen y el último gen del operón sintético contiene ahora el marcador His6. Después de la introducción de cada gen en el operón sintético, se verificó la inserción correcta mediante secuenciación. Después de secuenciar los operones sintéticos se transfirieron al plásmido pHCMC04 (Figura 7B) utilizando los sitios de restricción SpeI y BamHI. Las inserciones se confirmaron por secuenciación.

Expresión de los genes de la ruta RuMP en *B. subtilis* 168

Para el establecimiento de las células de *B. subtilis* que expresan enzimas de la ruta RuMP, se transformaron las células de *B. subtilis* 168 con los vectores que contenían los genes de la ruta RuMP (Figura 7A). Las colonias positivas se recogieron de la placa y se aisló el plásmido y los clones positivos se comprobaron por restricción. Las colonias se recogieron de la placa y se cultivaron durante una noche a 37 °C (250 rpm) y se diluyeron hasta una DO₆₀₀ = 0,1 en 100 ml de medio MSR (25 g/l de extracto de levadura, 15 g/l de triptona, 3 g/l de K₂HPO₄, un 1 % de glucosa) suplementado con vitaminas y cloranfenicol (5 μ g/ml). Después de 3 h de cultivo a 37 °C (250 rpm), se añadieron 1,25 ml de xilosa al 40 % al cultivo para inducir la expresión. El cultivo se cultivó durante otras 3 h y las células se centrifugaron durante 10 min, 4.000 x g y el sobrenadante se retiró. El aglomerado se lavó con medio MSR y se re-suspendió en 4 ml de Birboim A para *B. subtilis* (un tampón de lisis que contiene 2 mM de Tris-HCl (pH 7,4), un 20 % de Sacarosa, 50 mM de NaCl, y 0,25 mg/ml de lisozima) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. La muestra se centrifugó durante 20 minutos a 13.000 x g a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para la purificación por His Trap.

Las fracciones proteicas purificadas se combinaron y concentraron utilizando columnas Vivaspín (marca registrada) (GE Healthcare). Se visualizaron las proteínas purificadas por SDS-PAGE y tinción con Coomassie (Figura 12). Los inventores demostraron que cada proteína que contiene el marcador His₆ se expresó a partir de operones sintéticos (Figura 11).

Experimentos de marcado con ¹³C

Para los experimentos de marcado los inventores utilizaron la cepa de *B. subtilis* que expresa Act, Mdh3, HxlA y HxlB y la cepa que expresa Act, Mdh3, HxlA, HxlB, GlpX, Fba, Tkl, Pfk y Rpe. Como control negativo se utilizó la cepa de *B. subtilis* con el plásmido pHCMC04 vacío. Todas las cepas de *B. subtilis* se cultivaron en medio M9 que contenía (por litro) 3,48 g de Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 0,60 g of KH₂PO₄, 0,51 g de NaCl, 2,04 g de NH₄Cl, 0,10 g de MgSO₄, 4,38 mg de CaCl₂, 15 mg de Na₂EDTA · 2 H₂O, 4,5 mg de ZnSO₄ · 7 H₂O, 0,3 mg de CoCl₂ · 6 H₂O, 1 mg de MnCl₂ · 4 H₂O, 1 mg de H₃BO₃, 0,4 mg de Na₂MoO₄ · 2 H₂O, 3 mg de FeSO₄ · 7 H₂O y 0,3 mg de CuSO₄ · 5 H₂O, 10 g de xilosa (es decir, un inductor) y 5 mg de cloranfenicol. Todos los cultivos se llevaron a cabo a 37 °C. Se colocaron en placas las cepas celulares a partir de glicerol como materia prima en una placa de LB agar (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl, y 16 g/l de agar) que contenía 5 μ g/ml de cloranfenicol y se cultivaron a partir de entonces en un medio LB líquido + cloranfenicol durante 5 horas. Los pre-cultivos líquidos que contenían medio M9 se inocularon a partir de cultivos LB hasta una DO₆₀₀ final entre 1,4 y 1,8. Se tomó una muestra del cultivo antes de la adición de ¹³C-metanol (es decir, en el momento cero), entonces se añadieron 40 mM de ¹³C-metanol y se tomaron dos muestras del cultivo a los 30 y 90 minutos. Con el fin de inactivar la actividad metabólica y la extracción de metabolitos intracelulares, las muestras del cultivo se dispensaron en una solución fría (-20 °C) de acetonitrilo/metanol/0,1 M de ácido fórmico (40/40/20 vol/vol). Los patrones de marcado de los metabolitos intracelulares se midieron utilizando un sistema Dionex ICS 2000 (Dionex, Sunnyvale, USA) acoplado a un espectrofotómetro de masas cuadrupole QTrap 4000 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Resultados

Como se esperaba, no se detectaba marcado en la masa de la fracción isotopomérico M1 (es decir, que tiene un átomo de carbono marcado) en la cepa de tipo silvestre después del pulso con ¹³C-metanol (Figura 13A). Además, no se descubrió marcado en la mutante que expresa las dos reacciones recombinantes de la ruta RuMP (HxlA y

5 HxlB), la proteína activadora (Act), y la metanol deshidrogenasa dependiente de NAD (Mdh3), pero no se sobre-expresaba ninguno de los genes de la ruta de la pentosa fosfato (PPP) (Figura 13B). Sin embargo, cuando los genes de la PPP se sobre-expresaban además de los cuatro genes previos, se detectaba una incorporación del marcador significativa (Figura 13C). Estos datos demuestran claramente que la ruta metilotrónica introducida opera *in vivo*, dando lugar a la asimilación de metanol en el metabolismo de carbono central. Estos resultados también muestran que el suministro de moléculas precursoras de C-5 mediante la PPP es un cuello de botella para la incorporación de metanol en *B. subtilis*. Sin embargo, esto se puede aliviar sobre-expresando los genes que codifican enzimas relacionadas con PPP.

Listado de secuencias

- 10 <110> Sinvent AS
Rijksuniversiteit Groningen ETH Zurich
- 15 <120> Nuevas enzimas metanol deshidrogenasa
- <130> 27.13.110259/01
- <150> GB 1201178.9
- <151> 25-01-2012
- 20 <160> 45
- <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
- <211> 1158
- <212> ADN
- <213> *Bacillus methanolicus* MGA3
- 30 <400> 1

ES 2 659 730 T3

```

atgacaaaca ctcaaagtgc attttttatg ctttcagtca atctatttgg tgcaggatca      60
gttaatgagg ttggaactcg attagctgat cttggtgtga aaaaagcttt attagttaca      120
gatgctggtc ttcacggttt aggtctttct gaaaaaattt ccagtattat tcgtgcagct      180
ggtgtggaag tatccatttt tccaaaagcc gaaccaaatc caaccgataa aaacgtcgca      240
gaaggtttag aagcgtataa cgctgaaaac tgtgacagca ttgtcactct gggcggcgga      300
agttcacatg atgccggaaa agccattgca ttagtagctg ctaatggtgg aaaaattcac      360
gattatgaag gtgtcgatgt atcaaaagaa ccaatggtcc cgctaattgc gattaataca      420
acagctggtg caggcagtga attaactaaa ttcacaatca tcacagatac tgaacgcaaa      480
gtgaaaatgg ccattgtgga taaacatgta acacctacac tttcaatcaa cgaccagag      540
ctaatggttg gaatgcctcc gtccttaact gctgctactg gattagatgc attaactcat      600
gcaattgaag catatgtttc aactggtgct actccaatta cagatgcaact tgcaattcag      660
gcgatcaaaa tcatttctaa atacttgccg cgtgcagttg caaatggaaa agacattgaa      720
gcacgtgaac aatggcctt cgctcaatca ttagctggca tggcattcaa taacgcggtt      780
ttaggctatg ttcatgcgat tgcacaccaa ttaggaggat tctacaactt ccctcatggc      840
gtttgcaatg cggtccttct gccatatgta tgtcgattta acttaatttc taaagtggaa      900
cgttatgcag aaatcgctgc ttttcttggg gaaaatgtcg acggtctaag tacgtacgat      960
gcagctgaaa aagctattaa agcgatogaa agaatggcta aagacctta cttccaaaa      1020
ggctttaaag aactaggtgc taaagaagaa gacattgaga ctttagctaa gaatgcatg      1080
aaagatgcat gtgcattaac aaatcctcgt aaacctaagt tagaagaagt catccaaatt      1140
attaaaaatg cgatgtaa                                     1158

```

5

```

<210> 2
<211> 385
<212> PRT
<213> Bacillus methanolicus MGA3

<400> 2

```

ES 2 659 730 T3

Met Thr Asn Thr Gln Ser Ala Phe Phe Met Pro Ser Val Asn Leu Phe
1 5 10 15

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

Val Lys Lys Ala Leu Leu Val Thr Asp Ala Gly Leu His Gly Leu Gly
35 40 45

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

Ser Ile Phe Pro Lys Ala Glu Pro Asn Pro Thr Asp Lys Asn Val Ala
65 70 75 80

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

Leu Gly Gly Gly Ser Ser His Asp Ala Gly Lys Ala Ile Ala Leu Val
100 105 110

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

Lys Glu Pro Met Val Pro Leu Ile Ala Ile Asn Thr Thr Ala Gly Thr
130 135 140

Gly Ser Glu Leu Thr Lys Phe Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Arg Lys
145 150 155 160

Val Lys Met Ala Ile Val Asp Lys His Val Thr Pro Thr Leu Ser Ile
165 170 175

Asn Asp Pro Glu Leu Met Val Gly Met Pro Pro Ser Leu Thr Ala Ala
180 185 190

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

Gly Ala Thr Pro Ile Thr Asp Ala Leu Ala Ile Gln Ala Ile Lys Ile
210 215 220

ES 2 659 730 T3

Ile Ser Lys Tyr Leu Pro Arg Ala Val Ala Asn Gly Lys Asp Ile Glu
225 230 235 240

Ala Arg Glu Gln Met Ala Phe Ala Gln Ser Leu Ala Gly Met Ala Phe
245 250 255

Asn Asn Ala Gly Leu Gly Tyr Val His Ala Ile Ala His Gln Leu Gly
260 265 270

Gly Phe Tyr Asn Phe Pro His Gly Val Cys Asn Ala Val Leu Leu Pro
275 280 285

Tyr Val Cys Arg Phe Asn Leu Ile Ser Lys Val Glu Arg Tyr Ala Glu
290 295 300

Ile Ala Ala Phe Leu Gly Glu Asn Val Asp Gly Leu Ser Thr Tyr Asp
305 310 315 320

Ala Ala Glu Lys Ala Ile Lys Ala Ile Glu Arg Met Ala Lys Asp Leu
325 330 335

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

Glu Thr Leu Ala Lys Asn Ala Met Lys Asp Ala Cys Ala Leu Thr Asn
355 360 365

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

Met
385

- <210> 3
- <211> 1158
- <212> ADN
- <213> *Bacillus methanolicus* MGA3
- <400> 3

5

ES 2 659 730 T3

atgaaaaaca ctcaaagtgc attttacatg ccttcagtca atctatttgg tgcaggctct	60
gttaatgagg ttggaactcg attagctggg cttgggtgtga aaaaagcttt attagttaca	120
gatgctggtc ttcacagttt aggcctttct gaaaaaattg ccggtatcat tcgtgaagct	180
ggtgtggaag tagctatfff tccaaaagcc gaaccaaatc caactgataa aaacgtcgca	240
gaaggtttag aagcgtataa cgctgaaaac tgtgacagca ttgtcactct tggcggcgga	300
agctcacatg atgctggaaa agccattgca ttagtagctg ctaacgggtg aacaattcac	360
gattatgaag gtgtcgatgt atcaaaaaaa ccaatgggtcc ctctaattgc gattaataca	420
acagctggta caggcagtga attaactaaa ttcacaatca tcacagatac tgaacgcaaa	480
gtgaaaatgg ccattgttga taaacatgta acacctacac tttcaatcaa tgaccagag	540
ctaaggttg gaatgcctcc gtccttaaca gctgctactg gattagatgc attaactcat	600
gcgattgaag catatgtttc aactgggtgct actccaatta cagatgcact tgcaattcag	660
gcgatcaaaa ttatttctaa atacttgccg cgtgcagttg caaatggaaa agacattgaa	720
gcacgtgaac aatggcctt cgcacaatca ttagctggca tggcattcaa taacgggggt	780
ttaggctatg ttcattcgat tgcacaccaa ttaggaggat tctacaactt ccctcatggc	840
gtttgcaatg cgatccttct gcgcgatgtt tgtcgtttca acttaatttc taaagtggaa	900
cgttatgcag aaatcgctgc tttcttggg gaaaatgtcg acggcctaag cacctacgaa	960
gcagctgaaa aagctattaa agcgatcgaa agaatggcta gagacctaa cattccaaaa	1020
ggctttaaag aactaggtgc taaagaagaa gatattgaga ctttagctaa aaatgcgatg	1080
aatgatgcat gtgcattaac aaatcctcgt aaacctaagt tagaagaagt catccaaatt	1140
atataaaatg ctatgtaa	1158

<210> 4
 <211> 385
 <212> PRT
 <213> *Bacillus methanolicus* MGA3

5

<400> 4

ES 2 659 730 T3

Met Lys Asn Thr Gln Ser Ala Phe Tyr Met Pro Ser Val Asn Leu Phe
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Ser Val Asn Glu Val Gly Thr Arg Leu Ala Gly Leu Gly
 20 25 30

Val Lys Lys Ala Leu Leu Val Thr Asp Ala Gly Leu His Ser Leu Gly
 35 40 45

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

Ala Ile Phe Pro Lys Ala Glu Pro Asn Pro Thr Asp Lys Asn Val Ala
 65 70 75 80

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

Leu Gly Gly Gly Ser Ser His Asp Ala Gly Lys Ala Ile Ala Leu Val
 100 105 110

ES 2 659 730 T3

Ala Ala Asn Gly Gly Thr Ile His Asp Tyr Glu Gly Val Asp Val Ser
 115 120 125

Lys Lys Pro Met Val Pro Leu Ile Ala Ile Asn Thr Thr Ala Gly Thr
 130 135 140

Gly Ser Glu Leu Thr Lys Phe Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Arg Lys
 145 150 155 160

Val Lys Met Ala Ile Val Asp Lys His Val Thr Pro Thr Leu Ser Ile
 165 170 175

Asn Asp Pro Glu Leu Met Val Gly Met Pro Pro Ser Leu Thr Ala Ala
 180 185 190

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

Gly Ala Thr Pro Ile Thr Asp Ala Leu Ala Ile Gln Ala Ile Lys Ile
 210 215 220

Ile Ser Lys Tyr Leu Pro Arg Ala Val Ala Asn Gly Lys Asp Ile Glu
 225 230 235 240

Ala Arg Glu Gln Met Ala Phe Ala Gln Ser Leu Ala Gly Met Ala Phe
 245 250 255

Asn Asn Ala Gly Leu Gly Tyr Val His Ala Ile Ala His Gln Leu Gly
 260 265 270

Gly Phe Tyr Asn Phe Pro His Gly Val Cys Asn Ala Ile Leu Leu Pro
 275 280 285

His Val Cys Arg Phe Asn Leu Ile Ser Lys Val Glu Arg Tyr Ala Glu
 290 295 300

Ile Ala Ala Phe Leu Gly Glu Asn Val Asp Gly Leu Ser Thr Tyr Glu
 305 310 315 320

Ala Ala Glu Lys Ala Ile Lys Ala Ile Glu Arg Met Ala Arg Asp Leu
 325 330 335

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

Glu Thr Leu Ala Lys Asn Ala Met Asn Asp Ala Cys Ala Leu Thr Asn
 355 360 365

ES 2 659 730 T3

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

Met
 385

5 <210> 5
 <211> 1158
 <212> ADN
 <213> *Bacillus methanolicus* PB1

<400> 5

atgacaaaaca ctcaaagtat attttacata ccttcagtca atttgtttgg tccaggatct	60
gttaatgagg ttggaactcg attagctggc cttggcgtga aaaaagcttt attagttaca	120
gatgctggtc ttcacggctt aggtctttct gaaaaaattg ccagtatcat tcgtgaagct	180
gggtggaag tattaatfff tccaaaagcc gaaccaaatc caactgataa aaacgctgca	240
gaaggtttgg aagtgtataa cgctgaaaac tgtgacagca ttgtcacttt gggcggcgga	300
agctcgcgatg atgctggaaa aggcattgca ttagtagctg ctaacgggtgg aacaatttac	360
gattatgaag gtgtcgataa atcaaaaaaa ccaatggtcc cgctcattgc gattaataca	420
acagctggta caggcagtga attaactaga tttacaatca tcacagatac tgaacgtaaa	480
gtgaaaatgg cgattgttga taaacatgta acacctacac tttcaatcaa cgaccagaa	540
ctaattggtcg gaatgcctcc gtctttaaca gctgctactg gattagatgc attaactcat	600
gcaattgaag cttatgtttc aacggctgct actccaatta cagatgcact tgccattcag	660
gcgatcaaaa tcatttctaa ataactgcca cgtgcatttg caaatggcaa agatatggaa	720
gcacgtgagc aaatggcctt cgctcaatca ttagctggta tggcatttaa taacgcttct	780
ttaggctatg ttcattgcaat tgcacaccaa tttggcggat tctacaactt ccctcatggc	840
gtttgcaatg cgatccttct gccacatgta tgccgattta atttaatttc taaagtggaa	900
cgttttgcag aaattgctgc tctcctaggt gaaaatgtcg ccggcctaag tactcgcgaa	960
gcagctgaaa aaggtattaa agcgatcgaa agaatggcta aagacctaa cattocaaga	1020
ggctttaaag aactgggtgc taaagaagaa gacattgtga ctttagctga aaatgcatg	1080
aaagatgcaa cggcattaac aaatcctcgt aaacctaagt tgaagaagt tatacaaatt	1140
attaanaatg ctatgtaa	1158

10
 15 <210> 6
 <211> 385
 <212> PRT
 <213> *Bacillus methanolicus* PB1

<400> 6

ES 2 659 730 T3

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

Gly Pro Gly Ser Val Asn Glu Val Gly Thr Arg Leu Ala Gly Leu Gly
 20 25 30

Val Lys Lys Ala Leu Leu Val Thr Asp Ala Gly Leu His Gly Leu Gly
 35 40 45

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

Leu Ile Phe Pro Lys Ala Glu Pro Asn Pro Thr Asp Lys Asn Val Ala
 65 70 75 80

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

Leu Gly Gly Gly Ser Ser His Asp Ala Gly Lys Gly Ile Ala Leu Val
 100 105 110

Ala Ala Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asp Tyr Glu Gly Val Asp Lys Ser
 115 120 125

Lys Lys Pro Met Val Pro Leu Ile Ala Ile Asn Thr Thr Ala Gly Thr
 130 135 140

Gly Ser Glu Leu Thr Arg Phe Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Arg Lys
 145 150 155 160

Val Lys Met Ala Ile Val Asp Lys His Val Thr Pro Thr Leu Ser Ile
 165 170 175

Asn Asp Pro Glu Leu Met Val Gly Met Pro Pro Ser Leu Thr Ala Ala
 180 185 190

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

Ala Ala Thr Pro Ile Thr Asp Ala Leu Ala Ile Gln Ala Ile Lys Ile
 210 215 220

Ile Ser Lys Tyr Leu Pro Arg Ala Phe Ala Asn Gly Lys Asp Met Glu
 225 230 235 240

Ala Arg Glu Gln Met Ala Phe Ala Gln Ser Leu Ala Gly Met Ala Phe
 245 250 255

ES 2 659 730 T3

Asn Asn Ala Ser Leu Gly Tyr Val His Ala Ile Ala His Gln Phe Gly
 260 265 270

Gly Phe Tyr Asn Phe Pro His Gly Val Cys Asn Ala Ile Leu Leu Pro
 275 280 285

His Val Cys Arg Phe Asn Leu Ile Ser Lys Val Glu Arg Phe Ala Glu
 290 295 300

Ile Ala Ala Leu Leu Gly Glu Asn Val Ala Gly Leu Ser Thr Arg Glu
 305 310 315 320

Ala Ala Glu Lys Gly Ile Lys Ala Ile Glu Arg Met Ala Lys Asp Leu
 325 330 335

Asn Ile Pro Arg Gly Phe Lys Glu Leu Gly Ala Lys Glu Glu Asp Ile
 340 345 350

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

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

Met
 385

<210> 7
 <211> 1149
 <212> ADN
 <213> *Bacillus methanolicus* MGA3
 <400> 7

atgacaaca actttttcat tccaccagcc agcgttaattg gacgcggtgc agtaaaggaa 60
 gtaggaaca gacttaagca aattggagct aagaaagcgc ttatcgttac agatgcattc 120
 cttcacagca caggtttatc tgaagaagtt gctaaaaaca ttcgtgaagc tggcgttgat 180
 gttgcgattt tcccaaaagc tcaaccagat ccagcagata cacaagttca tgaaggtgta 240
 gatgtattca aacaagaaaa ctgtgattca ottgtttcta tcgggtggagg tagctctcac 300
 gatacagcta aagcaatcgg tttagttgca gcaaacggcg gaagaatcaa tgactatcaa 360
 ggtgtaaaca gcgtagaaaa accagtcggt ccagtagttg caatcactac aacagctggt 420
 actggtagtg aaacaacatc tcttgcggtt attacagact ctgcacgtaa agtaaaaatg 480
 cctgttattg atgagaaaat tactccaact gtagcaattg ttgaccocaga attaatggtg 540
 aaaaaaccag ctggattaac aatcgcaact ggtatggatg cattgtccca tgcaattgaa 600

5

10

ES 2 659 730 T3

gcatatgttg caaaaggtgc tacaccagtt actgatgcat ttgctattca agcaatgaaa 660
 cttatcaatg aatacttacc aaaagcgggt gcgaacggag aagacatcga agcacgtgaa 720
 aaaatggctt atgcacaata catggcagga gtggcattta acaacgggtg tttaggacta 780
 gttcactcta tttctcacca agtaggtgga gtttacaaat tacaacacgg aatctgtaac 840
 tcagttaata tgccacacgt ttgogcattc aacctaattg ctaaaaactga gcgcttgcga 900
 cacattgctg agcttttagg tgagaatggt gctggcttaa gcaactgcagc agctgctgag 960
 agagcaattg tagctcttga aagaatcaac aaatccttcg gtatcccatc tggctatgca 1020
 gaaatgggcg tgaagaaga ggatatcgaa ttattagcga aaaacgcata cgaagacgta 1080
 tgtactcaaa gcaaccacg cgttcctact gttcaagaca ttgcacaaat catcaaaaac 1140
 gctatgtaa 1149

<210> 8
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> *Bacillus methanolicus* MGA3
 <400> 8

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

5

10

ES 2 659 730 T3

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

Pro Val Ile Asp Glu Lys Ile Thr Pro Thr Val Ala Ile Val Asp Pro
 165 170 175

Glu Leu Met Val Lys Lys Pro Ala Gly Leu Thr Ile Ala Thr Gly Met
 180 185 190

Asp Ala Leu Ser His Ala Ile Glu Ala Tyr Val Ala Lys Gly Ala Thr
 195 200 205

Pro Val Thr Asp Ala Phe Ala Ile Gln Ala Met Lys Leu Ile Asn Glu
 210 215 220

Tyr Leu Pro Lys Ala Val Ala Asn Gly Glu Asp Ile Glu Ala Arg Glu
 225 230 235 240

Lys Met Ala Tyr Ala Gln Tyr Met Ala Gly Val Ala Phe Asn Asn Gly
 245 250 255

Gly Leu Gly Leu Val His Ser Ile Ser His Gln Val Gly Gly Val Tyr
 260 265 270

Lys Leu Gln His Gly Ile Cys Asn Ser Val Asn Met Pro His Val Cys
 275 280 285

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

Leu Leu Gly Glu Asn Val Ala Gly Leu Ser Thr Ala Ala Ala Ala Glu
 305 310 315 320

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

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

Ala Lys Asn Ala Tyr Glu Asp Val Cys Thr Gln Ser Asn Pro Arg Val
 355 360 365

Pro Thr Val Gln Asp Ile Ala Gln Ile Ile Lys Asn Ala Met
 370 375 380

<210> 9
 <211> 1152
 <212> ADN
 <213> *Bacillus methanolicus* PB1

ES 2 659 730 T3

<400> 9

```

atgacgcaaa gaaacttttt cattccacca gctagcgtaa ttggacgcg gctgtgtaaa      60
gaagtaggaa caagacttaa gcaaattgga gctacaaaag cacttatcgt tacagatgca      120
tttcttcag gacaggttt gtcagaagaa gttgctaaaa acattcgtga agctggcctt      180
gatgctgtaa ttttccaaa agctcaacca gatccagcag atacacaagt tcatgaaggc      240
gtagatatat tcaacaaga aaaatgtgat gcacttgttt ctatcgttgg aggtagctct      300
cacgatacag caaaagcaat cggtttagtt gcagcaaacg gcggaagaat caacgactat      360
caaggtgtaa acagtgtaga aaaaccggtt gttccagtag ttgcaatcac tacaacagct      420
ggtactggtg gtgaacaac atctcttgcg gttattacag attctgcacg taaagtaaaa      480
atgccagtta tcgatgagaa aattacacca actgtagcaa ttggtgaccc agaattaatg      540
gtgaaaaaac cagctggatt aacaattgca actggtagtg atgcattatc ccatgcaatt      600
gaagcatatg ttgcaaaacg tgctacacca gttactgatg cgtttgcaat tcaagcaatg      660
aaactcatta atgaatactt accacgtgcg gttgcaaatg gagaagacat cgaagcacgt      720
gaagcaatgg ottatgcaca atacatggca ggagtggcat ttaacaacgg aggtttagga      780
ttagtacact ctatttctca ccaagtaggt ggagtttaca agttacaaca cggaatctgt      840
aactcagtta atatgccaca cgtttgcaa ttcaacttaa ttgctcgtac tgaacgcttc      900
gcacacattg ctgagctttt aggcgagaat gtttctggct taagcactgc atctgctgct      960
gagagagcaa ttgtagcgt tcaacgctat aacaaaaact tcggtatccc atctggctat     1020
gcagaaatgg gcgtaaaaga agaggatata gaattattag cgaacaacgc gtaccaagac     1080
gtatgtactc tagataaccc acgtgttctt actgttcaag acattgcaca aatcatcaaa     1140
aacgctctgt aa                                                                1152

```

5

<210> 10
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> *Bacillus methanolicus* PB1

10

<400> 10

```

Met Thr Gln Arg Asn Phe Phe Ile Pro Pro Ala Ser Val Ile Gly Arg
 1           5           10           15

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

Lys Ala Leu Ile Val Thr Asp Ala Phe Leu His Gly Thr Gly Leu Ser
          35           40           45

```

ES 2 659 730 T3

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

Phe Pro Lys Ala Gln Pro Asp Pro Ala Asp Thr Gln Val His Glu Gly
 65 70 75 80

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

Gly Gly Ser Ser His Asp Thr Ala Lys Ala Ile Gly Leu Val Ala Ala
 100 105 110

Asn Gly Gly Arg Ile Asn Asp Tyr Gln Gly Val Asn Ser Val Glu Lys
 115 120 125

Pro Val Val Pro Val Val Ala Ile Thr Thr Thr Ala Gly Thr Gly Ser
 130 135 140

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

Met Pro Val Ile Asp Glu Lys Ile Thr Pro Thr Val Ala Ile Val Asp
 165 170 175

Pro Glu Leu Met Val Lys Lys Pro Ala Gly Leu Thr Ile Ala Thr Gly
 180 185 190

Met Asp Ala Leu Ser His Ala Ile Glu Ala Tyr Val Ala Lys Arg Ala
 195 200 205

Thr Pro Val Thr Asp Ala Phe Ala Ile Gln Ala Met Lys Leu Ile Asn
 210 215 220

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

Glu Ala Met Ala Tyr Ala Gln Tyr Met Ala Gly Val Ala Phe Asn Asn
 245 250 255

Gly Gly Leu Gly Leu Val His Ser Ile Ser His Gln Val Gly Gly Val
 260 265 270

Tyr Lys Leu Gln His Gly Ile Cys Asn Ser Val Asn Met Pro His Val
 275 280 285

Cys Gln Phe Asn Leu Ile Ala Arg Thr Glu Arg Phe Ala His Ile Ala

ES 2 659 730 T3

```

atgactaaaa caaaatTTTT cattccatca tccactgtat ttggacgagg cgctgtaaag      60
gaagtaggtg caagactaaa agctattgga gctacgaaag cacttatcgt tacagacgca      120
ttccttcaca gcacaggttt gtcagaagaa gttgctaaaa acattcgtga agctggcctt      180
gatgttgtaa tttttcctaa agctcaacca gatccagcag atacacaagt tcatgaaggc      240
gtagaggtat tcaaacaaga aaaatgtgat gcacttgttt ctatcgggtg ggcagctct      300
cacgatacag caaaaggaat cggcttagtt gcagcaaacg gcggaagaat caacgactat      360
caaggtgtaa atagtgtaga aaaacaagtc gttccacaga ttgcaatcac tacaacagct      420
ggtactggaa gtgaacaac atctcttgcg gttattacag actctgcaag taaagtaaaa      480
atgccggtta ttgatgaaaa aattacacca actgtagcaa ttggtgaccc agaattaatg      540
gtgaaaaaac cagctggatt aacaatagca actgggatgg atgcattatc ccatgcaatt      600
gaagcatatg ttgcaaaacg tgctacacca gttactgatg catttgcat tcaagcaatg      660
aaactcatta atgaatactt accaaaagcg gttgcaaatg gagaagacat cgaagcacgt      720
gaagcaatgg cttatgcaca atacatggca ggagtggcat ttaataacgg aggttagga      780
ttagtacact ctatttctca ccaagtaggt ggagtttaca aattacaaca cggaatctgt      840
aactcagttg taatgccaca tgtttgcaa ttcaacttaa ttgctcgtac tgaacgcttc      900
gcacacattg ctgagctttt aggcgagaat gtttctggct taagcactgc atctgctgca      960
gaaagaacaa ttgcagcgtc tgaacgctac aacagaaact tcggtattcc atcaggctat     1020
aaagcaatgg gcgtaaaaga agaagatc gaattattag caacaacgc aatgcaagat     1080
gtatgtactc tagacaaccc tcgtgtccct acggttcaag acattcaaca aatcatcaaa     1140
aacgctctgt aa                                                                1152

```

<210> 12
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> *Bacillus methanolicus* PB1

5

<400> 12

ES 2 659 730 T3

Met Thr Lys Thr Lys Phe Phe Ile Pro Ser Ser Thr Val Phe Gly Arg
 1 5 10 15

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

Lys Ala Leu Ile Val Thr Asp Ala Phe Leu His Ser Thr Gly Leu Ser
 35 40 45

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

Phe Pro Lys Ala Gln Pro Asp Pro Ala Asp Thr Gln Val His Glu Gly
 65 70 75 80

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

Gly Gly Ser Ser His Asp Thr Ala Lys Gly Ile Gly Leu Val Ala Ala
 100 105 110

Asn Gly Gly Arg Ile Asn Asp Tyr Gln Gly Val Asn Ser Val Glu Lys
 115 120 125

Gln Val Val Pro Gln Ile Ala Ile Thr Thr Thr Ala Gly Thr Gly Ser
 130 135 140

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

Met Pro Val Ile Asp Glu Lys Ile Thr Pro Thr Val Ala Ile Val Asp
 165 170 175

Pro Glu Leu Met Val Lys Lys Pro Ala Gly Leu Thr Ile Ala Thr Gly
 180 185 190

Met Asp Ala Leu Ser His Ala Ile Glu Ala Tyr Val Ala Lys Arg Ala

ES 2 659 730 T3

<220>
 <223> cebador inverso con18

 5 <400> 14
 aaccatggca aacaaagggg atgtatgtat g 31

 <210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso con41

 15 <400> 15
 aggatcccct cggttttgc gtattac 27

 <210> 16
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso con43

 25 <400> 16
 tggatcctct tcgtcttgg cgaattac 28

 <210> 17
 <211> 26
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo mdh-MGA3

 35 <400> 17
 catatgacaa caaactttt cattcc 26

 40 <210> 18
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> cebador inverso mdh-MGA3

 <400> 18
 50 ctcgagcata gcgttttga tgatttgg 29

 <210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> cebador directo mdh2-MGA3

 <400> 19
 60 catatgacaa aactcaaag tgc 23

 <210> 20
 <211> 28
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 659 730 T3

<220>
 <223> cebador inverso mdh2-MGA3

 <400> 20
 5 ctcgagcatc gcatttttaa taatttgg 28

 <210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo mdh3-MGA3

 <400> 21
 15 catatgaaaa acactcaaag tgcattttac 30

 <210> 22
 <211> 29
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso mdh3-MGA3

 <400> 22
 25 ctcgagcata gcgttttga tgatttgg 29

 <210> 23
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo act-MGA3

 <400> 23
 35 aaacatatgg gaaaattatt tgagg 25

 <210> 24
 <211> 30
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso act-MGA3

 <400> 24
 45 aaactcgagt ttattttga gagcctctg 30

 <210> 25
 <211> 31
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo mdh-PB1

 <400> 25
 55 atacatatga cgcaaagaaa cttttcatt c 31

 <210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 65

ES 2 659 730 T3

	<220> <223> cebador inverso mdh-PB1	
5	<400> 26 atactcgagc agagcgttt tgatgattg	30
10	<210> 27 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador directo mdh1-PB1	
	<400> 27 atacatatga ctaaaacaaa attttcatt c	31
20	<210> 28 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador directo mdh2-PB1	
	<400> 28 atacatatga caaacactca aagtatattt tac	33
30	<210> 29 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador inverso mdh2-PB1	
	<400> 29 atactcgagc atagcatttt taataattg tataac	36
40	<210> 30 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador directo act-PB1	
50	<400> 30 tttcatatg ggaaaattat ttgaggaaa	29
55	<210> 31 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso act-PB1	
60	<400> 31 tttctcgag tttattttg agagcctctt g	31
65	<210> 32 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 659 730 T3

<220>
 <223> cebador directo nudF

 5 <400> 32
 tttcatatg aaatcattag aagaaaaaac aattg 35

 <210> 33
 <211> 30
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso nudF

 15 <400> 33
 ttttctcgag tttttgtgct tggagcgcct 30

 <210> 34
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo mdh-MGA3
 25 <400> 34
 attccaccag ccagcgtaat 20

 <210> 35
 <211> 26
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso mdh-MGA3
 35 <400> 35
 cttagctcca atttgcttaa gtcttg 26

 <210> 36
 <211> 26
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo mdh2-MGA3
 45 <400> 36
 ggatacatgt caaacactca aagtgc 26

 <210> 37
 <211> 31
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso mdh2-MGA3

 <400> 37
 60 tctagacacc atcgcathtt taataatttg g 31

 <210> 38
 <211> 26
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 659 730 T3

<220>
 <223> cebador directo mdh3-MGA3

 5 <400> 38
 ggatacatgt aaaacactca aagtgc 26

 <210> 39
 <211> 34
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso mdh3-MGA3

 15 <400> 39
 tctagacacc atagcatttt taataatttg gatg 34

 <210> 40
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo mdh-PB1
 25 <400> 40
 tccaccagct agcgttaattg g 21

 <210> 41
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso mdh-PB1
 35 <400> 41
 aacctgtgcc atgaagaaat gc 22

 <210> 42
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador directo mdh1-MGA3
 45 <400> 42
 tccatcatcc actgtatttg g 21

 <210> 43
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador inverso mdh1-PB1
 55 <400> 43
 acctgtgctg tgaaggaatg c 21

 <210> 44
 <211> 23
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 65 <220>

ES 2 659 730 T3

<223> cebador directo mdh2-PB1

5 <400> 44
cgtgaagctg gtgtggaagt att 23

<210> 45
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador inverso mdh2-PB1

15 <400> 45
tccaaacctt ctgcgacgtt 20

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico, que codifica un polipéptido que tiene actividad alcohol deshidrogenasa, en particular actividad metanol deshidrogenasa, que comprende o tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- 5 (i) una secuencia de nucleótidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 (*mdh2*-MGA3), 3 (*mdh3*-MGA3), o 5 (*mdh2*-PB1);
(ii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, más particularmente al menos un 91, 92, 93 o 94 % de identidad de secuencia, con una secuencia de nucleótidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 o 5;
- 10 (iii) una secuencia de nucleótidos que está degenerada con una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 3 o 5;
(iv) una secuencia de nucleótidos que es una parte de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3 o 5, o de una secuencia de nucleótidos que está degenerada con una secuencia de SEQ ID NO: 1, 3 o 5;
- 15 (v) una secuencia de nucleótidos que codifica todo o parte de un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 (*Mdh2*-MGA3), 4 (*Mdh3*-MGA3) o 6 (*Mdh2*-PB1); y
(vi) una secuencia de nucleótidos que codifica todo o parte de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 91, 92, 93 o 94 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las
- 20 SEQ ID NO: 2, 4 o 6;
- o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de (i) a (vi).
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia, más particularmente al menos un 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia, con una secuencia de nucleótidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3 o 5.
- 25 3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2, en la que dicha secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos como se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5.
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de la SEQ ID NO: 2, 4 o 6.
- 30 5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4, en la que dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6.
6. Un polipéptido que tiene actividad alcohol deshidrogenasa, en particular actividad metanol deshidrogenasa, y que comprende o tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- 35 (i) todo o parte de una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6; y
(ii) todo o parte de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 91, 92, 93 o 94 % de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6.
- 40 7. El polipéptido de la reivindicación 6, en el que dicha secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6.
8. El polipéptido de la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4 o 6.
- 45 9. Una construcción que comprende una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
10. La construcción de la reivindicación 9 en la que la molécula de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión heteróloga.
- 50 11. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico o construcción como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 9.
12. Un microorganismo huésped en el que se ha introducido una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha molécula está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión heteróloga, o un vector como se define en la reivindicación 11.

13. El microorganismo huésped de la reivindicación 12, en el que el microorganismo huésped es una bacteria seleccionada de entre el género *Escherichia*, *Corynebacterium* o *Bacillus*.
14. El microorganismo huésped de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el microorganismo huésped es *E. coli*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* o *B. methanolicus*.
- 5 15. Un procedimiento para la introducción o modificación de la actividad alcohol deshidrogenasa, y en particular actividad MDH, en un microorganismo huésped, comprendiendo dicho procedimiento la introducción en dicho microorganismo de una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y el cultivo de dicho microorganismo en condiciones en las que dicha molécula de ácido nucleico se exprese.

Figura 1

```

mdh MGA3          1 atgac---aa-----caaact---ttttcattccaccagccagcgtaat
mdh-PB1          1 .....gca..-----g.....-----.....t.....
mdh1-PB1         1 .....taa..-----a.....-----t..t..ct..t.
mdh2 MGA3        1 .....---.acact...g.gcat...t..g..tt..t..atc..t.
mdh3 MGA3        1 .....a---.acact...g.gcat...a..g..tt..t..atc..t.
mdh2-PB1         1 .....---.acact...g.atat...a..a..tt..t..att.gt.

mdh MGA3          39 tggacgcggtgcagtaaaggaagtaggaacaagacttaagcaaattggag
mdh-PB1          42 .....c..t.....a.....-----.....
mdh1-PB1         42 .....a..c..t.....tg.....a..agct.....
mdh2 MGA3        48 ..tgca..at...t..t..g..t.....tc..t.agctg.tc...t.
mdh3 MGA3        48 ..tgca..ct.t..t..t..g..t.....tc..t.agctggtc...t.
mdh2-PB1         48 ..t.ca..at.t..t..t..g..t.....tc..t.agctggcc....c.

mdh MGA3          89 ctaagaaagcgcttatcgttacagatgcattccttcacagcacaggttta
mdh-PB1          92 ...ca.....a.....-----t.....tg.....g
mdh1-PB1         92 ...c.....a.....c.....-----g
mdh2 MGA3        98 tg..a.....tt.at.a.....tggt.....g.ttt...c.t
mdh3 MGA3        98 tg..a.....tt.at.a.....tggt.....ttt...cc.t
mdh2-PB1         98 tg..a.....tt.at.a.....tggt.....g..tt...c.t

mdh MGA3          139 tctgaagaagttgctaaaaacattcgtgaagctggcggttgatggtgcat
mdh-PB1          142 ..a.....c.....c.....ta..
mdh1-PB1         142 ..a.....c.....ta..
mdh2 MGA3        148 .....a..a..t.c.gt.tt.....c.....t..g..a..at.c..
mdh3 MGA3        148 .....a..a..cggt.t.....t..g..a..a..t..
mdh2-PB1         148 .....a..a..c.gt.t.....t..g..a..atta..

mdh MGA3          189 tttccaaaagctcaaccagatccagcagatacacaagttcatgaagggtg
mdh-PB1          192 .....c.....
mdh1-PB1         192 ..t..t.....c.....
mdh2 MGA3        198 ..t.....cg.....a.....a.c....a.a.c..cgca.....t
mdh3 MGA3        198 ..t.....cg.....a.....a.t....a.a.c..cgca.....t
mdh2-PB1         198 ..t.....cg.....a.....a.t....a.a.c..cgca.....t

mdh MGA3          239 tagatgtattcaaacaagaaaactgtgattcacttgtttctatcggtgga
mdh-PB1          242 .....a.....a.....g.....
mdh1-PB1         242 .....g.....a.....g.....
mdh2 MGA3        248 ...a.cg.at..cgct.....cagca....ca..c.g..c..c
mdh3 MGA3        248 ...a.cg.at..cgct.....cagca....ca..c.t..c..c
mdh2-PB1         248 .g..a..g.at..cgct.....cagca....ca..t.g..c..c

mdh MGA3          289 ggtagctctcacgatacagctaaagcaatcggttagttgcagcaaacgg
mdh-PB1          292 .....a.....
mdh1-PB1         292 ..c.....a.....g.....c.....
mdh2 MGA3        298 ..a..t..a..t..g.c.ga....c..t.ca....a..t..t..t..
mdh3 MGA3        298 ..a.....a..t..g.t.ga....c..t.ca....a..t..t..t..
mdh2-PB1         298 ..a.....g..t..g.t.ga....gc..t.ca....a..t..t..t..

mdh MGA3          339 cggaagaatcaatgactatcaaggtgtaaacagcgtagaaaaaccagtcg
mdh-PB1          342 .....c.....t.....g..t.
mdh1-PB1         342 .....c.....t..t.....a.....
mdh2 MGA3        348 t....a..tc.c.t..g.....cg.tgtatc.a..g....a.g.
mdh3 MGA3        348 t....c..tc.c.t..g.....cg.tgtatc.a.....a.g.
mdh2-PB1         348 t....c..tt.c.t..g.....cg.t.aatc.a.....a.g.

```

Figura 1 cont.

```

mdh MGA3      389  ttccagtagttgcaatcactacaacagctggtactggtagtgaacaaca
mdh-PB1      392  .....
mdh1-PB1     392  ....caga.....a.....
mdh2 MGA3    398  .c.gc.a...g.t.a.....a.c.....tt...t
mdh3 MGA3    398  .c.tc.a...g.t.a.....a.c.....tt...t
mdh2-PB1     398  .c.gc.ca...g.t.a.....a.c.....tt...t

mdh MGA3      439  tctcttgcggttattacagactctgcacgtaaagtaaaaatgcctgttat
mdh-PB1      442  .....t.....a.....
mdh1-PB1     442  .....g.....
mdh2 MGA3    448  aat.ca.aa.c.c.....ta...a...c.....g.....g.ca.g.
mdh3 MGA3    448  aat.ca.aa.c.c.....ta...a...c.....g.....g.ca.g.
mdh2-PB1     448  agat..a.aa.c.c.....ta...a.....g.....g.ga.g.

mdh MGA3      489  tgatgagaaaattactccaactgtagcaattggtgaccagaattaatgg
mdh-PB1      492  c.....a.....
mdh1-PB1     492  .....a.....
mdh2 MGA3    498  g...a.ac.tg.a...t.ac.tt...caac.....gc.....
mdh3 MGA3    498  ...a.ac.tg.a...t.ac.tt...caa.....gc.....
mdh2-PB1     498  ...a.ac.tg.a...t.ac.tt...caac.....c.....

mdh MGA3      539  tgaaaaaaccagctggattaacaatcgcaactggtatggatgcattgtcc
mdh-PB1      542  .....t.....a...
mdh1-PB1     542  .....a.....a...
mdh2 MGA3    548  .tgg..tg..tc.gtcc....tgct..t....at.a.....aa.t
mdh3 MGA3    548  .tgg..tg..tc.gtcc....gct..t....at.a.....aa.t
mdh2-PB1     548  .cgg..tg..tc.gtct....gct..t....at.a.....aa.t

mdh MGA3      589  catgcaattgaagcatatggtgcaaaagggtctacaccagttactgatgc
mdh-PB1      592  .....c.....
mdh1-PB1     592  .....c.....
mdh2 MGA3    598  .....t..ct.....t..a...a....
mdh3 MGA3    598  .....g.....t..ct.....t..a...a....
mdh2-PB1     598  .....t.....t..cg.c.....t..a...a....

mdh MGA3      639  atttgctattcaagcaatgaaacttatcaatgaatacttaccaaaagcgg
mdh-PB1      642  g.....c..t.....cgt....
mdh1-PB1     642  .....g.....c..t.....
mdh2 MGA3    648  .c....a....g.g.c...a.c.ttc.a.....g.gcgt..a.
mdh3 MGA3    648  .c....a....g.g.c...a...ttc.a.....g.gcgt..a.
mdh2-PB1     648  .c....c....g.g.c...a.c.ttc.a.....g..cgt..at

mdh MGA3      689  ttgcgaacgggagaagacatcgaagcacgtgaaaaaatggcttatgcacaa
mdh-PB1      692  ...a..t.....gc.....
mdh1-PB1     692  ...a..t.....gc.....
mdh2 MGA3    698  ...a..t..a.....t.....c.....c.tc..t...
mdh3 MGA3    698  ...a..t..a.....t.....c.....c.tc.....
mdh2-PB1     698  ...a..t.ca...t..g.....gc.....c.tc..t...

mdh MGA3      739  tacatggcaggagtggcatttaacaacgggtggttaggactagttcactc
mdh-PB1      742  .....a.....t...a....
mdh1-PB1     742  .....t...a.....t...a....
mdh2 MGA3    748  .cat.a..t..ca.....c..t...cg.....ctat....tg.
mdh3 MGA3    748  .cat.a..t..ca.....c..t...cg.....ctat....tg.
mdh2-PB1     748  .cat.a..t..ta.....t...c.tc.....ctat....tg.

```

ES 2 659 730 T3

Figura 1 cont.

mdh MGA3	789	tatttctcaccaagtaggtggagtttacaaattacaacacggaatctgta
mdh-PB1	792g.....
mdh1-PB1	792
mdh2 MGA3	798	g...g.a.....t...a...t.c.....c.c.ct..t..cg.t..c.
mdh3 MGA3	798	g...g.a.....t...a...t.c.....c.c.ct..t..cg.t..c.
mdh2-PB1	798	a...g.a.....t.t..c...t.c.....c.c.ct..t..cg.t..c.
mdh MGA3	839	actcagttaatatgccacacgtttgcgcatcacaacctaatgctaaaact
mdh-PB1	842ca.....t.....cgt...
mdh1-PB1	842gta.....t.....ca.....t.....cgt...
mdh2 MGA3	848	.tg.g..cct.c.....t..a..tcg...t...t.....t....gtg
mdh3 MGA3	848	.tg.ga.cct.c.....g..t....tcgt.....t.....t....gtg
mdh2-PB1	848	.tg.ga.cct.c.....t..a...cg...t..tt.....t....gtg
mdh MGA3	889	gagcgttcgcacacattgctgagcttttaggtgagaatggtgctggctt
mdh-PB1	892	..a.....c.....t.....
mdh1-PB1	892	..a.....c.....t.....
mdh2 MGA3	898	..a..t.at..g.a..c....ctt..c.t....a.....c.ac..tc.
mdh3 MGA3	898	..a..t.at..g.a..c....ctt..c.t....a.....c.ac...c.
mdh2-PB1	898	..a..t..t..g.a.....ct..cc.....a.....c.c.c.c.
mdh MGA3	939	aagcaactgcagcagctgctgagagagcaattgtagctcttgaaagaatca
mdh-PB1	942t.t.....g...c.c.ctat.
mdh1-PB1	942t.t.....a.a...a.....c.g.....c.cta..
mdh2 MGA3	948	...t..gtac.at..a.....a.a...t...aa...ga.c.....gg
mdh3 MGA3	948ctac.a...a.....a.a...t...aa...ga.c.....gg
mdh2-PB1	948	...t...cgc.a...a.....a.a..gt...aa...ga.c.....gg
mdh MGA3	989	acaaatccttcgggtatcccctctggctatgcagaaatggcgtgaaagaa
mdh-PB1	992aa.....a.....
mdh1-PB1	992	...g.aa.....t.....a.....aa..c.....a.....
mdh2 MGA3	998	ct...ga.c.taac..t...aaa...t.aa...c.a..t.ct.....
mdh3 MGA3	998	ct.g.ga.c.taac..t...aaa...t.aa...c.a..t.ct.....
mdh2-PB1	998	ct...ga.c.taac..t...aga...t.aa...c...t.ct.....
mdh MGA3	1039	gaggatatcgaattattagcgaaaaacgcatacgaagacgtatgtactca
mdh-PB1	1042c.....g...c.....t
mdh1-PB1	1042	..a.....a..c.....atgc...t.....t
mdh2 MGA3	1048	..a..c..t..gact.....t..g..t..gatga...t.c...g.att
mdh3 MGA3	1048	..a.....t..gact.....t.....t..gatga.t..t.c...g.att
mdh2-PB1	1048	..a..c..t.tgact.....tg...t..gatga...t.c.acgg.att
mdh MGA3	1089	aagcaaccacgcggttcctactgttcaagacattgcacaaatcatcaaaa
mdh-PB1	1092	.gat.....t.....
mdh1-PB1	1092	.ga.....t..t..c.....g.....ca.....
mdh2 MGA3	1098	..ca..t..t..taaa...agt.ag...ag.catc....t..t....
mdh3 MGA3	1098	..ca..t..t..taaa...agt.ag...ag.catc....t..t....
mdh2-PB1	1098	..ca..t..t..taaa...agt.gg...ag..at.....t..t....
mdh MGA3	1139	acgctatgtaa (SEQ ID NO:7)
mdh-PB1	1142c..... (SEQ ID NO:9)
mdh1-PB1	1142c..... (SEQ ID NO:11)
mdh2 MGA3	1148	.t..g..... (SEQ ID NO:1)
mdh3 MGA3	1148	.t..... (SEQ ID NO:3)
mdh2-PB1	1148	.t..... (SEQ ID NO:5)

Figura 2

(A)

```

mdh MGA3 proteína 1 ---mt-t-n---ffippasvigrgavkevgrlkgigakkalivtdaflh
mdh PB1 proteína 1 ---.-qr.---.....t.....
mdh1 PB1 proteína 1 ---.k-k---...sst.f.....a...a...t.....
mdh2 MGA3 proteína 1 ---.-n-tqsa..m.svnlf.a.s.n.....adl.v....l...g..
mdh3 MGA3 proteína 1 mkntq-s-a---.ym.svnlf.a.s.n.....agl.v....l...g..
mdh2 PB1 proteína 1 ---.-n-tqsi.y..svnlf.p.s.n.....agl.v....l...g..

mdh MGA3 proteína 43 stglseevaknireagvdvaiifpkagppadpqvhegvdvfkqencdslv
mdh PB1 proteína 44 g.....l.av.....i...k.a..
mdh1 PB1 proteína 44 .....l.v.....e.....k.a..
mdh2 MGA3 proteína 46 gl...kissi..a...e.s...e.n.t.kn.a..leayna....i.
mdh3 MGA3 proteína 46 .l...ki.gi.....e.....e.n.t.kn.a..leayna....i.
mdh2 PB1 proteína 46 gl...ki.si.....e.l....e.n.t.kn.a..le.yna....i.

mdh MGA3 proteína 93 sigggsshtakaiglvaanggrindyqgvnsvekpvpvvaaittttagtg
mdh PB1 proteína 94 .....
mdh1 PB1 proteína 94 .....g.....q...qi.....
mdh2 MGA3 proteína 96 tl.....ag...a.....k.h.e..dvske.m.li.n.....
mdh3 MGA3 proteína 96 tl.....ag...a.....t.h.e..dvske.m.li.n.....
mdh2 PB1 proteína 96 tl.....ag.g.a.....t.y..e..dsk.m.li.n.....

mdh MGA3 proteína 143 settslavitdsarkvmpvidekitptvaivdpelmvkpagltiatgm
mdh PB1 proteína 144 .....
mdh1 PB1 proteína 144 .....
mdh2 MGA3 proteína146 ..l.kfti...te....aiv.khv...ls.n.....gm.ps..a...l
mdh3 MGA3 proteína146 ..l.kfti...te....aiv.khv...ls.n.....gm.ps..a...l
mdh2 PB1 proteína 146 ..l.rfti...te....aiv.khv...ls.n.....gm.ps..a...l

mdh MGA3 proteína 193 dalshaieayvakgatpvtdafaiqamklineylpkavangediearekm
mdh PB1 proteína 194 .....r.....r.....a.
mdh1 PB1 proteína 194 .....r.....a.
mdh2 MGA3 proteína196 ...t.....st...i...l...i.i.sk...r....k.....q.
mdh3 MGA3 proteína196 ...t.....st...i...l...i.i.sk...r....k.....q.
mdh2 PB1 proteína 196 ...t.....sta...i...l...i.i.sk...r.f...k.m....q.

mdh MGA3 proteína 243 ayaqymagvafnngglglvhsishqvggyklqhgicnsvnmphvcafnl
mdh PB1 proteína 244 .....q...
mdh1 PB1 proteína 244 .....v....q...
mdh2 MGA3 proteína246 .f..sl..m...a...y..a.a..l..f.nfp..v..a.ll.y.r...
mdh3 MGA3 proteína246 .f..sl..m...a...y..a.a..l..f.nfp..v..aill...r...
mdh2 PB1 proteína 246 .f..sl..m...as..y..a.a..f..f.nfp..v..aill...r...

mdh MGA3 proteína 293 iakterfahiaellgenvaglstaaaaeraivalerinksfqipsgyaem
mdh PB1 proteína 294 ..r.....s.....s.....q.y.n.....
mdh1 PB1 proteína 294 ..r.....s.....s...t.a...y.rn.....ka.
mdh2 MGA3 proteína296 .s.v..y.e..af.....d...yd...k.k.k.i..ma.dln..k.fk.l
mdh3 MGA3 proteína296 .s.v..y.e..af.....d...ye...k.k.k.i..mardln..k.fk.l
mdh2 PB1 proteína 296 .s.v...e..a.....re...kg.k.i..ma.dln..r.fk.l

mdh MGA3 proteína 343 gvkeediellaknayedvctqsnprvptvqdiaqiiknam (SEQ ID NO:8)
mdh PB1 proteína 344 .....n...q...ld.....l (SEQ ID NO:10)
mdh1 PB1 proteína 344 .....n.mq...ld.....q.....l (SEQ ID NO:12)
mdh2 MGA3 proteína346 .a.....t....mk.a.alt...k.kleevi..... (SEQ ID NO:2)
mdh3 MGA3 proteína346 .a.....t....mn.a.alt...k.kleevi..... (SEQ ID NO:4)
mdh2 PB1 proteína 346 .a.....vt...e..mk.atalt...k.kleevi..... (SEQ ID NO:6)

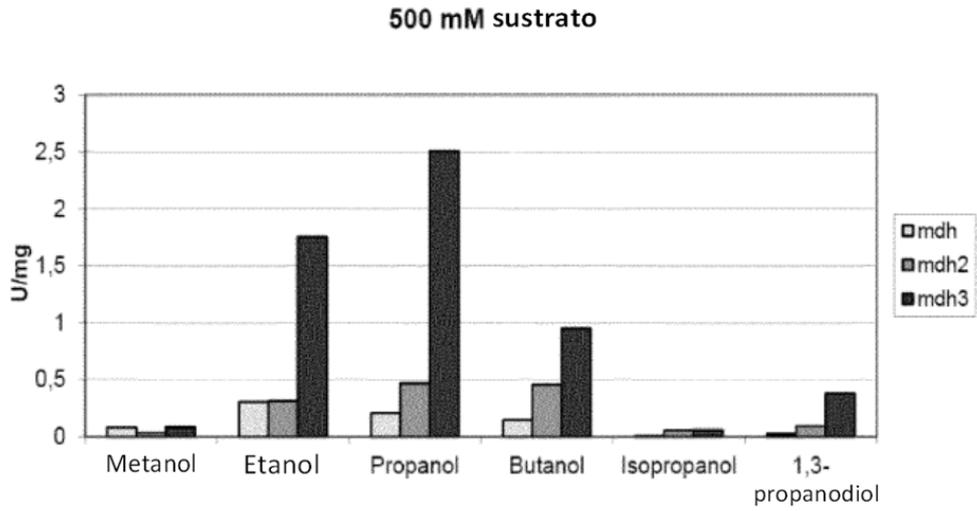
```

Figura 2 cont.
(B)

Secuencia	Inicio	Final	Coincidencia	No coincidencia	% de coincidencia
mdh2 MGA3 proteína	1	385			
mdh3 MGA3 proteína	1	385	370	15	96
mdh2 PB1 proteína	1	385	353	32	91
mdh2 MGA3 proteína	1	mtntqsaffmpsvnlfgagsvnevgtlradlgvkkallvtdaglhglgls			
mdh3 MGA3 proteína	1	.k.....y.....g.....s....			
mdh2 PB1 proteína	1i.yi.....p.....g.....			
mdh2 MGA3 proteína	51	ekissiiraagvevsifpkaepnptdknvaegleaynaencdsivtlggg			
mdh3 MGA3 proteína	51	...ag...e.....a.....			
mdh2 PB1 proteína	51	...a....e.....l.....v.....			
mdh2 MGA3 proteína	101	sshdagkaialvaanggkihdyeigdvskepmpvliainttagtgselk			
mdh3 MGA3 proteína	101t.....k.....			
mdh2 PB1 proteína	101g.....t.y.....k.k.....r			
mdh2 MGA3 proteína	151	ftiitdterkvkmaivdkhvtplsindpelmvgmppsitaatgldalth			
mdh3 MGA3 proteína	151			
mdh2 PB1 proteína	151			
mdh2 MGA3 proteína	201	aieayvstgatpitdalaiqaikiiskylpravangkieareqmafaqs			
mdh3 MGA3 proteína	201			
mdh2 PB1 proteína	201a.....f.....m.....			
mdh2 MGA3 proteína	251	lagmafnnaglgvvhaiahlqggfynfphgvcnavllpyvcrfnliskve			
mdh3 MGA3 proteína	251i...h.....			
mdh2 PB1 proteína	251s.....f.....i...h.....			
mdh2 MGA3 proteína	301	ryaeiaaflgenvdglstydaaekaikaiermakdlnipkgfkelgakee			
mdh3 MGA3 proteína	301e.....r.....			
mdh2 PB1 proteína	301	.f.....l.....a....re....g.....r.....			
mdh2 MGA3 proteína	351	dietlaknamkdacaltnprkpkleeviqliknam (SEQ ID NO:2)			
mdh3 MGA3 proteína	351n..... (SEQ ID NO:4)			
mdh2 PB1 proteína	351	..v...e.....t..... (SEQ ID NO:6)			

Figura 3

(A)



(B)

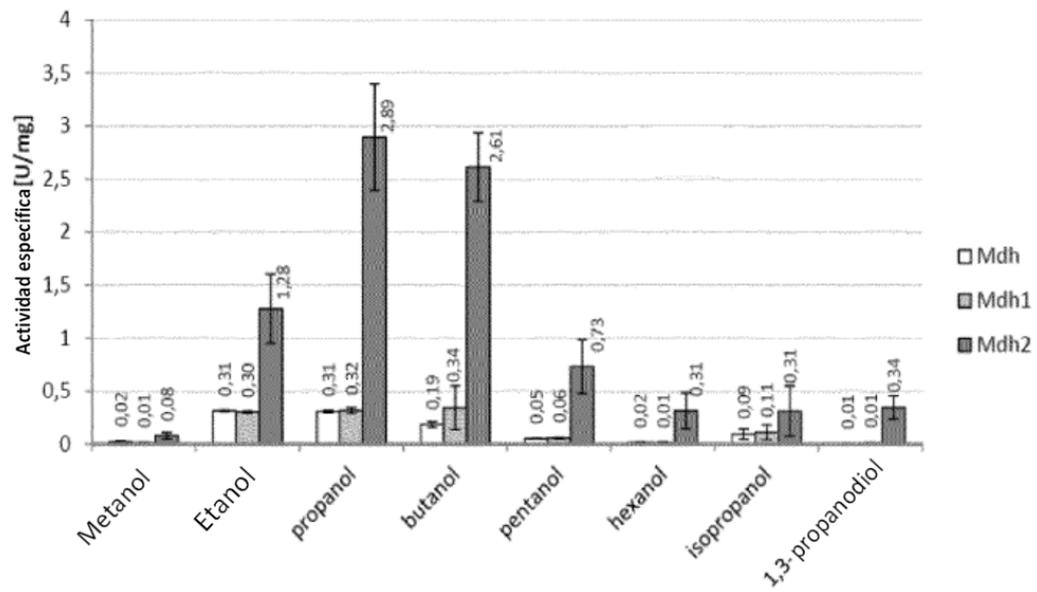
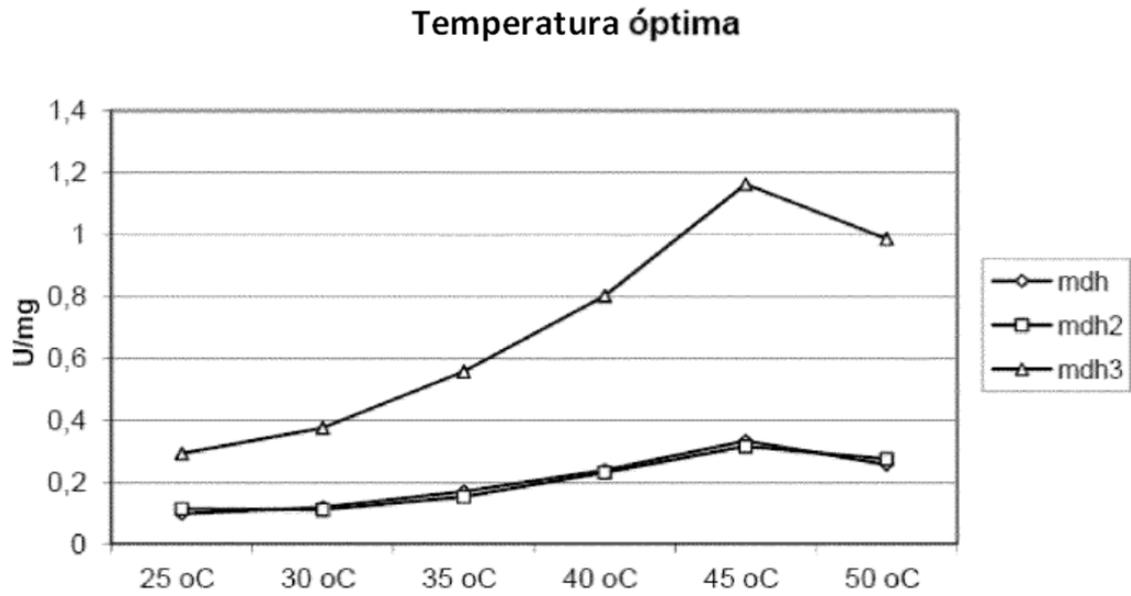


Figura 4

(A)



(B)

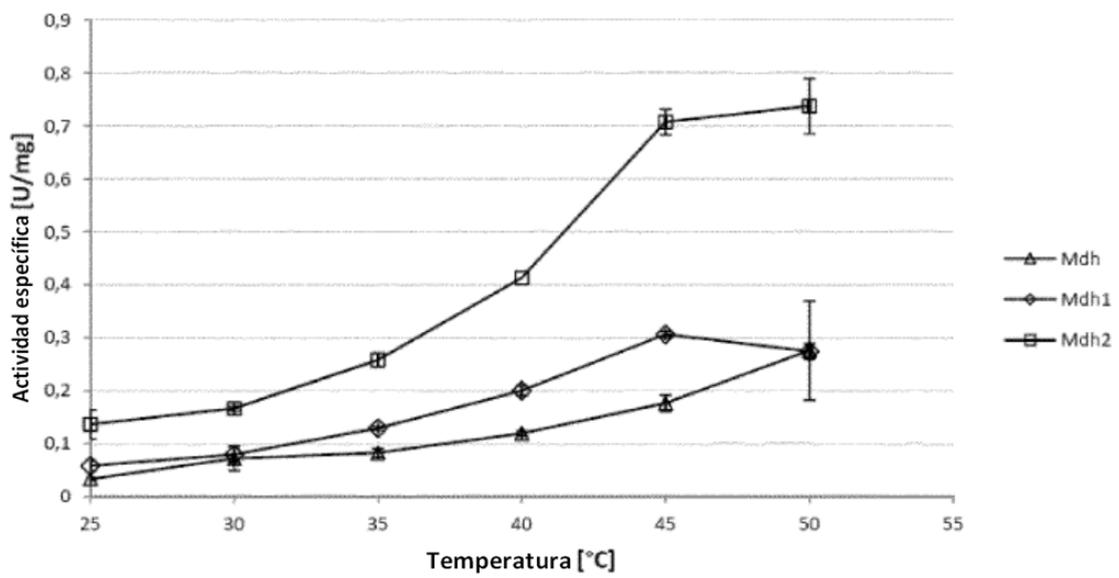
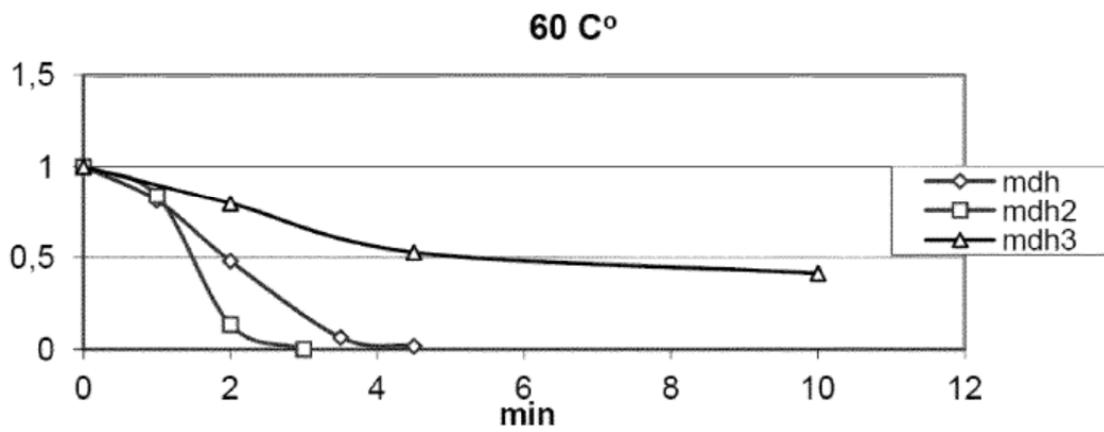
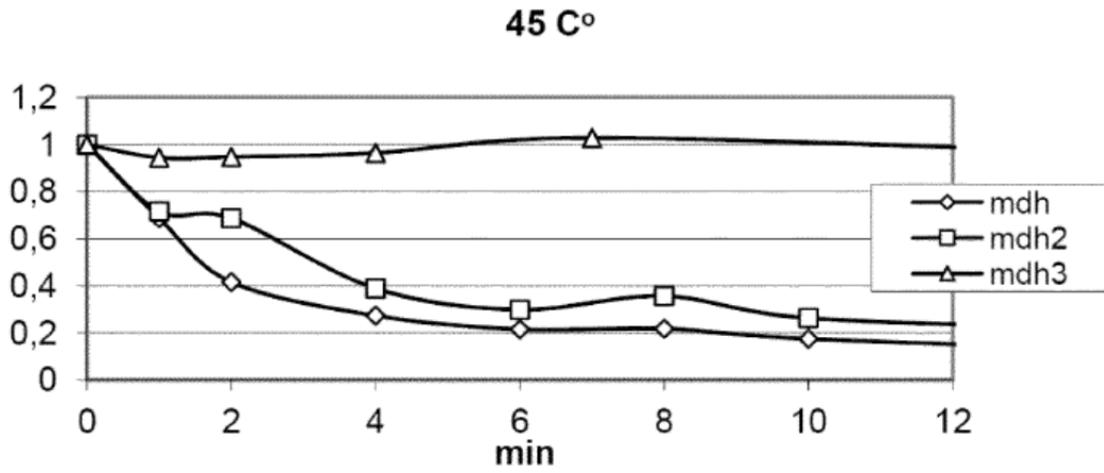


Figura 5

(A)



(B)

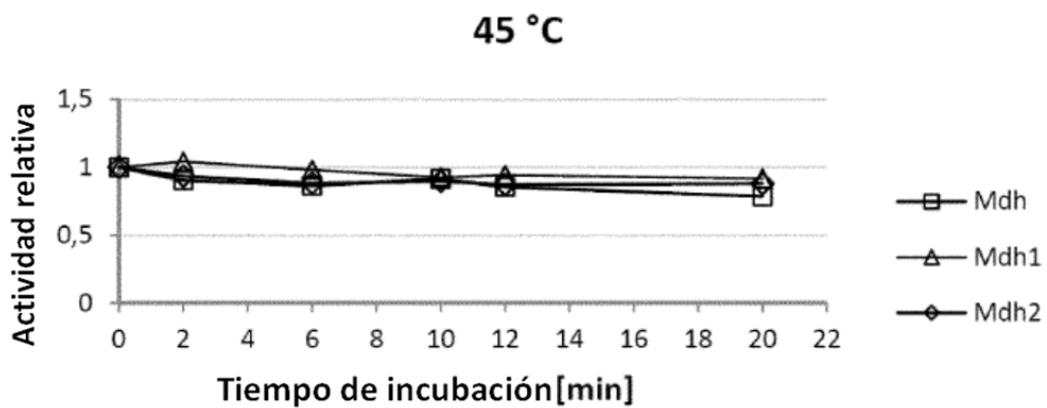


Figura 5 cont.

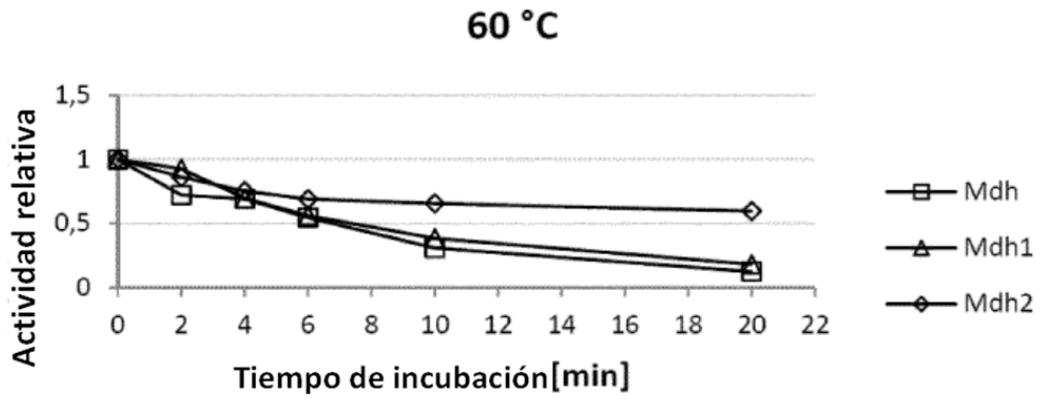
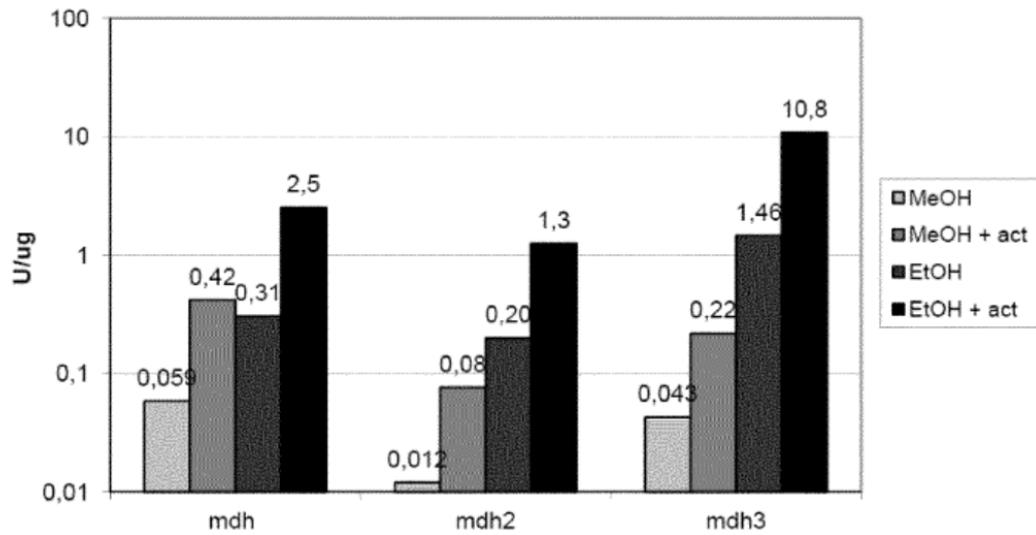


Figura 6

(A)

Activación de MDH



(B)

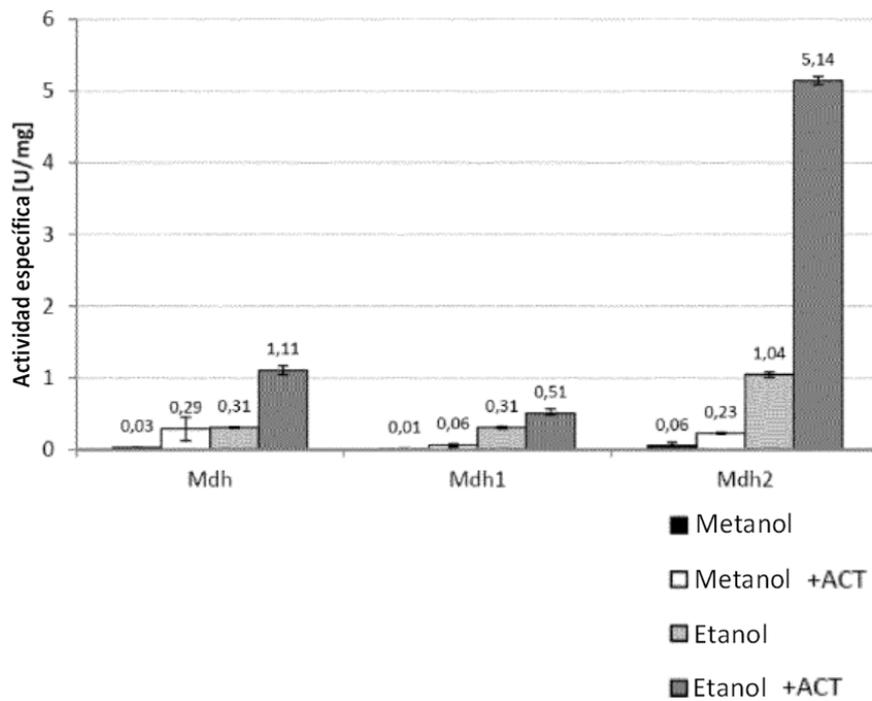


Figura 7

(A)

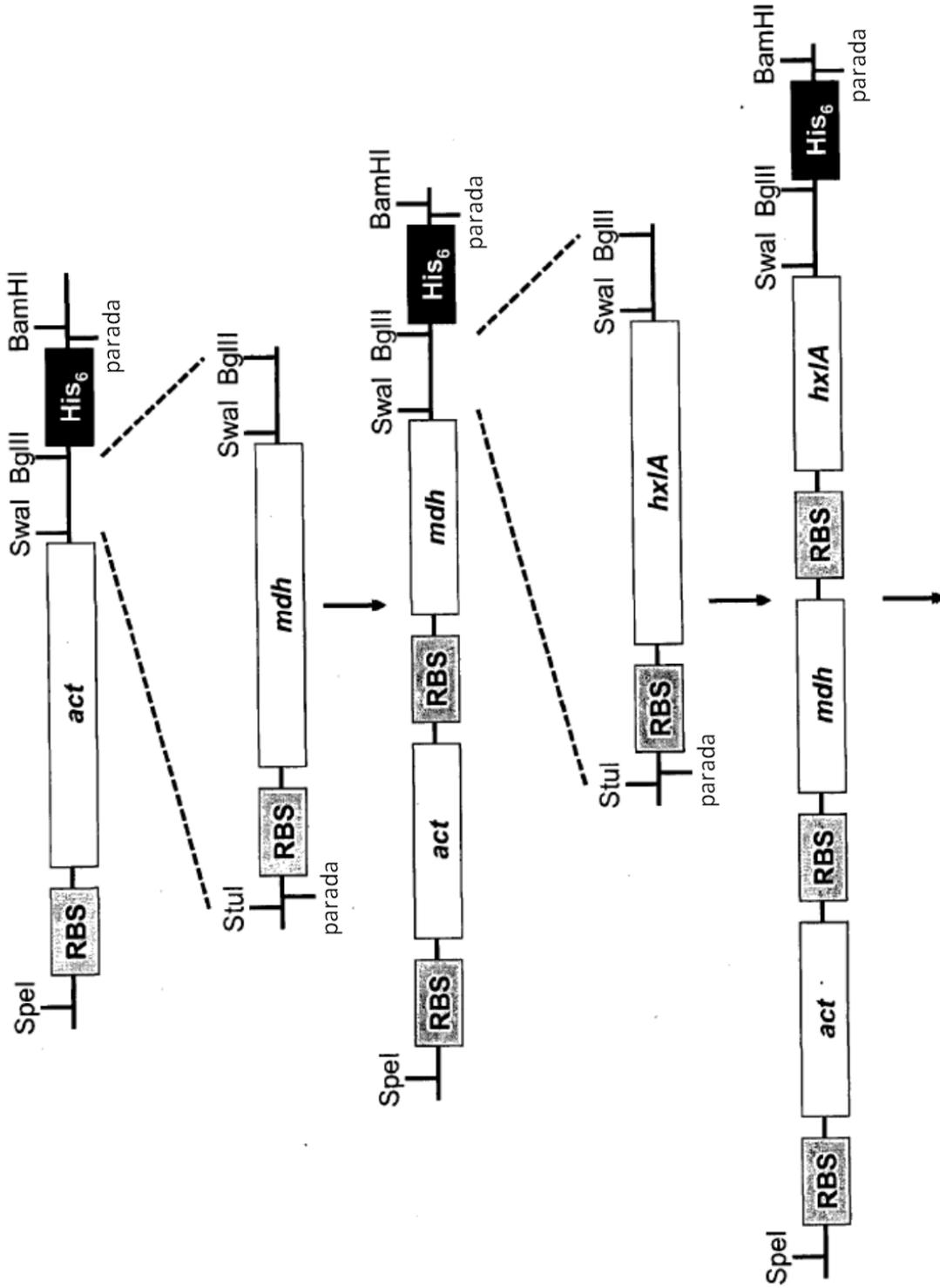


Figura 7 (cont.)

(B)

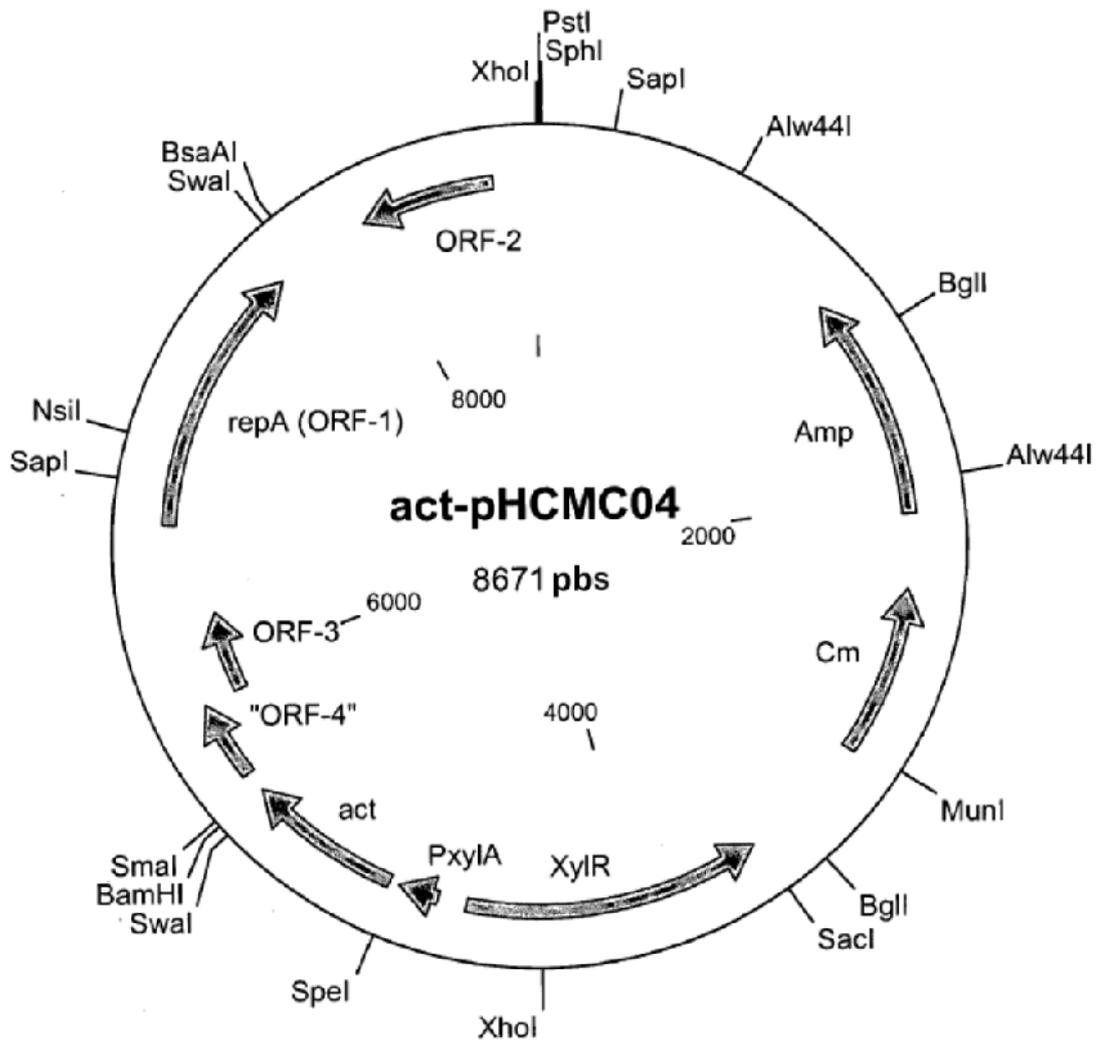
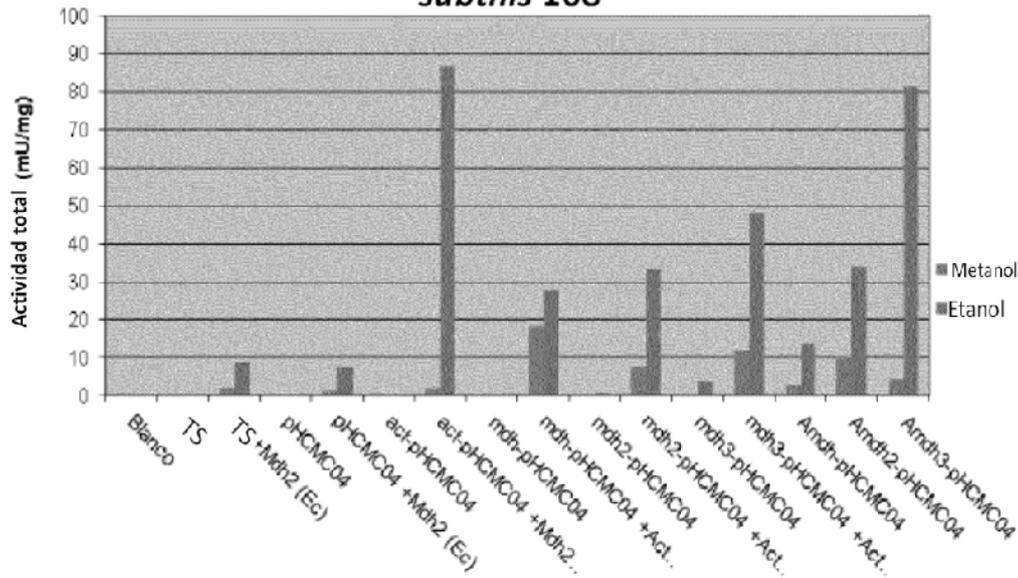


Figura 8

Actividad de Mdh con Act y Mdh producidas en *B. subtilis* 168



Abreviaturas:

Blanco =Tampón de re-suspensión;

TS = huésped tipo silvestre *B. subtilis* 168;

TS + Mdh2(Ec) = lisado de *E. coli* con Mdh2 expresada a partir del plásmido pET21a;

pHCMC04 = *B. subtilis* 168 con el vector pHCMC04 vacío;

pHCMC04+Mdh2(Ec) = pHCMC04 con lisado de *E. coli* con mdh2 expresado a partir del plásmido pET21a;

act-pHCMC04 = lisado de *B. subtilis* 168 con Act expresada a partir del plásmido pHCMC04;

act-pHCMC04+Mdh2(Ec) = act-pHCMC04 con lisado de *E. coli* con mdh2 expresado a partir del plásmido pET21a;

mdh1-pHCMC04 = lisado de *B. subtilis* 168 con mdh1 expresado a partir del plásmido pHCMC04;

mdh1-pHCMC04+Act(Ec) = mdh1-pHCMC04 con lisado de *E. coli* con act expresado a partir del plásmido pET21a;

mdh2-pHCMC04 = lisado de *B. subtilis* 168 con mdh2 expresado a partir del plásmido pHCMC04;

mdh2-pHCMC04+Act(Ec) = mdh2-pHCMC04 con lisado de *E. coli* con act expresado a partir del plásmido pET21a;

mdh3-pHCMC04 = lisado de *B. subtilis* 168 con mdh3 expresado a partir del plásmido pHCMC04;

mdh3-pHCMC04+Act(Ec) = mdh3-pHCMC04 con lisado de *E. coli* con act expresado a partir del plásmido pET21a;

Am dhl-pHCMC04 = lisado de *B. subtilis* 168 con act y m dhl expresados a partir del plásmido pHCMC04.

Am dh2-pHCMC04 = lisado de *B. subtilis* 168 con act y m dh2 expresados a partir del plásmido pHCMC04.

Am dh3-pHCMC04 = lisado de *B. subtilis* 168 con act y m dh3 expresados a partir del plásmido pHCMC04.

Figura 9

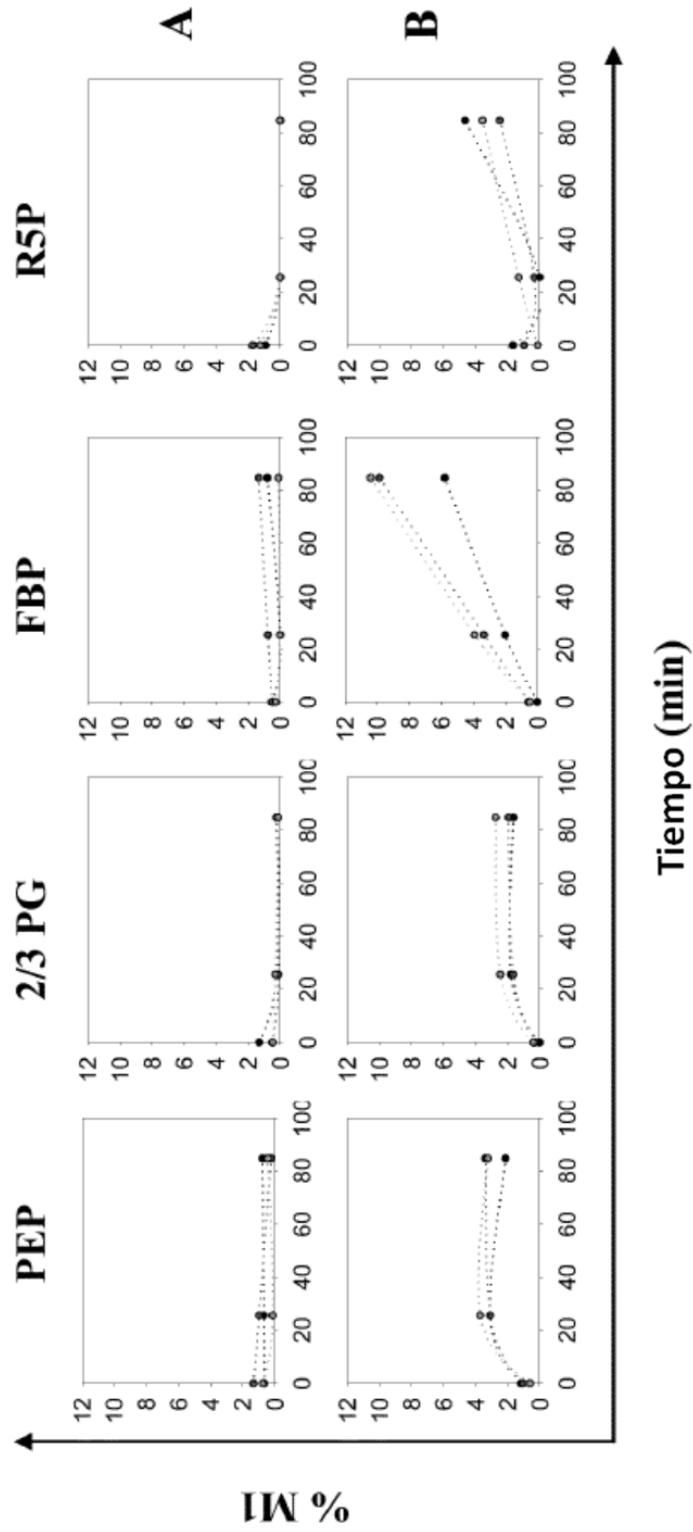


Figura 10

(A)

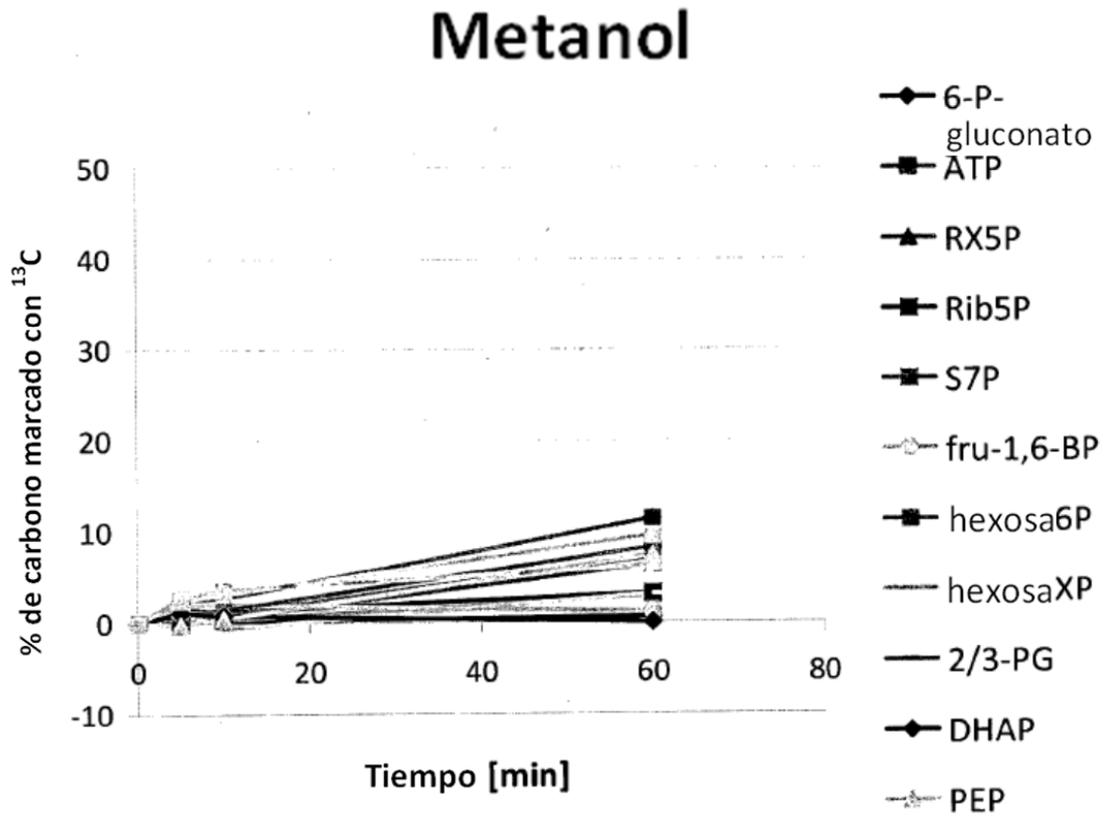


Figura 10 (cont.)

(B)

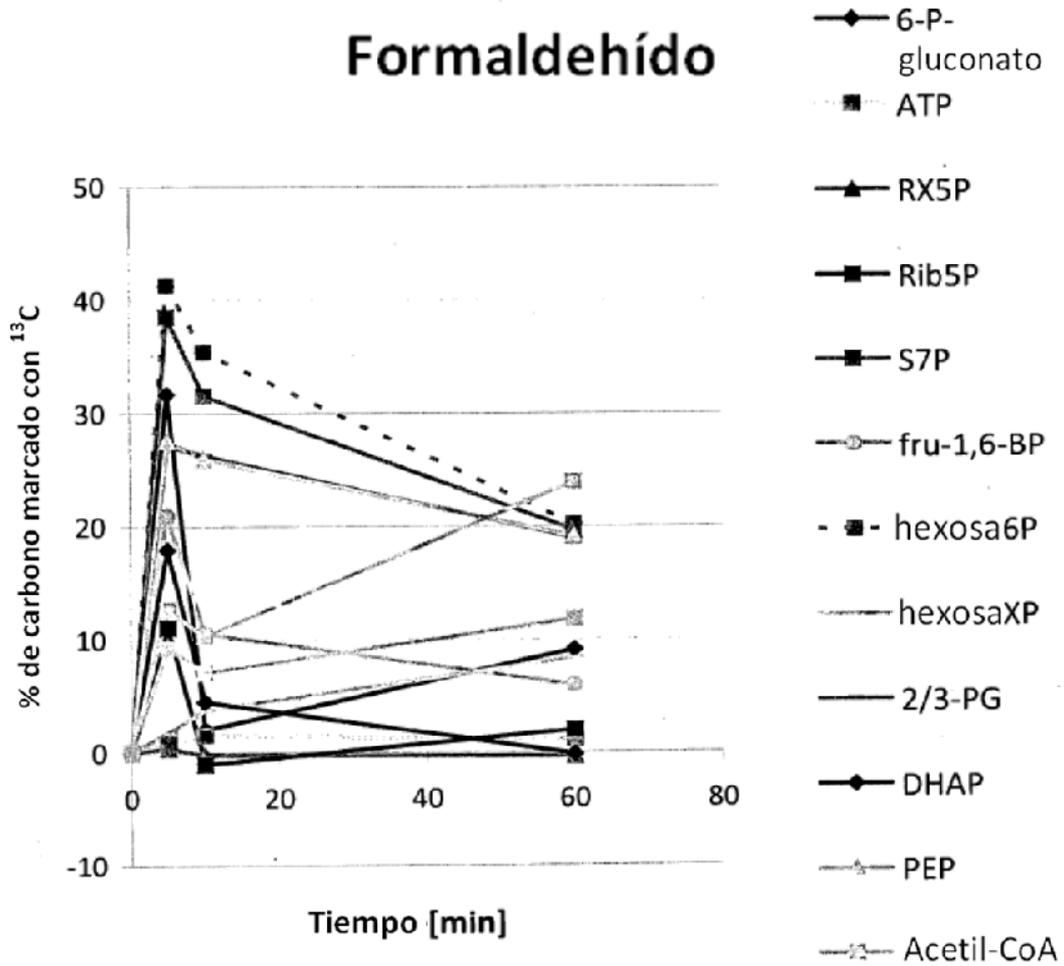


Figura 11

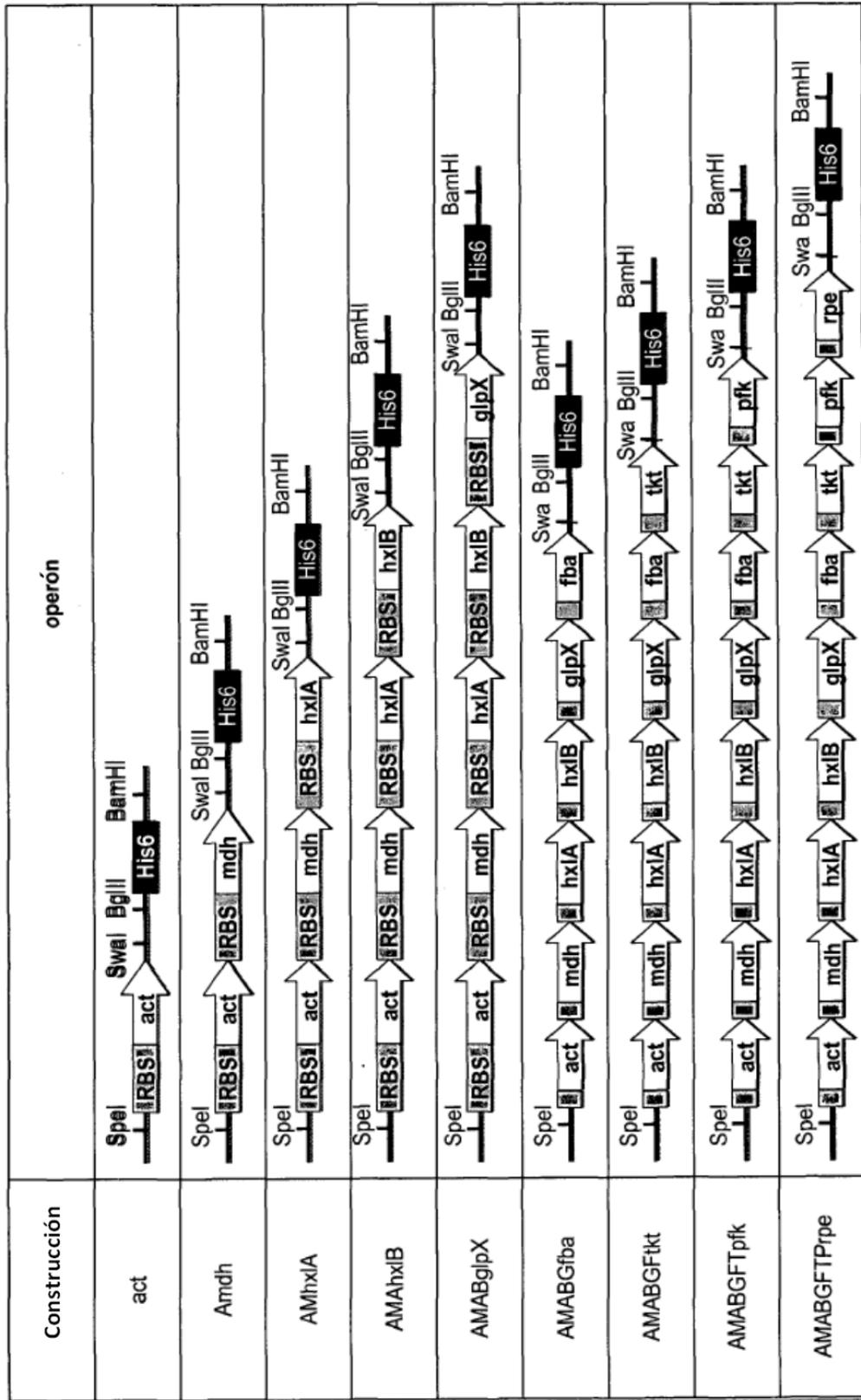


Figura 12

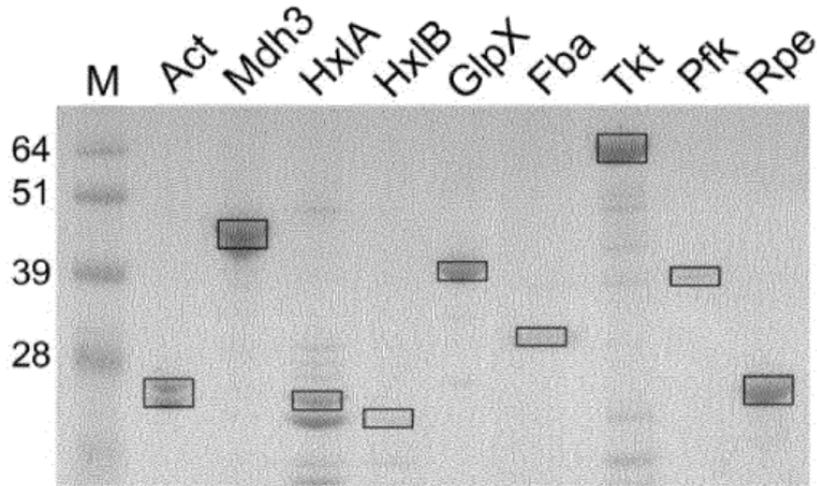


Figura 13

