

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 883**

51 Int. Cl.:

C12P 7/18 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2013 PCT/EP2013/064616**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2013 E 13734810 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2872639**

54 Título: **Microorganismo modificado para la producción de 1,3-propanodiol**

30 Prioridad:

11.07.2012 US 201261670389 P

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

18.06.2018

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES
APPLIQUEES (100.0%)
135 Avenue De Ranguel
31077 Toulouse Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**WALTHER, THOMAS y
FRANCOIS, JEAN MARIE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 672 883 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microorganismo modificado para la producción de 1,3-propanodiol.

5 La presente invención se refiere a un microorganismo modificado que puede producir 1,3-propanodiol a partir de un sustrato de carbono mediante la implementación de una ruta sintética que comprende enzimas con actividad de 2,4-dihidroxiacetato deshidrogenasa, de 2-oxo-4-hidroxiacetato descarboxilasa y de 3-hidroxiacetato reductasa, respectivamente, y que puede sintetizar 2,4-dihidroxiacetato a partir de un sustrato de carbono.

10 **Antecedentes de la invención**

El 1,3-propanodiol (PDO) es un bloque constructivo químico que encuentra su principal aplicación en la producción de poliésteres. El PDO puede utilizarse además como biocida de bajo coste y como aditivo en un gran número de productos químicos (revisión en Saxena, Anand, Saran e Isar, 2009).

15 El PDO puede producirse mediante síntesis química utilizando acroleína, óxido de etileno o glicerol como materias primas. Sin embargo, los rendimientos de producto comparativamente bajos, las duras condiciones de reacción y la producción de flujos de residuos tóxicos dificultan la producción química económica y ambientalmente respetuosa de PDO.

20 El PDO también puede ser producido por microorganismos. Algunos organismos naturales, tales como los miembros de los géneros *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridia* y *Enterobacter*, producen PDO durante la fermentación anaeróbica del glicerol, en la que la síntesis de PDO sirva para reoxidar el exceso de moléculas de NAD(P)H producidas durante la conversión del glicerol en el intermediario glucolítico dihidroxiacetato fosfato. La ruta de biosíntesis natural del PDO consiste en una glicerol deshidratasa dependiente de vitamina B12 que convierte el glicerol en 3-hidroxiacetato (3-HPA) y una 1,3-propanodiol oxidoreductasa que convierte la 3-HPA en PDO. Los genes codificantes de glicerol deshidratasa y de PDO oxidoreductasa comúnmente se agrupan en un operón junto con genes que codifican el factor de reactivación de la deshidratasa y los genes codificantes de enzimas para la asimilación del glicerol (Saxena, Anand, Saran e Isar, 2009).

30 Los últimos enfoques se han dirigido a producir PDO a partir de glucosa mediante la utilización de microorganismos manipulados genéticamente y preferentemente *Escherichia coli* (Emptage, Haynie, Laffend, Pucci y Whited, 2000) (Laffend, Nagarajan y Nakamura, 1995). *E. coli* no es naturalmente capaz de producir PDO. Este organismo está dotado de enzimas que potencian tanto la producción de glicerol (*GPD1* y *GPP2* de *Saccharomyces cerevisiae*) como la conversión del glicerol en PDO (*dhaB1-3*, *orfZ* y *orfX* de *Klebsiella pneumoniae*). Se ha encontrado que su alcohol deshidrogenasa natural dependiente de NADP, YqhD, es capaz de convertir 3-HPA en PDO, convirtiendo la expresión de una PDO oxidoreductasa adicional (por ejemplo, *dhaT*) en opcional e incluso en cierta medida menos beneficiosa. Además, todos los genes responsables de la asimilación del glicerol se habían eliminado en la cepa de producción. La atenuación del sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) y la atenuación de la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa incrementan adicionalmente el rendimiento y productividad de PDO. Esta tecnología está siendo explotada actualmente por DuPont, que ha anunciado productividades de 3,5 g/Lh, títulos de producto finales de 135 g/l y rendimientos de carbono del 51% (en peso) en 2003 (Nakamura y Whited, 2003).

45 Una desventaja significativa de dicha tecnología es la utilización del enzima glicerol deshidratasa dependiente de vitamina B12 para la biosíntesis del PDO, que requiere la complementación del caldo de fermentación con la cara vitamina B12. Además, las rutas biosintéticas de PDO que utilizan glicerol como intermediario dependen de la utilización de azúcares fermentables o glicerol como materia prima. La utilización de fuentes de carbono alternativas, tales como ácidos orgánicos de cadena corta e intermedia solos o en cofermentaciones con azúcares requiere una actividad gluconeogénica significativa, de manera que la síntesis de PDO se torna ineficiente y se limita el espectro de potenciales materias primas. El desarrollo de rutas que rindan PDO con puntos de entrada diferentes del glicerol puede, por lo tanto, contribuir fuertemente a incrementar el rendimiento de producto de azúcares, reducir los costes de producción al evitar enzimas dependientes de vitamina B12 y/o incrementar la flexibilidad metabólica para adaptar los organismos productores de PDO a un panel más grande de materias primas.

60 Recientemente se ha dado a conocer una ruta (documento nº WO2012/004247) que describe la producción de PDO partiendo de oxalacetato y que pasa por la aminación del mismo para rendir aspartato, la transformación del aspartato en homoserina, la desaminación de la homoserina que rinde 2-oxo-4-hidroxiacetato (OHB) y la conversión del OHB en PDO mediante 2-oxo-4-hidroxiacetato descarboxilasa y 1,3-propanodiol deshidrogenasa. La invención dada a conocer utiliza enzimas disponibles naturalmente para construir la secuencia de reacciones requerida. El rendimiento teórico de PDO con glucosa para dicha ruta es igual al rendimiento de producción de PDO a partir de glucosa mediante glicerol. Sin embargo, debido a que dicha ruta utiliza dos etapas de transaminación, este rendimiento teórico sólo se alcanzará en el caso de que el grupo amino pueda reciclarse por completo en las reacciones de transaminación y en el caso de que la síntesis *de novo* de glutamato consumidora de NADPH no resulte necesaria. Ello no es muy probable.

La presente invención representa una alternativa a la tecnología existente al producir PDO a partir del ácido orgánico malato sin necesidad de actividad gluconeogénica, sin la necesidad de reacciones de transaminación, costosas metabólicamente, y sin utilización de enzimas dependientes de vitamina B12. En particular, la invención comprende la producción de PDO a partir de ácido 2,4-dihidroxi-butírico (DHB) mediante una ruta sintética no natural y la expresión funcional de dicha ruta en un organismo huésped para producir zimóticamente PDO a partir de, por ejemplo, azúcares tales como la glucosa.

Descripción general de la invención

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un objeto de la presente invención es un microorganismo modificado para la producción de PDO a partir de un sustrato de carbono en el que el microorganismo comprende una ruta para la síntesis de 2,3-dihidroxi-butirato (DHB) a partir de malato y una ruta metabólica en tres etapas que comprende las etapas siguientes: una primera etapa de conversión de 2,4-dihidroxi-butirato (DHB) para obtener 2-oxo-4-hidroxi-butirato (OHB) mediante un enzima con actividad de 2,4-DHB deshidrogenasa, una segunda etapa de descarboxilación del OHB para obtener 3-hidroxi-propionaldehído mediante un enzima que presenta actividad de 2-oxo-4-hidroxi-butirato descarboxilasa, y una tercera etapa de reducción del 3-hidroxi-propionaldehído obtenido en PDO con un enzima que presenta actividad de 3-hidroxi-propionaldehído reductasa. En un aspecto preferente de la invención, el organismo modificado que expresa la ruta de conversión de DHB en PDO expresa adicionalmente una ruta de conversión de malato en DHB que comprende las etapas siguientes: una primera etapa de conversión de malato en 4-fosfo-malato mediante un enzima que presenta actividad de malato cinasa, una segunda etapa de conversión de 4-fosfo-malato en malato-4-semialdehído mediante un enzima que presenta actividad de malato semialdehído deshidrogenasa, y una tercera etapa de conversión de malato-4-semialdehído en DHB mediante un enzima que presenta actividad de malato semialdehído reductasa.

Descripción detallada de la presente invención

La presente invención se refiere a un microorganismo modificado para la producción de PDO a partir de un sustrato de carbono (que preferentemente es un azúcar o una mezcla de azúcares que preferentemente contiene glucosa), en el que dicho microorganismo comprende una ruta metabólica de tres etapas que cataliza la síntesis de PDO a partir de DHB. Debido a que DHB no se encuentra disponible naturalmente dentro de los microorganismos, dicho microorganismo adicionalmente expresa una ruta para la conversión del malato en DHB.

Según la presente invención, cada una de las tres etapas de ruta está catalizada por un enzima definido por su actividad. Dichos enzimas se encuentran codificados por los genes definidos posteriormente. Los homólogos funcionales, variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos genes y proteínas se encuentran comprendidos en la definición. Los enzimas con una o más mutaciones también se encuentran comprendidos en la presente definición con la condición de que los enzimas mutados conserven la actividad enzimática o presenten una actividad incrementada.

La denominación de dichos genes presenta un significado más general según la invención y cubre los genes correspondientes en otros organismos.

En el significado de la invención, la conversión de DHB en OHB está catalizada por un enzima que presenta actividad de DHB deshidrogenasa, dicho enzima puede obtenerse mediante por lo menos una mutación de un enzima, mejorando dicha mutación la actividad y/o afinidad de sustrato del enzima mutado para DHB.

Pueden identificarse enzimas que presentan DHB deshidrogenasa de entre los enzimas que presentan actividad de lactato deshidrogenasa soluble (citosólica) o asociada a membrana. En un aspecto más específico de la invención, la actividad de DHB deshidrogenasa soluble se encuentra codificada por *ldhA* de *Lactococcus lactis* (SEC ID n° 119) y la actividad de DHB deshidrogenasa asociada a membrana se encuentra codificada por *lldD* de *E. coli* (SEC ID n° 121).

En otro aspecto de la invención, la actividad de DHB deshidrogenasa de Ec-LldD puede mejorarse mediante la mutación de la posición Val108.

En un aspecto adicional de la invención, puede obtenerse el enzima que presenta actividad de DHB deshidrogenasa mediante la mutación de enzimas de malato deshidrogenasa naturales citosólicos o asociados a membrana.

Según otro aspecto, las malato deshidrogenasas citosólicas mutadas se encuentran codificadas por *mdh* de *E. coli* (SEC ID n° 123) o *mdh* de *Bacillus subtilis* (SEC ID n° 125) y portan mutaciones en por lo menos una de las posiciones siguientes (en referencia a *mdh* de *E. coli*, SEC ID n° 124): Ile12, Arg81, Lys82, Met85, Asp86, Val93, Ile117, Gly179, Thr211 o Met227.

Según otro aspecto, la conversión de OHB en 3-HPA está catalizada por un enzima que presenta actividad de 2-oxo-4-hidroxi-butarato descarboxilasa, dicho enzima puede obtenerse mediante por lo menos una mutación de un enzima, mejorando dicha mutación la actividad y/o la afinidad de sustrato del enzima mutado para OHB.

5 Dicha actividad puede identificarse de entre los enzimas que presentan actividad de 2-cetoácido descarboxilasa. Los genes codificantes de una actividad de 2-cetoácido descarboxilasa son bien conocidos de la técnica, incluyendo genes *pdC* de diversas especies y más particularmente los genes *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10* y *Th13* de *Saccharomyces cerevisiae*, los genes *kivD* o *kdcA* de *Lactococcus lactis*; el gen *pdC* de *Clostridium acetobutylicum*; los genes *PDC2* y *PDC3* de *Arabidopsis thaliana*; los genes *PDC1*, *PDC2* y *ARO10* de *Pichia stipitis*, y el gen *pdC* de *Zymomonas mobilis*. La primera subunidad del complejo de 2-cetoglutarato
10 descarboxilasa, codificado por el gen *sucA* de *Escherichia coli*, también presenta actividad de 2-cetoácido descarboxilasa, así como el enzima codificado por el gen *dxs* de *Escherichia coli*. Los homólogos funcionales, variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos genes y proteínas se encuentran comprendidos en la definición.

15 Según otro aspecto de la invención, la actividad de OHB descarboxilasa de los enzimas anteriormente listados puede mejorarse mediante mutaciones.

20 En un aspecto adicional de la invención, el enzima OHB descarboxilasa mejorado se encuentra codificado por *pdC* de *Z. mobilis* (SEC ID nº 127) portador de una mutación en por lo menos una de las posiciones siguientes: Tyr290, Trp392, Gly413 o Ile476 (numeración de *Z. mobilis*, SEC ID nº 128).

25 En un aspecto adicional de la invención, el enzima OHB descarboxilasa mejorado se encuentra codificado por *kdcA* de *L. lactis* (SEC ID nº 129), portador de una mutación en por lo menos una de las posiciones siguientes: Gln377, Phe381, Phe382, Gly402, Val461, Ile465, Met538 o Phe542 (en referencia a *kdcA* de *L. lactis*, SEC ID nº 130).

30 Según otro aspecto, la conversión de 3-HPA en PDO está catalizada por un enzima que presenta actividad de PDO deshidrogenasa. Dicha actividad puede identificarse de entre los enzimas que presentan actividad de hidroxialdehído reductasa, actividad de alcohol deshidrogenasa, actividad de lactaldehído reductasa o actividad de metilglicoxal reductasa, dicho enzima puede obtenerse mediante por lo menos una mutación de un enzima, mejorando dicha mutación la actividad y/o la afinidad de sustrato del enzima mutado para 3-HPA.

35 Los genes codificantes de una actividad de aldehído reductasa son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen los genes *yqhD*, *fucO*, *dkgA* y *dkgB* de *Escherichia coli*, el gen *dhaT* de *K. pneumoniae* y los genes *ADH1* y *ADH2* de *Saccharomyces cerevisiae*. Los homólogos funcionales, variantes funcionales y fragmentos funcionales de dichos genes y proteínas se encuentran comprendidos en la definición.

40 Las proteínas/ácidos nucleicos que comparten una homología sustancial con los enzimas/ácidos nucleicos anteriormente indicados también son otro aspecto de la invención, tal como las variantes funcionales o los fragmentos funcionales.

45 La expresión "homología sustancial" cubre la homología con respecto a la estructura y/o los componentes aminoácidos y/o la actividad biológica.

Más generalmente, dentro del significado de la invención, la homología entre dos secuencias de proteína o de ácidos nucleicos puede determinarse mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la materia. Se define de manera general como un porcentaje de identidad de secuencias entre una secuencia de referencia y la
50 secuencia de una proteína/ácido nucleico de interés.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "porcentaje (%) de identidad de secuencias" con respecto a las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos identificadas en la presente memoria se define como el porcentaje de residuos aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos o nucleótidos en una secuencia de enzima tras la alineación de las secuencias y la introducción de huecos, en
55 caso necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de las secuencias, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencias. Los procedimientos para llevar a cabo la alineación de secuencias y determinar la identidad de las secuencias son conocidos por el experto en la materia y pueden llevarse a cabo sin necesidad de experimentación indebida y pueden obtenerse cálculos de los valores de identidad de manera definitiva. Ver, por ejemplo, Ausubel et al., editores, Current Protocols in Molecular Biology, capítulo 19 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York), 1995, y el programa ALIGN (Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:supl. 3 (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.), 1978). Se encuentran disponibles varios algoritmos para alinear secuencias y determinar la identidad de secuencias y entre ellos se incluyen, por ejemplo, el algoritmo de alineación de homologías de Needleman et al., J. Mol. Biol. 48:443, 1970; el algoritmo de homología local de Smith et al., Adv. Appl. Math. 2:484, 1981; el
60 procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444, 1988; el algoritmo de Smith-Waterman (Meth. Mol. Biol. 70:173-187, 1997) y los algoritmos BLASTP, BLASTN y BLASTX (ver Altschul
65

et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). También se encuentran disponibles algoritmos computerizados que utilizan dichos algoritmos y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, el software ALIGN o Megalign (DNASTAR) o WU-BLAST-2 (Altschul et al., Meth. Enzym. 266:460-480, 1996) o GAP, BESTFIT, BLAST (Altschul et al.), *supra*, FASTA y TFASTA, disponibles en el paquete del Genetics Computing Group (GCG), versión 8, Madison, Wis., USA, y CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, Calif. El experto en la materia podrá determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo los algoritmos necesarios para alcanzar la máxima alineación a lo largo de la longitud de las secuencias que se comparan. Preferentemente, la identidad de secuencias se determina utilizando los parámetros por defecto determinados por el programa. Específicamente, la identidad de secuencias puede determinarse mediante el algoritmo de búsqueda de homologías de Smith-Waterman (Meth. Mol. Biol. 70:173-187, 1997) según la implementación en el programa MSPRCH (Oxford Molecular) utilizando una búsqueda de huecos afines con los parámetros de búsqueda siguientes: penalización de hueco abierto de 12 y penalización de extensión de hueco de 1. Preferentemente, las comparaciones de aminoácidos apareados pueden llevarse a cabo utilizando el programa GAP del paquete de software de análisis de secuencias GCG del Genetics Computer Group, Inc., Madison, Wis., utilizando la matriz de sustituciones de aminoácidos blosum62, con un peso de hueco de 12 y un peso de la longitud de 2. Con respecto a la alineación óptica de dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos variante puede presentar residuos aminoácidos adicionales o residuos aminoácidos eliminados con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo utilizado para la comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia incluirá por lo menos 20 residuos aminoácidos contiguos y puede presentar 30, 40, 50 o más residuos aminoácidos. Las correcciones para una identidad de secuencias incrementada que se asocia con la inclusión de huecos en la secuencia de aminoácidos del derivado pueden llevarse a cabo mediante la asignación de penalizaciones de hueco.

Los enzimas según la presente invención que presentan la misma actividad comparten una identidad de secuencias de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 50%, 70% o 85%, preferentemente una identidad de secuencias e aminoácidos de por lo menos aproximadamente 85%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95% y todavía más preferentemente de 98%. Preferentemente, cualesquiera sustituciones de aminoácidos son "sustituciones de aminoácidos conservadoras" que utilizan L-aminoácidos, en las que un aminoácido es sustituido por otro aminoácido biológicamente similar. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas que conservan la carga general, hidrofobicidad/hidrofiliicidad y/o volumen estérico del aminoácido que se sustituye. Son ejemplos de sustituciones conservadoras las que ocurren entre los grupos siguientes: Gly/Ala, Val/Ile/Leu, Lys/Arg, Asn/Gln, Glu/Asp, Ser/Cys/Thr y Phe/Trp/Tyr. Un derivado puede, por ejemplo, difiere en tan sólo 1 a 10 residuos aminoácidos, tal como 6 a 10, en tan solo 5, en tan solo 4, 3, 2 o incluso 1 residuo aminoácido.

La expresión variante funcional comprende enzimas que pueden presentar modificaciones de secuencia sustanciales en comparación con las secuencias descritas específicamente en la presente solicitud pero todavía conservar la actividad enzimática original.

También se refiere a que la secuencia del enzima puede comprender menos aminoácidos que la secuencia original aunque dicho enzima truncado todavía conserve la actividad enzimática original.

Según un aspecto de la invención, la actividad del enzima que cataliza la primera y/o la segunda y/o la tercera etapa del procedimiento de la presente invención se encuentra incrementada. Este incremento puede medirse mediante un ensayo enzimático tal como se indica en los ejemplos 1 a 5.

La mejora de dichos enzimas puede obtenerse mediante por lo menos una mutación, (i) mejorando dicha mutación o mutaciones la actividad y/o afinidad de sustrato del enzima mutado para 2,4-DHB, OHB y 3-HPA, respectivamente, y/o (ii) reduciendo la actividad y/o afinidad de sustrato del enzima mutado para su sustrato natural.

En la presente invención, la expresión "mejora la actividad y/o afinidad de sustrato" se refiere a que el enzima antes de la mutación:

- era incapaz de utilizar el sustrato y/o
- sintetizaba el producto de la reacción a una velocidad específica máxima por lo menos tres veces inferior y/o
- presentaba una afinidad para 2,4-DHB, OHB o 3-HPA que era por lo menos tres veces inferior y/o
- presentaba una actividad específica máxima sobre el sustrato natural que era por lo menos tres veces superior y/o
- presentaba una afinidad para el sustrato natural que era por lo menos tres veces superior.

Cualquier ruta metabólica que catalice la síntesis de DHB a partir de un sustrato de carbono se encuentra

comprendida en la presente invención. La síntesis de DHB a partir de malato constituye un aspecto preferente de la invención.

5 En un aspecto específico de la invención, se sintetiza DHB mediante una ruta en tres etapas que parte de malato, tal como se describe en la solicitud de patente publicada como nº WO 2012/056318, en la que:

10 La conversión de malato en 4-fosfomalato se encuentra catalizada por un enzima que presenta actividad de malato cinasa. Dicha actividad de malato cinasa puede identificarse de entre los enzimas que presentan actividad de aspartato cinasa o actividad de homoserina cinasa. Dicha actividad de malato cinasa puede obtenerse mediante mutación de un aminoácido cinasa natural, por ejemplo la aspartato cinasa mutante LysC de *E. coli* E119G o la aspartato cinasa mutante LysC E119G E250K de *E. coli*.

15 La conversión del fosfomalato en malato-4-semialdehído se encuentra catalizada por un enzima que posee actividad de malato semialdehído deshidrogenasa. Dicha actividad de malato semialdehído deshidrogenasa puede identificarse de entre los enzimas que presentan actividad de aspartato semialdehído deshidrogenasa. Dicha actividad de malato semialdehído deshidrogenasa puede obtenerse mediante mutación de un aminoácido deshidrogenasa natural, por ejemplo la aspartato semialdehído deshidrogenasa mutante Asd E241Q de *E. coli*.

20 La conversión del malato 4-semialdehído en DHB se encuentra catalizada por la acción de un enzima que posee actividad de malato-4-semialdehído reductasa. Dicha actividad de malato-4-semialdehído reductasa puede identificarse de entre los enzimas que presentan actividad de semialdehído succínico reductasa (SSR), tal como la malato-4-semialdehído reductasa codificada por el gen *ssr* de *Metallospira sedula* o el mutante *M. sedula* SSR H39R N43H.

25 Según la presente invención, una "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a una molécula de ADN o ARN en forma de cadena sencilla o de doble cadena, preferentemente una molécula de ADN. Un "ADN aislado", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un ADN que no es natural o que ya no se encuentra en el medio natural en el que se encontraba presente originalmente, por ejemplo una secuencia codificante de ADN asociada a otros elementos reguladores en un gen quimérico, un ADN transferido a otra célula huésped o una secuencia de ADN artificial, generada mediante síntesis, que presenta una secuencia de nucleótidos diferente de la de cualquier secuencia de ADN natural. Se da a conocer además en la presente memoria un gen quimérico que comprende, funcionalmente unido a otro, por lo menos un promotor que es funcional en un organismo huésped, un polinucleótido codificante de cualquiera de los enzimas dados a conocer en la presente memoria y un elemento terminador que es funcional en el mismo organismo huésped. Los diversos elementos que puede contener un gen quimérico son, en primer lugar, elementos reguladores de la transcripción, traducción y maduración de las proteínas, tales como un promotor, una secuencia codificante de un péptido de señal o un péptido de tráfico, o un elemento terminador que constituye una señal de poliadenilación y, en segundo lugar, un polinucleótido codificante de una proteína. La expresión "funcionalmente ligado a otro" se refiere a que dichos elementos del gen quimérico se encuentran unidos entre sí de manera que la función de uno de dichos elementos resulta afectada por la de otro. A título de ejemplo, un promotor se encuentra funcionalmente ligado a una secuencia codificante en el caso de que sea capaz de afectar a la expresión de dicha secuencia codificante. La construcción del gen quimérico tal como se da a conocer en la presente memoria y el ensamblaje de los diversos elementos pueden llevarse a cabo utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la materia, en particular los indicados en [18]. La elección de los elementos reguladores que constituyen el gen quimérico depende esencialmente del organismo huésped en el que deben funcionar y el experto en la materia será capaz de seleccionar los elementos reguladores que son funcionales en un organismo huésped dado. El término "funcional" pretende referirse a la capacidad de funcionar en un organismo huésped dado.

50 Los promotores que puede contener el gen quimérico tal como se da a conocer en la presente memoria son constitutivos o inducibles. A título de ejemplo, los promotores utilizados para la expresión en bacterias pueden seleccionarse de entre los promotores mencionados posteriormente. Para la expresión en *Escherichia coli* pueden mencionarse lac, trp, lpp, phoA, recA, araBAD, prou, cst-I, tetA, cadA, nar, tac, trc, lpp-lac, Psyn, cspA, PL, PL-9G-50, PR-PL, T7, [lambda]PL-PT7, T3-lac, T5-lac, T4 gen 32, nprM-lac, VHb y los promotores proteína A [19], [20] o el promotor P_{trp} (documento nº WO 99/64607). Para la expresión en bacterias Gram-positivas, tales como *Corynebacteria* o *Streptomyces*, puede hacerse mención de los promotores P_{tipA} [21] o PS1 y PS2 (documento nº FR91/09870) o los indicados en la solicitud nº EP0629699A2. Para la expresión en levaduras u hongos, puede hacerse mención de los promotores PLAC4 de *K. lactis* [22] o el promotor P_{pgk} de *K. lactis* (solicitud de patente nº FR 91/05294), el promotor *tef1* o *cbh1* de *Trichoderma reesei* (documento nº WO 94/04673), el promotor *csI* o *apf* de *Penicillium funiculosum* his (documento nº WO 00/68401) y el promotor *gla* de *Aspergillus niger* [23]. El gen quimérico puede comprender además otras secuencias reguladoras, que se encuentran situadas entre el promotor y la secuencia codificante, tales como los activadores (intensificadores) de transcripción.

65 De esta manera, el gen quimérico tal como se da a conocer en la presente memoria comprende, en una forma de realización específica, por lo menos, en la dirección de transcripción, funcionalmente ligado, una secuencia reguladora promotora que es funcional en un organismo huésped, una secuencia de ácidos nucleicos codificante

de enzimas tal como se da a conocer en la presente memoria y una secuencia reguladora terminadora que es funcional en dicho organismo huésped. Se da a conocer además en la presente memoria un vector de clonación y/o expresión que comprende un gen quimérico tal como se da a conocer en la presente memoria o una secuencia de ácidos nucleicos tal como se da a conocer en la presente memoria. El vector tal como se da a conocer en la presente memoria resulta útil para transformar un organismo huésped y expresar en dicho organismo cualquiera de los enzimas para la biosíntesis del PDO. Dicho vector puede ser un plásmido, un cósmido, un bacteriófago o un virus. Preferentemente, el vector de transformación tal como se da a conocer en la presente memoria es un plásmido. Generalmente, las cualidades principales de dicho vector deben ser la capacidad de automantenerse y autorreplicarse en las células del organismo huésped, en particular gracias a la presencia de un origen de replicación y la de expresar cualquiera de los enzimas en las mismas. Con el fin de transformar establemente un organismo huésped, el vector también puede integrarse en el genoma. La elección de dicho vector y también las técnicas de inserción del gen quimérico tal como se dan a conocer en la presente memoria en dicho vector han sido ampliamente descritas en [18] y son parte de los conocimientos generales del experto en la materia. Ventajosamente, el vector utilizado en la presente invención adicionalmente contiene, además del gen quimérico tal como se da a conocer en la presente memoria, un gen quimérico codificante de un marcador seleccionable. Dicho marcador seleccionable posibilita la selección de los organismos huésped que han sido efectivamente transformados, es decir, los que incorporan el vector. Según un aspecto particular, el organismo huésped que debe transformarse es una bacteria, una levadura o un hongo. Entre los marcadores seleccionables que pueden utilizarse, puede hacerse mención de marcadores que contienen genes de resistencia a antibióticos, tales como, por ejemplo, el gen higromicín-fosfotransferasa [24], [25]. Otros marcadores pueden ser genes que complementan una auxotrofia, tales como los genes *pyrA*, *pyrB*, *pyrG*, *pyr4* [26], *arg4*, *argB* [27] y *trpC* [28], el gen de la molibdopterina sintasa [29], [30] o el de la acetamidasa [31]. Además, puede hacerse mención de genes codificantes de enzimas fácilmente identificables, tales como el enzima GUS, o genes codificantes de pigmentos o enzimas que regulan la producción de pigmentos en las células transformadas. Dichos genes de marcador seleccionable se describen, en particular, en las solicitudes de patente n° WO 91/02071, n° WO 95/06128, n° WO 96/38567 y n° WO 97/04103. Se dan a conocer además en la presente memoria organismos huésped transformados que contiene por lo menos un gen quimérico tal como se da a conocer en la presente memoria, integrado en su genoma o alojado en un elemento genético extracromosómico, por ejemplo un plásmido. en un aspecto más específico, el organismo huésped transformado comprende un ácido nucleico tal como se da a conocer en la presente memoria o un gen quimérico que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión que comprende un ácido nucleico codificante de una malato cinasa y/o una malato semialdehído deshidrogenasa y/o una malato semialdehído reductasa y/o una DHB deshidrogenasa y/o una OHB descarboxilasa y/o una 3-PHA reductasa.

La expresión "organismo huésped" pretende referirse a cualquier organismo monocelular inferior en el que puede introducirse uno o más genes quiméricos, uno o más ácidos nucleicos o uno o más vectores según la invención con el fin de producir PDO. Preferentemente, el organismo huésped es un microorganismo, en particular una bacteria, preferentemente seleccionada de entre *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae*, *Streptococcaceae*, *Methylobacteriaceae* y *Corynebacteriaceae*, más preferentemente *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Methylobacterium extorquens* o *Lactococcus lactis*, o una levadura seleccionada preferentemente de entre *Saccharomycetaceae*, *Pichiaceae* y *Schizosaccharomycetaceae*, más preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia jadinii*, *Pichia stipitis* o *Pichia pastoris* o un hongo, por ejemplo del género *Penicillium* o *Aspergillus*, más particularmente *Aspergillus flavus*, o del género *Chrysosporium* o *Trichoderma* o un baculovirus.

El organismo huésped puede ser un organismo huésped que produce en exceso de manera natural malato o succinato a partir de azúcares tales como la glucosa o un organismo huésped que ha sido manipulado para producir en exceso malato o succinato a partir de azúcares tales como glucosa y en el que todos los potenciales transportadores de membrana que facilitan la exportación de ácidos orgánicos, tales como malato, piruvato, succinato y fumarato han sido eliminados. El organismo huésped puede ser un organismo que ha sido manipulado para producir en exceso DHB y en el que todos los transportadores de membrana que facilitan la exportación de ácidos orgánicos, tales como DHB, malato, piruvato, succinato y fumarato, han sido eliminados. Son ejemplos de permeasas que facilitan la exportación del malato y otros ácidos orgánicos, Mae1 de *Schizosaccharomyces pombe* (Camarasa et al., 2001; Grobler et al., 1995), DctA de *Bacillus subtilis* (Groeneveld et al., 2010), Dct 1-4 de *E. coli*, Jen1 de *S. cerevisiae* (Akita et al., 2000). Para un experto resultará posible identificar las permeasas candidatas en otros microorganismos basándose en la homología de las secuencias. Estas construcciones servirán para mantener el DHB, malato y otros ácidos orgánicos dentro de la célula para que se encuentren disponibles para la producción de PDO.

Con el fin de obtener los organismos huésped tal como se da a conocer en la presente memoria, el experto en la materia puede utilizarse cualquiera de los muchos procedimientos de transformación conocidos.

Uno de dichos procedimientos consiste en poner en contacto las células de los organismos huésped que deben transformarse con polietilenglicol (PEG) y con los vectores tal como se da a conocer en la presente memoria. La electroporación es otro procedimiento, que consiste en someter las células que deben transformarse y los

vectores tal como se dan a conocer en la presente memoria, a un campo eléctrico. Otro procedimiento consiste en inyectar directamente los vectores en las células o los tejidos mediante microinyección. Puede utilizarse el procedimiento "biolístico". Consiste en bombardear las células o tejidos con partículas sobre las que se han adsorbido los vectores (patente US nº 4.945.050) dados a conocer en la presente memoria.

En la literatura se describen varios procedimientos para transformar bacterias, para *Escherichia coli* y otras bacterias Gram-negativas. También puede utilizarse la conjugación. Para las bacterias Gram-positivas, puede utilizarse la electroporación y también la transformación de protoplasto, en particular para las bacterias del género *Streptomyces*.

En la literatura también se han descrito varios procedimientos para transformar hongos. La transformación de protoplasto con PEG se describe para *Aspergillus* en la patente nº EP 0 260 762 y se describe una adaptación de dicho procedimiento a la especie *Penicillium funiculosum* en el documento nº WO 00/36120. La transformación mediante integración mediada por enzima de restricción, o REMI (por sus siglas en inglés), también es conocida, al igual que la transformación de protoplasto utilizando bacterias del género *Agrobacterium*. Las técnicas para transformar levaduras también se encuentran descritas en la literatura.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento de producción de PDO que comprende las etapas de poner en contacto el microorganismo modificado según la invención con un sustrato de carbono en un medio de cultivo apropiado y recuperar el PDO a partir del medio de cultivo.

En un aspecto más preferido de la invención, el sustrato de carbono es un azúcar o una mezcla de azúcares.

En un aspecto más preferido de la invención, el PDO se purifica adicionalmente.

Los ejemplos, a continuación, ilustran la invención. Dichos ejemplos se proporcionan únicamente a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención en modo alguno, que se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: representación esquemática de la ruta sintética que rinde 1,3-propanodiol. 1 - malato, 2 - malil-4-fosfato, 3 - malato-4-semialdehído, 4 - 2,4-dihidroxi-butirato, 5 - 2-oxo-4-hidroxi-butirato, 6 - 3-hidroxi-propionaldehído, 7 - 1,3-propanodiol.

Figura 2: actividades específicas de la malato deshidrogenasa de *E. coli* purificada, Ec-Mdh, mutada en la posición R81. (A) Actividades específicas en DHB, (B) actividades específicas sobre el malato. Se midieron las actividades a una concentración de sustrato de 50 mM de DHB o de 50 mM de malato.

Figura 3: cromatogramas de CG-FID que muestran la presencia de 1,3-propanodiol (PDO) tras la incubación de DHB 20 mM, DCIP 1 mM, NADPH 2 mM y tiamina pirofosfato 50 µM con diferentes combinaciones de enzimas de la ruta de PDO. (A) Estándar de PDO a una concentración de 1 mM; (B) reacción 1: DHB deshidrogenasa (Ec-LldD 160 µg/ml), OHB descarboxilasa (Zm-Pdc 10 µg/ml) y PDO deshidrogenasa (Ec-YqhD 20 µg/ml); (C) control 1: igual que para la reacción 1 aunque sin DHB deshidrogenasa; (D) control 2: igual que para la reacción 1 aunque sin OHB descarboxilasa.

Figura 4: cromatogramas de CG-FID que muestran la presencia de 1,3-propanodiol (PDO) tras la incubación de DHB 20 mM, NAD⁺ 10 mM, NADPH 2 mM y tiamina pirofosfato 50 µM con diferentes combinaciones de enzimas de la ruta de PDO. (A) Estándar de PDO a una concentración de 1 mM; (B) reacción 1: DHB deshidrogenasa (Ec-Mdh R81A 160 µg/ml), OHB descarboxilasa (LI-KdcA 10 µg/ml) y PDO deshidrogenasa (Ec-YqhD 20 µg/ml); (C) control 1: igual que para la reacción 1 aunque sin PDO deshidrogenasa; (D) control 2: igual que para la reacción 1 aunque sin DHB deshidrogenasa.

Ejemplos

Ejemplo 1: demostración de la actividad de la 2,4-dihidroxi-butirato deshidrogenasa

Construcción de plásmidos que contienen genes de tipo salvaje codificantes de enzimas candidatos de DHB deshidrogenasa:

Los genes codificantes de la (L)-lactato deshidrogenasa de *Lactococcus lactis*, *ldhA*, (L)-malato deshidrogenasa e *Escherichia coli*, *mdh*, (L)-malato deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*, *mdh*, y para la (L)-lactato deshidrogenasa asociada a membrana de *E. coli*, *lldD*, se amplificaron por PCR utilizando la polimerasa de alta fidelidad Phusion™ (Fermentas) y los cebadores listados en la tabla 1. Se utilizaron ADN genómicos de *E. coli* MG1655, *L. lactis* IL1403 y *B. subtilis* cepa 168 como moldes. Los cebadores introdujeron sitios de restricción (Tabla 1) cadena arriba del codón de inicio y cadena abajo del codón de parada, respectivamente, facilitando la ligación de los productos de PCR digeridos en los sitios correspondientes del vector de expresión pET28a+ (Novagen)

utilizando ADN ligasa de T4 (Fermentas). Los productos de ligación se transformaron en células de *E. coli* DH5 α . Los plásmidos pET28-Ec-mdh, pET28-LI-ldh, pET28-Bs-mdh y pET28-Ec-ldd se aislaron y se mostró mediante secuenciación del ADN que contenían la secuencia de longitud completa correcta de los genes *mdh* de *E. coli* (SEC ID n° 123), *ldhA* de *L. lactis* (SEC ID n° 119), *mdh* de *B. subtilis* (SEC ID n° 125) y *ldd* de *E. coli* (SEC ID n° 121), respectivamente. Las secuencias de las proteínas correspondientes están representadas por las SEC ID n° 124, SEC ID n° 120, SEC ID n° 126 y SEC ID n° 122, respectivamente.

Tabla 1: secuencias de cebador y sitios de restricción utilizados para la amplificación y clonación de los enzimas candidatos.

Gen	Secuencias de cebadores directo e inverso 5' - 3'	Sitios de restricción
<i>Ec-mdh</i>	TATAATCATATGAAAGTTCGAGTCCTC (SEC ID n°131) TATAATGGATCCTTACTTATTAACGAACTC (SEC ID n°132)	NdeI BamHI
<i>LI-ldhA</i>	TATAATCATATGGCTGATAAACACGTAACAAAAA (SEC ID n°133) TATAATGGATCCTTAGTTTTAACTGCAGAAGCAAA (SEC ID n°134)	NdeI BamHI
<i>Bs_mdh</i>	CATATGGGAAATACTCGTAAAAAAGTT (SEC ID n°135) GGATCCTTAGGATAATACTTTTCATGAC (SEC ID n°136)	NdeI BamHI
<i>Ec-ldd</i>	CATATGATTATTTCCGCAGCCAGC (SEC ID n°137) AGATCTCTATGCCGCATCCCTTTC (SEC ID n°138)	NdeI BglII

Expresión de enzimas: se transformaron células *E. coli* BL21 (DE3) Star con los plásmidos apropiados utilizando protocolos genéticos estándares (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989). Los enzimas con una etiqueta hexa-His N-terminal se expresaron en cultivos de 50 ml de LB que habían sido inoculados con un cultivo durante la noche a DO₆₀₀ de 0,1 y cultivados hasta DO₆₀₀ de 0,6 antes de inducir la expresión de proteínas mediante la adición de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM al medio de cultivo. Tras 3 h de expresión de proteínas, se recolectaron las células mediante centrifugación a 4.000 g a 4°C durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Los pellets celulares se almacenaron a -20°C hasta el análisis posterior. Se llevó a cabo el crecimiento y expresión de proteínas a 37°C. El medio de cultivo contenía canamicina 50 μ g/ml.

Purificación de los enzimas: los pellets celulares congelados de los cultivos de expresión se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de fragmentación (Hepes 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5) y se fragmentaron mediante cuatro rondas sucesivas de sonicación (intervalo de sonicación: 20 s, potencia: 30%, sonicador: Bioblock Scientific, VibraCell™ 72437). Se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación de los extractos en bruto durante 15 min a 4°C a 4.000 g, conservando el sobrenadante clarificado. Se extrajo el ARN y ADN de los extractos mediante la adición de 15 mg/ml de sulfato de estreptomina (Sigma), centrifugando las muestras a 13.000 g durante 10 min a 4°C y conservando el sobrenadante. El extracto de proteínas clarificado se incubó durante 1 h a 4°C con 0,75 ml (volumen de lecho) de resina de afinidad Talon™ Cobalt (Clontech). La suspensión se centrifugó a 700xg en una centrífuga de sobremesa y se eliminó el sobrenadante. La resina se lavó con 10 volúmenes de lecho de tampón de lavado (Hepes 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 15 mM, pH 7,5) antes de eluir las proteínas con 0,5 ml de tampón de elución (Hepes 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 7,5). La pureza de los enzimas eluidos se verificó mediante análisis de SDS-PAGE. Se estimaron las concentraciones de las proteínas mediante el procedimiento de Bradford (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989). Con el fin de estabilizar la lactato deshidrogenasa de *L. lactis*, se intercambió sistemáticamente el tampón de elución por tampón fosfato 100 mM ajustado a pH 7. La muestra de proteínas se transfirió a un filtro de ultracentrífuga Amicon™ (valor de corte: 10 kDa) y se centrifugó durante 8 min a 4.000 g a 4°C para eliminar el tampón. La proteína se rediluyó en tampón de fosfato y se repitió el procedimiento 4 veces.

Ensayo enzimático: se sometió a ensayo la actividad de las DHB deshidrogenasas citosólicas (Ec-Mdh, Bs-Mdh y LI-LdhA) mediante el seguimiento de la reducción de NAD⁺ dependiente de DHB.

Esquema de reacción 1: (L)-2,4-dihidroxitirato + NAD⁺ \rightarrow 2-oxo-4-hidroxitirato + NADH

La mezcla de reacción contenía Hepes 60 mM (pH 8), cloruro de potasio 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NAD 10 mM (opcionalmente, fructosa-1,6-bisfosfato (F16bP) 5 mM) (todos los productos eran de Sigma) y cantidades apropiadas de enzima purificado o extracto celular. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de (L)-2,4-dihidroxitirato 50 mM (Rhodia).

Se sometió a ensayo la actividad de la DHB deshidrogenasa asociada a membrana (Ec-LldD) mediante el seguimiento de la reducción dependiente de DHB del 2,6-dicloroindofenol (DCIP).

Esquema de reacción 2: (L)-2,4-dihidroxitirato + DCIP_{ox} \rightarrow 2-oxo-4-hidroxitirato + DCIP_{red}

La mezcla de reacción contenía Hepes 60 mM (pH 7), cloruro de potasio 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DCIP 0,06 mM (todos los productos eran de Sigma) y cantidades apropiadas de enzima purificado o extracto celular. Las

reacciones se iniciaron mediante la adición de (L)-2,4-dihidroxi-butirato 20 mM (Rhodia).

5 Todos los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo a 37°C en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en un volumen final de 250 µl. Se realizó un seguimiento de las reacciones a partir de la absorción característica de NADH a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}}=6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) o la absorción de DCIP a 655 nm ($\epsilon_{\text{DCIP}}=5,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un lector de microplacas (BioRad 680XR).

10 **Resultados:** los resultados de las mediciones enzimáticas se resumen en la tabla 2. Se demostró que Ec-Mdh y Bs-Mdh no presentaban actividad de DHB deshidrogenasa medible. Las lactato deshidrogenasas citosólica y asociada a membrana Ll-LdhA y Ec-LldD, respectivamente, presentan actividad de DHB deshidrogenasa.

Tabla 2: resumen de parámetros cinéticos de enzimas candidatos seleccionados sobre su sustrato natural y DHB.

Enzima	Actividad específica máx. [$\mu\text{moles}/(\text{mg min})$]		Afinidad para el sustrato, Km [mM]	
	Sustrato natural ^a	DHB ^b	Sustrato natural ^a	DHB
Ec-Mdh	52,5	0	0,56	nd
Bs-Mdh	10,5	0	2,6	nd
Ll-LdhA	8,8	1	21,2	ns
Ec-LldD	6,22	0,37	0,13	1,31

(a) Los sustratos naturales para las malato deshidrogenasas y las lactato deshidrogenasas son el (L)-malato y el (L)-lactato, respectivamente.
 (b) En el caso de que el enzima no pudiese saturarse, la actividad específica máxima se refiere a la actividad estimada con una concentración de sustrato de 50 mM.
 ns - no saturado
 nd - no determinado

15 **Ejemplo 2: construcción de enzimas malato deshidrogenasa con actividad de DHB deshidrogenasa mejorada**

20 Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida a sitio de los genes *mdh* de *E. coli* y *mdh* de *B. subtilis* utilizando las parejas de oligonucleótidos listadas en la tabla 3 y los plásmidos pET28-Ec-mdh y pET28-Bs-mdh como moldes. Se introdujeron mediante PCR (Phusion 1 U, tampón HF al 20% (v/v), dNTP 0,2 mM, cebadores directos e inversos, 0,04 µM cada uno, 50 ng de plásmido de molde, agua) mutaciones puntuales para modificar la secuencia de aminoácidos utilizando las parejas de oligonucleótidos listadas en la tabla 3. Los genes mutados contenían un nuevo sitio de restricción listado en la tabla 3 (introducido utilizando mutaciones silenciosas) además de la mutación funcional para facilitar la identificación de los clones mutados. Los productos de PCR se digirieron con *DpnI* a 37°C durante 1 h para eliminar el ADN molde y se transformaron en células de *E. coli* DH5-alfa (NEB) competentes. Los plásmidos mutados se identificaron mediante análisis de sitio de restricción y se verificó que portaban las mutaciones deseadas mediante secuenciación del ADN.

30 Tabla 3: oligonucleótidos utilizados para mutar *mdh* de malato deshidrogenasa de *E. coli* y *mdh* de *B. subtilis* (nnk se refiere a un codón degenerado en el que k representa timina o citosina).

Proteína	Mutación	Secuencias de cebador 5' - 3'	Sitio de restr.
Bs-Mdh	R87A	TTACAGCCGGTATCGCAGCAAACCCGGGATGAGCAGAGAT (SEC ID n° 139) ATCTCTGCTCATCCCGGGTTTTGCTGCGATACGGCTGTAA (SEC ID n° 140)	Sma1
Ec-Mdh	R81nnk	TTATCTCTGCAGGCGTAGCGNNAACCCGGGATGGATCGTTC (SEC ID n° 141) GAACGATCCATCCCGGGTTTMMNCGCTACGCCTGCAGAGATAA (SEC ID n° 142)	Sma1
Ec-Mdh	R81AM85E	TTATCTCTGCAGGCGTAGCGGCTAAACCCGGGTGAGGATCGTTCGACCTG (SEC ID n° 143) CAGGTCGGAACGATCCTCACCCGGTTTAGCCGCTACGCCTGCAGAGATAA (SEC ID n° 144)	sin Sma1
Ec-Mdh	R81A M85Q	TTATCTCTGCAGGCGTAGCGGCTAAACCCGGGTGAGGATCGTTCGACCTG (SEC ID n° 145) CAGGTCGGAACGATCCTGACCCGGTTTAGCCGCTACGCCTGCAGAGATAA (SEC ID n° 146).	sin Sma1
Ec-Mdh	I12V	GTGCGAGTCCTCGGCGCCGCTGGCGGTGTCGGCCAGGCGCTTGCAC (SEC ID n° 147)	Nar1

Proteína	Mutación	Secuencias de cebador 5' - 3'	Sitio de restr.
		GTGCAAGCGCCTGGCCGACACCGCCAGCGGCGCCGAGGACTGCGAC (SEC ID nº 148)	
Ec-Mdh	G179D	CCG GTT ATT GGC GGC CAC TCT GAT GTT ACC ATT CTG CCG CTG CTG (SEC nº 149) CAGCAGCGGCAGAATGGTAACATCAGAGTGGCCGCCAATAACCGG (SEC ID nº 150)	Eae1
Ec-Mdh	R81AD86S	GGCGTAGCGGCTAAACCGGGTATGTCTCGTTCCGACCTG (SEC ID nº 151) CAGGTCGGAACGAGACATACCCGGTTTAGCCGCTACGCC (SEC ID nº 152)	sin Sma1

Los enzimas mutantes se expresaron, purificaron y sometieron a ensayo para actividad de DHB deshidrogenasa tal como se indica en el ejemplo 1.

- 5 Las actividades sobre el DHB y el malato obtenidas al mutar Arg81 en Ec-Mdh se resumen en la figura 2. Los resultados demuestran que la sustitución de Arg81 por alanina, cisteína, glicina, isoleucina, metionina, asparagina, glutamina, serina, treonina o valina confiere una actividad significativa de DHB deshidrogenasa y una reducción concomitante de malato deshidrogenasa. La introducción de la mutación R87C en Bs-Mdh (en referencia a la SEC ID nº 126) incrementó la actividad máxima de dicho mutante sobre DHB de 0 a 0,06 $\mu\text{moles}/(\text{mg min})$ y redujo su actividad sobre el malato de 10,9 a 0,13 $\mu\text{moles}/(\text{mg min})$.

15 La mutación R81A en Ec-Mdh (en referencia a la SEC ID nº 124) se combinó con cambios adicionales en la secuencia de la proteína. Se listan los resultados en la tabla 4. Puede demostrarse que la introducción de la mutación M85Q, M85E, I12V, G179D y/o D86S además de la mutación R81A resulta en una actividad adicionalmente incrementada sobre DHB.

Tabla 4: resumen de los parámetros cinéticos de mutantes de malato deshidrogenasa de *E. coli* y *B. subtilis* sobre el malato y el DHB.

Enzima mutante	SEC ID	Actividad específica máx. [$\mu\text{moles}/(\text{mg min})$]		Km [mM]	
		malato ^a	DHB ^b	malato	DHB
Bs-Mdh R87C	SEC ID nº 154	0,13	0,06	6,8	5,4
Ec-Mdh R81A	SEC ID nº 156	0,12	0,3	0,7	33
Ec-MdhR81A M85Q	SEC ID nº 158	0,57	2,98	2,2	29
Ec-MdhR81A M85E	SEQ ID nº 160	0,65	2,38	8,6	48
Ec-MdhR81A I12V	SEC ID nº 162	0,66	2,5	8,5	ns
Ec-MdhR81A M85Q I12V	SEC ID nº 164	0,98	7,1	12,5	19
Ec-Mdh R81A M85E I12V	SEC ID nº 166	0,91	10,3	11,2	20
Ec-MdhR81A G179D	SEC ID nº 168	0,52	2,1	nd	ns
Ec-MdhR81A D86S	SEC ID nº 170	0,42	0,79	10,3	28
Ec-MdhR81A D86S G179D	SEC ID nº 172	0,64	2,51	4	25

(a) - se midió la actividad con malato 50 mM
(b) - se midió la actividad con DHB 50 mM
(ns) - no saturado a concentraciones de hasta 100 mM

20 **Ejemplo 3: construcción de enzimas de (L)-lactato deshidrogenasa con actividad mejorada de DHB deshidrogenasa**

25 Se llevó a cabo mutagénesis dirigida a sitio del gen *lldD* de *E. coli* utilizando las parejas de oligonucleótidos listadas en la tabla 5 y el plásmido pET28-Ec-lldD como molde.

Tabla 5: oligonucleótidos utilizados para mutar *lldD* de (L)-lactato deshidrogenasa de *E. coli*.

Proteína	Mutación	Secuencias de cebador 5' - 3'	Sitio de restricción
Ec-lldD	V108C	TTCCGTTTACTCTGTGCGACGTGTTCCGTTTGCCCGA (SEC ID nº 173) TCGGGCAAACGGAACCCGTCGACAGAGTAAACGGAA (SEC ID nº 174)	HinCII

30 Se expresaron, purificaron y sometieron a ensayo los enzimas mutantes para actividad de DHB deshidrogenasa y de lactato deshidrogenasa tal como se ha indicado en el ejemplo 1. Los resultados de las mediciones enzimáticas se resumen en la tabla 6. Se demostró que la sustitución de Val108 por cisteína modifica la

especificidad del enzima en favor de DHB.

Tabla 6: resumen de los parámetros cinéticos de los mutantes de lactato deshidrogenasa de *E. coli*, *LLdD*, sobre el lactato y el DHB.

5

Enzima mutante	Sec ID	Actividad específica máx. [μmoles/(mg min)]		Km [mM]		Especificidad ^a
		lactato	DHB	lactato	DHB	
Tipo salvaje	SEC ID nº 122	6,22	0,37	0,13	1,31	0,006
V108C	SEC ID nº 174	0,55	0,24	0,42	0,85	0,21

(a) La especificidad se expresa como $(V_{max}/K_m)_{DHB}/(V_{max}/K_m)_{sustrato\ nat.}$

Ejemplo 4: demostración de la actividad de 2-oxo-4-hidroxiacetato descarboxilasa

El gen *Li-kdcA* codificante de alfa-cetoácido de cadena ramificada descarboxilasa de *L. lactis* B1157-NIZO se optimizó para los codones para la expresión en *E. coli*. La secuencia codificante optimizada completa flanqueada por los sitios de restricción *NheI* y *EcoRI* cadena arriba del codón de inicio y cadena abajo del codón de parada, respectivamente, fue sintetizada por Eurofins MWG y se clonó en los sitios correspondientes de pET28a+ (Novagen) en el mismo marco con una etiqueta hexa-His N-terminal. Se demostró mediante secuenciación de ADN que el plásmido pET28-LI-kdcA resultante presentaba la secuencia correcta.

15

Las piruvato descarboxilasas de *Saccharomyces cerevisiae*, Sc-PDC1, y de *Zymomonas mobilis*, Zm-PDC, se amplificaron por PCR utilizando la polimerasa de alta fidelidad PhusionTM (Fermentas) y los cebadores listados en la tabla 7. Se utilizaron ADN genómicos de *S. cerevisiae* BY4741 y *Z. mobilis* (Lindner) Kluyver y van Niel (ATCC nº 31821) como moldes. Los cebadores introdujeron sitios de restricción (Tabla 7) cadena arriba del codón de inicio y cadena abajo del codón de parada, respectivamente, facilitando la ligación de los productos de PCR digeridos en los sitios correspondientes del vector de expresión pET28a+ (Novagen) utilizando ADN ligasa de T4 (Fermentas). Los productos de ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5α (NEB). Los plásmidos pET28-Sc-pdc1 y pET28-Zm-pdc resultantes se aislaron y se demostró mediante secuenciación de ADN que contenían la secuencia de longitud completa correcta de los genes *PDC1* de *S. cerevisiae* y *PDC* de *Z. mobilis*, respectivamente. Las secuencias de proteína correspondientes se representan mediante SEC ID nº 208 y SEC ID nº 128, respectivamente.

25

Tabla 7: secuencia de cebador y sitios de restricción utilizados para la amplificación y clonación de los enzimas candidatos.

30

Gen	Secuencia de los cebadores directo e inverso 5' - 3'	Sitios de restricción
<i>Sc-PDC1</i>	CATATGTCCTGAAATTACTTTGGGTAA (SEC ID nº 175)	Nde1
	GGATCCCTTATTGCTTAGCGTTGGT (SEC ID nº 176)	BamH1
<i>Zm-PDC</i>	CATATGAGTTATACTGTCCGTACC (SEC ID nº 177)	Nde1
	GGATCCCTAGAGGAGCTTGTTAAC (SEC ID nº 178)	BamH1

35

Se utilizaron los plásmidos para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) Star y se expresaron y purificaron los enzimas portadores de una etiqueta hexa-His N-terminal tal como se ha indicado en el ejemplo 1. Se cuantificó la actividad de descarboxilasa sobre el 2-oxo-4-hidroxiacetato (OHB), el piruvato (Sigma) y el ácido 4-metil-2-oxovalérico (Sigma).

40

Ensayos enzimáticos: se sometió a ensayo la actividad de OHB descarboxilasa mediante el acoplamiento de la actividad de descarboxilasa con la reducción dependiente de NADPH del 3-hidroxiacetato liberado por aldehído reductasa purificada, YqhD, de *E. coli*. Se acopló la descarboxilación del piruvato con la reducción dependiente de NADH del acetaldehído catalizada por alcohol deshidrogenasa de levadura. Se midió la actividad de alfa-cetoácido de cadena ramificada descarboxilasa sobre ácido 4-metil-2-oxovalérico mediante el acoplamiento con la reducción dependiente de NADH de 3-metilbutanal catalizada por la alcohol deshidrogenasa hepática de caballo. Las mezclas de reacción contenían Hepes 60 mM (pH 7), cloruro de potasio 50 mM, MgCl₂ 2 mM, NAD(P)H 0,25 mM (todos los productos eran de Sigma), pirofosfato de tiamina 0,5 mM, 10 unidades/ml de YqhD de *E. coli* purificado o alcohol deshidrogenasa hepática de caballo (Sigma) o alcohol deshidrogenasa de levadura (Sigma) y cantidades apropiadas de enzima purificado o extracto celular. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 2-oxo-4-hidroxiacetato (OHB) 20 mM, ácido 4-metil-2-oxovalérico 10 mM (MOV) o piruvato 5 mM. Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo a 37°C en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en un volumen final de 250 μl. Se realizó un seguimiento de las reacciones a partir de la absorción característica de NAD(P)H a 340 nm ($\epsilon_{NAD(P)H} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un lector de microplacas (BioRad 680XR).

50

Resultados: los resultados de los ensayos con descarboxilasa se resumen en la tabla 8. Se demostró que los enzimas KdcA de *L. lactis* y las piruvato descarboxilasas Sc-Pdc1 y Zm-Pdc presentaban una actividad significativa de OHB descarboxilasa.

- 5 Tabla 8: resumen de los parámetros cinéticos de enzimas candidatos seleccionados sobre su sustrato natural y OHB.

Enzima	Actividad específica máx. [μmoles/(mg min)]		Afinidad para el sustrato, Km [mM]	
	Sustrato natural ^a	OHB ^b	Sustrato natural ^a	OHB
LI-KdcA SEC ID n° 130	4	0,08	0,15	4
Zm-Pdc SEC ID n° 128	65	0,052	2,5	1,5
Sc-Pdc1 SEC ID n° 208	1,3	0,055	nd	nd

(a) Los sustratos naturales para KdcA y las piruvato descarboxilasas eran el ácido 4-metil-2-oxovalérico y el piruvato, respectivamente
 (b) En el caso de que el enzima no pudiese saturarse, la actividad específica máxima se refiere a la actividad estimada con una concentración de sustrato de 20 mM.
 ns - no saturado
 nd - no determinado

Ejemplo 5: construcción de enzimas con actividad mejorada de OHB descarboxilasa

- 10 Se llevó a cabo mutagénesis dirigida a sitio de los genes *kdcA* de *L. lactis* y *Pdc* de *Z. mobilis* utilizando las parejas de oligonucleótidos listadas en la tabla 9 y los plásmidos pET28-LI-kdcA y pET28-Zm-Pdc, respectivamente, como molde.

- 15 Tabla 9: oligonucleótidos utilizados para mutar la 2-oxoácido de cadena ramificada descarboxilasa, *kdcA*, de *L. lactis* y la piruvato descarboxilasa, *PDC*, de *Z. mobilis*

Proteína	Mutación	Secuencias de cebador 5' - 3'	Sitio de restr.
Zm-Pdc.	W392Q	GTTATTGCTGAAACCGGTGACTCTCAGTTCAATGCGCAGCGCATGAAGC (SEC ID n° 179) GCTTCATGCGCTGCGCATTGAACTGAGAGTCACCGGTTTCAGCAATAAC (SEC ID n° 180)	FSP1
Zm-Pdc	W392L	ACGGTTATTGCTGAAACCGGTGACTCTTTATTCAATGCGCAGCGCATGAAG CTC (SEC ID n° 181) GAGCTTCATGCGCTGCGCATTGAATAAAGAGTCACCGGTTTCAGCAATAAC CGT (SEC ID n° 182)	FSP1
Zm-Pdc	G413N	TATGAAATGCAGTGGAACCACATTGGTTGGTCGGTACCTGCCGCCTTC (SEC ID n° 183) GAAGGCGGCAGGTACCGACCAACCAATGTGGTTCCACTGCATTTTCATA (SEC ID n° 184)	KPNI
LI-Kdc	G402S	GGACAACCGCTGTGGTCCAGTATTGGGTATACGTTTCCAGCG (SEC ID n° 185) CGCTGGAAACGTATACCCAATACTGGACCACAGCGGTTGTCC (SEC ID n° 186)	ACC1
LI-Kdc	V461I	TTTGCTTTATCATTAAATAATGACGGCTACACAATCGAGCGCGAAATTCA ((SEC ID n° 187) TGAATTTGCGCTCGATTGTGTAGCCGTCATTATTAATGATAAAGCAAA (SEC ID n° 188)	ASE1

- 20 Se expresaron, purificaron y sometieron a ensayo enzimas mutantes para actividad de OHB descarboxilasa, piruvato descarboxilasa y MOV descarboxilasa tal como se indica en el ejemplo 4. Los resultados de las mediciones enzimáticas se resumen en la tabla 10. Se demostró que las mutaciones W392Q, W392L y G413N en Zm-Pdc y las mutaciones G402S y V461I en LI-KdcA incrementaron la actividad y/o la especificidad para OHB.

Tabla 10: resumen de parámetros cinéticos de mutantes de descarboxilasa sobre OHB, piruvato y MOV

Enzima mutante	Sec ID	Actividad específica máx. [μmoles/(mg min)]		Km [mM]	
		Sustrato natural ^a	OHB ^b	Sustrato natural	OHB
Zm-Pdc W392Q	SEC ID nº 190)	1,39	0,19	9,2	2,9
Zm-Pdc W392L	SEC ID nº 192)	0,09	0,04	ns	3,7
Zm-Pdc G413N	SEC ID nº 194)	0,1	0,04	ns	1,4
LI-KdcA G402S	SEC ID nº 196)	3,1	0,09	1,5	1,5
LI-KdcA V461I	SEC ID nº 198)	2,76	0,24	0,15	2,8

(a) - se midió la actividad con una concentración de MOV de 10 mM en el caso de los mutantes de *KdcA* y con piruvato 50 mM en el caso de los mutantes de *Pdc*
(b) - se midió la actividad a una concentración de OHB de 20 mM
(ns) - no saturado a concentraciones de hasta 50 mM

5 Ejemplo 6: demostración de la actividad de 1,3-propanodiol deshidrogenasa

Se amplificó por PCR la región codificante de *yqhD* de la alcohol deshidrogenasa de *Escherichia coli* utilizando la polimerasa de alta fidelidad Phusion™ (Finnzymes) y los cebadores directo e inverso 5'-TATCGTGCTAGCATGAACAACCTTAATCTGCACA-3' (SEC ID nº 199) y 5'-TATAATGAATTCTTAGCGGGCGGCTTCGTATATACGGCGGCTGACA-3' (SEC ID nº 200) que introdujeron los sitios de restricción *NheI* y *EcoRI* cadena arriba del codón de inicio y cadena abajo del codón de parada, respectivamente. Se utilizó ADN genómico de *E. coli* MG1655 como el molde. El producto de PCR se digirió con *NheI* y *EcoRI*, se ligó en los sitios correspondientes de pET28a+ (Novagen) en el mismo marco con una etiqueta hexa-His N-terminal utilizando ADN ligasa de T4 (Biolabs). El producto de ligación se transformó en células de *E. coli* DH5α. Se aisló plásmido pET28-Ec-yqhD resultante y se demostró mediante secuenciación de ADN que contenía la secuencia de longitud completa correcta del gen *yqhD* de *E. coli*. Se utilizó el plásmido para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) Star y el enzima se expresó y purificó con una etiqueta hexa-His N-terminal tal como se ha indicado en el ejemplo 1.

20 Ensayo enzimático: la actividad de PDO deshidrogenasa se sometió a ensayo mediante el seguimiento de la reducción de NADP dependiente de PDO.

Esquema de reacción: 1,3-propanodiol + NADP+ → 3-hidroxiopropional + NADPH

25 La mezcla de reacción contenía Hepes 60 mM (pH 8), cloruro de potasio 50 mM, ZnSO₄ 2 mM, NADP 10 mM (todos los productos eran de Sigma) y cantidades apropiadas del enzima purificado o extracto celular. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 1,3-propanodiol 100 mM (PDO, Sigma). Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo a 37°C en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en un volumen final de 250 μl. Se realizó un seguimiento de las reacciones a partir de la absorción característica del NADPH a 340 nm (ε_{NADH} = 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹) en un lector de microplacas (BioRad 680XR). El enzima mostraba una actividad de PDO deshidrogenasa de 0,15 μmoles/(min mg).

Ejemplo 6: demostración de la producción *in vitro* de 1,3-propanodiol mediante la ruta sintética

35 Se expresaron y purificaron los enzimas DHB deshidrogenasa (Ec-Mdh R81A o EcLldD), OHB descarboxilasa (Zm-Pdc o Sc-Pdc) y la PDO deshidrogenasa (Ec-YqhD) tal como se ha indicado en el ejemplo 1. Se demostró la síntesis *in vitro* de PDO mediante la adición de DHB 20 mM a una mezcla de reacción que contenía Hepes 50 mM (pH 7), pirofosfato de tiamina 50 μM, NADPH 2 mM, MgCl₂ 2 mM, NAD 10 mM o DCIP 1 mM, 160 μg/ml de DHB deshidrogenasa, 10 μg/ml de OHB descarboxilasa y 20 μg/ml de PDO deshidrogenasa. Las reacciones de control contenían todos los componentes pero no contenían DHB deshidrogenasa (Control 1) o no contenían OHB descarboxilasa (Control 2).

45 Tras 10 h de incubación a 37°C, se analizaron las mezclas de reacción mediante cromatografía de gases (GCMS-QP2010 Ultra Shimadzu), dotado de un detector FID (FID-2010 Plus Shimadzu); automuestreador AOC20s (Shimadzu), inyector sin divisor de flujo ('splitless') AOC20i (Shimadzu) (240°C); columna: Zebtron ZB-WAX, 30 m x 0,25 mm, df 0,25 μm y cámara de mezcla: 'tapered focus' de 5 x 95 x 3,4 mm (SGE). El gas portador era hidrógeno a un caudal total de 4,9 ml/min. La ionización de llama se llevó a cabo utilizando una mezcla de aire-hidrógeno (los caudales eran de 400 ml/min y 40 ml/min, respectivamente). La temperatura del detector era de 250°C. El volumen de muestra inyectado era de 1 μl. Se proporciona el programa de temperaturas en la tabla 11.

Tabla 11: programa de temperaturas utilizado para los análisis de CG-FID de las mezclas de reacción.

Temperatura de la columna [°C]	Mantenimiento [min]	Gradiente [°C/min]	Tiempo de operación [min]
50	0	0	0
95	0	20	2,15
160	5	40	3,52
230	2	50	12,27

5 Los cromatogramas que muestran la presencia de PDO en las reacciones que contenían todos los enzimas de la ruta y la ausencia de PDO en muestras que contenían únicamente dos de los tres enzimas de la ruta se muestran en las figuras 3 y 4.

Ejemplo 7: construcción de cepas productoras de propanodiol optimizadas

10 Construcción del plásmido pACT3-op-PDO para la expresión de DHB deshidrogenasa (Ec-Mdh R81A), OHB descarboxilasa (Zm-Pdc) y PDO deshidrogenasa (Ec-YqhD).

15 Se construyó el vector pACT3-yqhD mediante la amplificación de la secuencia codificante de *yqhD* utilizando los cebadores directo e inverso 5'-TATAATGAGCTCTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGAACAACCTTTAAT CTGCACACCCCAACC-3' (SEC ID nº 201) y 5'-TATAATGGATCCTTAGCGGGCGGCTTCGTA-3' (SEC ID nº 202) que añadieron un sitio de restricción *SacI* y uno *BamHI* cadena arriba del codón de inicio y cadena abajo del codón de parada. Se utilizó el plásmido pET28-yqhD como el molde. El fragmento de PCR se purificó y se ligó en los sitios *SacI* y *BamHI* del vector Pact3 (Dykxhoorn et al., A set of compatible tac promoter expression vectors, Gene 177:133-136, 1996). A continuación, se digirió el vector pACT3-yqhD en los sitios *XbaI* e *HindIII*,
20 situado en el extremo de la secuencia codificante *Ec-yqhD*. Se amplificaron por PCR los genes *Ec-mdh R81A* y *Zm-pdc* utilizando las parejas de cebadores 5'-GCCCGCTAAGGATCCTCTAGGGAGGTCTAGAATGAAAGTCGCAGTCCTCG GC-3' (SEC ID nº 203); 5'-CGAGCCTCCTTACTTATTAACGAACTCTTCGCC-3' (SEC ID nº 204), and 5'-CATAGGGAGGCTCGAGATGTATACCGTTGGGGATTATCTG-3' (SEC ID nº 205); 5'-CGCCAAAACAGAAGCTTGACGTCCTAGAGGAGCTTGTAAACAGGCTT-3', (SEC ID nº 206), respectivamente.
25 Los fragmentos amplificados por PCR (2 µl cada uno) y el plásmido pACT-yqhD digerido (3 µl) se mezclaron y se incubaron con 2 µl de enzima InFusion (Clontech) durante 20 min a 50°C. A continuación, se transformaron 2 µl de la mezcla de reacción en células competentes Stellar™. La presencia del operón completo en el plásmido pACT3-op-PDO resultante se confirmó mediante secuenciación del ADN plasmídico aislado que se recuperó a partir de los clones transformados.

30 Construcción de cepas con distribución de flujo de carbono optimizado para la producción de propanodiol

35 Se interrumpieron varios genes en *E. coli* cepa MG1655 con el fin de optimizar la distribución del flujo de carbono y el suministro de cofactores para la producción de PDO. Se llevaron a cabo eliminaciones de genes utilizando el procedimiento de la recombinasa Red de lambda según Datsenko et al. (Datsenko y Wanner, 2000), que puede refinarse para permitir eliminaciones génicas múltiples más eficientes utilizando el protocolo de Mizoguchi (Mizoguchi, Tanaka-Masuda y Mori, 2007). Una alternativa a la introducción de múltiples eliminaciones génicas en los cromosomas en *E. coli* se basa en la transferencia de mutaciones de una cepa a otra mediante transducción del fago P1 (Thomason, Costantino, Shaw y Court, 2007).

40 Se prepararon casetes de eliminación mediante PCR utilizando la polimerasa de alta fidelidad Phusion™ (Finnzymes) y el gen de resistencia a canamicina (kan) flanqueado por FRT del plásmido pKD4 como molde (Datsenko y Wanner, 2000). Los cebadores de sentido contenían secuencias correspondientes al extremo 5' de cada gen diana (subrayado) seguido de 20 pb correspondientes al casete FRT-kan-FRT de pKD4. Los cebadores antisentido contenían secuencias correspondientes a la región del extremo 3' de cada gen diana (subrayado) seguido de 20 pb correspondientes al casete. Los cebadores se indica en la tabla 11. Los productos de PCR se digirieron con *DpnI* y se purificaron antes de la transformación.

45 La cepa de *E. coli* MG1655 se convirtió en electrocompetente mediante el cultivo de las células hasta una DO₆₀₀ de 0,6 en medio líquido LB a 37°C, concentrando las células 100 veces y lavándolas dos veces con glicerol al 10% helado. Las células se transformaron con el plásmido pKD46 (Datsenko y Wanner, 2000) mediante electroporación (2,5 kV, 200 Ω, 25 µF en cubetas de 2 mm de paso). Se seleccionaron los transformantes a 30°C en medio sólido LB con ampicilina (100 µg/ml).

50 Se transformaron los casetes de disrupción en cepas de *E. coli* electrocompetentes que alojaban el plásmido pKD46 expresante de la recombinasa Red de Lambda. Las células se cultivaron a 30°C en medio SOB líquido que contenía ampicilina (100 µg/ml). El sistema de recombinasa Red de lambda se indujo mediante la adición de arabinosa 10 mM al alcanzar la DO₆₀₀ de los cultivos un valor de 0,1. Las células se cultivaron adicionalmente hasta una DO₆₀₀ de 0,6 antes de recolectarlas mediante centrifugación, lavarlas dos veces con glicerol al 10%

helado y transformarlas con el casete de disrupción mediante electroporación. Tras una expresión fenotípica durante la noche a 30°C en medio LB líquido, las células se sembraron en placas con medio LB sólido que contenía canamicina 25 µg/ml. Se seleccionaron los transformantes tras el cultivo a 30°C.

5 Se verificó la sustitución génica mediante PCR de las colonias utilizando polimerasa Taq Crimson (NEB). Se llevó a cabo una primera reacción con los cebadores específicos de locus flanqueantes (ver la tabla 12) con el fin de verificar la pérdida simultánea del fragmento parental y la ganancia del nuevo fragmento específico de mutante. Se llevaron a cabo dos reacciones adicionales mediante la utilización de un cebador específico de locus junto con uno de los cebadores correspondientes k1rev o k2for (ver la tabla 6) que se alinean dentro del casete de FRT-resistencia a canamicina (locus sentido cebador/k1rev y k2for/locus inverso cebador).

15 Seguidamente se extrajo el gen de resistencia (FRT-kan-FRT) del cromosoma utilizando el plásmido pCP20 que alojaba la recombinasa FLP (Cherepanov y Wackernagel, 1995), dejando una región cicatriz que contenía un sitio de FRT. pCP20 es un plásmido de ampicilina y CmR que muestra una replicación termosensible e inducción térmica de la síntesis de la recombinasa FLP. Se transformaron los mutantes resistentes a canamicina con pCP20 y se seleccionaron los transformantes resistentes a ampicilina a 30°C. A continuación, se cultivaron los transformantes sobre medio LB sólido a 37°C y se sometieron a ensayo para la pérdida de todas las resistencias a antibióticos. La extracción del casete de FRT-canamicina se analizó mediante PCR de colonias utilizando la polimerasa Taq Crimson y cebadores específicos de locus flanqueantes (Tabla 13). Se obtuvieron múltiples eliminaciones mediante la repetición de las etapas anteriormente descritas.

Tabla 12: cebadores utilizados para las disrupciones génicas. Las secuencias homólogas a los genes diana se encuentran subrayadas.

Gen	Cebador	Secuencia
<i>ldhA</i>	Δ_ldhA_for	<u>gaaggttgcgcctactactaagcatagttgtgatgagtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 1)
	Δ_ldhA_rev	<u>ttaaaccagttcgttcgggcaggtttcgaccttttcattgggaattagccatggctcc</u> SEC ID nº 2)
<i>adhE</i>	Δ_adhE_for	<u>atggctgttactaatgtcgcctgaactaacgcactcgtagagcgtgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 3)
	Δ_adhE_rev	<u>ttaaagcggatttttcgctttttctcagcttttagccggagcagccatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 4)
<i>ackA</i>	Δ_ackA_for	<u>atgtcgaqtaagttgactagctgttctgaactcgggttagttcttcagtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 5)
	Δ_ackA_rev	<u>tcagggcagtcagggcgtcgcgtcttgcgcgataaacagttcttccatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 6)
<i>focA-pflB</i>	$\Delta_focA-pflB_for$	<u>ttactccgtatttgcataaaaaccatgcgagttacggccctataagtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 7)
	$\Delta_focA-pflB_rev$	<u>ataqattgagtgaaqgtacagagtaataacgtcctgctgctgttctcatatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 8)
<i>pta</i>	Δ_pta_for	<u>gtgtcccgtattattatgctgatccctaccggaaccagcgtcgggtgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 9)
	Δ_pta_rev	<u>ttactgctgctgtagactgaatcgcagtcagcgcagtggtgtaacatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 10)
<i>poxB</i>	Δ_poxB_for	<u>atgaaacaaacggttgcagcttatatcgcgcaaaacactcgaatcgggtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 11)
	Δ_poxB_rev	<u>ttacctagaccagttgttttcgccagttcagatcacttcatcaccatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 12)
<i>sad</i>	Δ_sad_for	<u>atgaccattactccggcaactcatgcaatttcgataaaatcctgccgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 13)
	Δ_sad_rev	<u>tcagatccggctttccacaccgctcggatattacagaattcgtgcatatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 14)
<i>gabD</i>	Δ_gabD_for	<u>atgaaactaacgcagtaacttattccgaccagcagcgttgattgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 15)
	Δ_gabD_rev	<u>ttaaagaccgatgcacataatfttgaattcgaatcctcagatcatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 16)
<i>gadA</i>	Δ_gadA_for	<u>atggaccagaagctgttaacggatttccgctcagaactactcgaatgtaggctggagctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 17)
	Δ_gadA_rev	<u>tcaggtgtgttaaagctgttctgctgogcaataaccctgcagtttcatatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 18)
<i>gadB</i>	Δ_gadB_for	<u>atggataaqaagcaagtaacggatttaaggtcggaaactactcgaatgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 19)
	Δ_gadB_rev	<u>tcaggtatgtttaaagctgttctgttgggcaataaccctgcagtttcatatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 20)
<i>gadC</i>	Δ_gadC_for	<u>atggctacatcagtacagacaggtaaagctaagcagctcattatgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 21)
	Δ_gadC_rev	<u>ttagtgttctgtcattcatcaaatatagttggtgaacgtgcacatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 22)
<i>sfcA</i>	Δ_sfcA_for	<u>atggaacaaaaacaaaaaacagcgttcgctttatattcccttacgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 23)
	Δ_sfcA_rev	<u>ttagatggaggtacggcggtagtcgctgattcggcttccagaaacatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 24)
<i>maeB</i>	Δ_maeB_for	<u>atggatgaccagttaaaacaagatgcactgatttccatgaatttgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 25)
	Δ_maeB_rev	<u>ttacagcggttgggtttgcgcttctaccacggccagcgcaccatcatatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 26)
<i>pykA</i>	Δ_pykA_for	<u>atgtccagaaggcttcgcagaacaaaaatcgttaccacgttagggcgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 27)
	Δ_pykA_rev	<u>ttactctaccgtttaaataacgcgtgtgattagtagaaccacggctcatatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 28)
<i>pykF</i>	Δ_pykF_for	<u>atgaaaaagacaaaattgttgcaccatcggaccgaaacggaaagtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 29)
	Δ_pykF_rev	<u>ttacaggacgtgaacagatcgggtttagtagtgcgctcggttaccatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 30)
<i>mgsA</i>	Δ_mgsA_for	<u>atggaactgacgactcgcactttacctgcgcggaacatattcgggtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 31)
	Δ_mgsA_rev	<u>ttacttcagacggttcccgagataaacgctgataatcggggatcagcatatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 32)
<i>iclR</i>	Δ_iclR_for	<u>atggctgcacccattcccgcgaaacgcggcagaaaaccgcccgttgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 33)
	Δ_iclR_rev	<u>tcagcgcattccaccgtagcgcagcgtcacttctcgcgcttcatatgaataatcctccttag</u> (SEC ID nº 34)
<i>icd</i>	Δ_icd_for	<u>atggaagtaagtagttgttccggcacaaggcaagaagatcacctgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID nº 35)

Gen	Cebador	Secuencia
<i>sucA</i>	Δ_{icd_rev}	ttacatgtttcgatgatcgctcaccacaaactgaacatttcagcatatgaatatcctccttag (SEC ID nº 36)
	Δ_{sucA_for}	atgcagaacagcgctttgaaagcctgggtgactcttctaccctgtaggctggagctgcttc (SEC ID nº 37)
<i>sucB</i>	Δ_{sucA_rev}	ttattcgagcttcagcgctcattaacagatctgtgtgctttcatatgaatatcctccttag (SEC ID nº 38)
	Δ_{sucB_for}	atgagtagcgtatgatattctggctcctgacctgctgaatccgtagttaggctggagctgcttc (SEC ID nº 39)
<i>frdA</i>	Δ_{sucB_rev}	ctacacgtccagcagcagcgcgctcggatctccagcaactctttcatatgaatatcctccttag (SEC ID nº 40)
	Δ_{frdA_for}	gtgcaaacctttcaagccgacttgcattgtaggcgcgggtggcgtgtaggctggagctgcttc (SEC ID nº 41)
<i>frdB</i>	Δ_{frdA_rev}	tcagccattcgcttctcctcttattggcgtctccgcttatccatgaatatcctccttag (SEC ID nº 42)
	Δ_{frdB_for}	atggctgagatgaaaaaactgaaaattgagggtgctgctataacgtgtaggctggagctgcttc (SEC ID nº 43)
<i>frdC</i>	Δ_{frdB_rev}	ttagcgtggttcagggtcgcgataagaaagtcttcgaactttccatgaatatcctccttag (SEC ID nº 44)
	Δ_{frdC_for}	atgacgactaaacgtaaacctgatgtacggccaatgacgtccaccgtgtaggctggagctgcttc (SEC ID nº 45)
<i>frdD</i>	Δ_{frdC_rev}	ttaccagtacagggcaacaacaggattacgatggtggcaaccaccatgaatatcctccttag (SEC ID nº 46)
	Δ_{frdD_for}	atgattaatccaaatccaaagcgttctgacgaaccggtattctgggtgtaggctggagctgcttc (SEC ID nº 47)
<i>ptsI</i>	Δ_{frdD_rev}	ttagattgaacgacaccaatcagcgtgacaactgtcaggatagccatgaatatcctccttag (SEC ID nº 48)
	Δ_{ptsI_for}	atgatttcagcattttagcatcccgcgtctccgcttccggttaagtgtaggctggagctgcttc (SEC ID nº 49)
<i>ptsG</i>	Δ_{ptsI_rev}	ttagcagattgtttttctcaatgaactgttaaccagcgtcatcatgaatatcctccttag (SEC ID nº 50)
	Δ_{ptsG_for}	atgtttaagaatgcatttgcctaacctgcaaaagctcggtaaatcgggtgtaggctggagctgcttc (SEC ID nº 51)
<i>lacl</i>	Δ_{ptsG_rev}	ttagtgttcagcgtatctatccatctcgggtttcaggtatccatgaatatcctccttag (SEC ID nº 52)
	Δ_{lacl_for}	gtgaaaccagtaacgttatacagatgtcgcagagtatcgggtgctgtaggctggagctgcttc (SEC ID nº 53)
<i>pgi</i>	Δ_{lacl_rev}	tcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcatcatatgaatatcctccttag (SEC ID nº 54)
	Δ_{pgi_for}	atgaaaaacatcaatccaacgcagaccgctgcctggcaggcactagtgtaggctggagctgcttc (SEC ID nº 55)
<i>eda</i>	Δ_{eda_for}	ttaccgcccagcgtttatagcggtaatacagaccattggtcgcacatgaatatcctccttag (SEC ID nº 56)
	Δ_{eda_rev}	atgaaaaactgaaaaacaagtgcagaatcaatcctgaccaccgctgtaggctggagctgcttc (SEC ID nº 57)
		ctcgatcggcattttgacttttacagcttagcgcttctacagcratgaatatcctccttag (SEC ID nº 58)

Tabla 13: parejas de cebadores utilizadas para la verificación de las disrupciones génicas.

Gen eliminado	Secuencia (5' - 3')	
	Cebador directo	Cebador inverso
<i>K2 for / k1 rev</i>	cggtgcccgtgaatgaactgc (SEC ID nº 59)	cagtcataagccgaatagcct (SEC ID nº 60)
<i>ldhA</i>	atacgtgtcccagcggttag (SEC ID nº 61)	tacacatcccgcctacagca (SEC ID nº 62)
<i>adhE</i>	gaagtaaacgggaaaatcaa (SEC ID nº 63)	agaagtgccataagaaaacg (SEC ID nº 64)
<i>ackA</i>	ccattggctgaaaattacgc (SEC ID nº 65)	gttccattgcacggatcacg (SEC ID nº 66)
<i>focA_pflB</i>	atgcctgtagaagccgccagt (SEC ID nº 67)	tgttggtgcgcagctcgaag (SEC ID nº 68)
<i>pta</i>	gcaaatctggtttcatcaac (SEC ID nº 69)	tccctgcacaaaaaaagt (SEC ID nº 70)
<i>poxB</i>	ggattggttctcgcataat (SEC ID nº 71)	agcattaacggtagggtcgt (SEC ID nº 72)
<i>sad</i>	gctgattctcgcgaataaac (SEC ID nº 73)	aaaaacgttcttgcgcgtct (SEC ID nº 74)
<i>gabD</i>	tctgtttgtcaccaccocgc (SEC ID nº 75)	aagccagcacctggaagcag (SEC ID nº 76)
<i>gadA</i>	aagagctgccgcaggaggat (SEC ID nº 77)	gccgcctcctaagtcaaat (SEC ID nº 78)
<i>gadB</i>	ggattttagcaatattcgt (SEC ID nº 79)	cctaatagcaggaagaagac (SEC ID nº 80)
<i>gadC</i>	gctgaactgttctggaaga (SEC ID nº 81)	ggcgtgctttacaactaca (SEC ID nº 82)
<i>sfcA</i>	tagtaataaccaaccggc (SEC ID nº 83)	tcagtagcgcagctgtttta (SEC ID nº 84)
<i>maeB</i>	attaatggtgagagtttga (SEC ID nº 85)	tgctttttttattatcgc (SEC ID nº 86)
<i>pykA</i>	tttatatgccatggtttct (SEC ID nº 87)	atctgttagaggcggatgat (SEC ID nº 88)
<i>pykF</i>	ctggaacgttaaatctttga (SEC ID nº 89)	ccagtttagtagctttcatt (SEC ID nº 90)
<i>iclR</i>	gattgttcaacattaactcatcg (SEC ID nº 91)	tgcgattaacagacaccctt (SEC ID nº 92)
<i>mgsA</i>	tctcagggtctcacagaaca (SEC ID nº 93)	tatggaagaggcgtactgc (SEC ID nº 94)
<i>icd</i>	cgacctgctgcataaacacc (SEC ID nº 95)	tgaacgtaaggtgattgca (SEC ID nº 96)
<i>sucA</i>	acgtagacaagagctcga (SEC ID nº 97)	catcacgtacgactgcgtc (SEC ID nº 98)
<i>sucB</i>	tgcaacttggctgagcaa (SEC ID nº 99)	tatcgcttccgggcaattgc (SEC ID nº 100)
<i>frdA</i>	aaatcgatctcgtcaaatccagac (SEC ID nº 101)	aggaaccacaaatcgccata (SEC ID nº 102)
<i>frdB</i>	gacgtgaagattactacgct (SEC ID nº 103)	agttcaatgctgaaccacac (SEC ID nº 104)
<i>frdC</i>	tagccgcgaccacggaagaaggag (SEC ID nº 105)	cagcgcatacccccgaaca (SEC ID nº 106)
<i>frdD</i>	atcgtgatcattaacctgat (SEC ID nº 107)	ttaccctgataaattaccgc (SEC ID nº 108)
<i>lacl</i>	gaatcgtgttatatggcga (SEC ID nº 109)	tcttcgtattacgccagct (SEC ID nº 110)
<i>pgi</i>	ttgcaacgatgggtcatg (SEC ID nº 111)	aaaaatgccgacataactc (SEC ID nº 112)
<i>ptsG</i>	ccatcgttgaatgagtttt (SEC ID nº 113)	tggtgtaactggcaaaatc (SEC ID nº 114)
<i>ptsI</i>	gtgactccaacggcaaaag (SEC ID nº 115)	ccgttggtttgatgcaata (SEC ID nº 116)
<i>edo</i>	Gacagacaggcgaactgacg (SEC ID nº 117)	Gcgcagatttcagattcgt (SEC ID nº 118)

5 El plásmido que expresaba los enzimas que constituyen la ruta que conduce de DHB a pDO (pACT3-op-PDO) se transformaron en la cepa *E. coli* MG1655 de tipo salvaje. Se seleccionaron los transformantes sobre medio LB

sólido que contenía cloranfenicol (25 µg/ml) y canamicina (50 µg/ml). En la tabla 14 se listan ejemplos no exclusivos de las cepas construidas.

Tabla 14: ejemplos de cepas construidas para la producción de DHB.

5

Cepa	Genotipo relevante
MG1655	Tipo salvaje
ECE90	pACT3 (plásmido vacío)
ECE91	pACT3-op-PDO

Ejemplo 8: producción zimótica de propanodiol

10 Cepas y medio: se llevaron a cabo experimentos con las cepas listadas en la tabla 14. Un litro de medio de cultivo contenía 20 g de glucosa, 18 g de Na₂HPO₄·12H₂O, 3 g de KH₂PO₄, 0,5 g de NaCl, 2 g de NH₄Cl, 0,5 g de MgSO₄·7H₂O, 0,015 g de CaCl₂·2H₂O, 1 ml de solución madre de FeCl₃ 0,06 moles/l preparada en HCl concentrado diluido 100 veces, 2 ml de solución madre de HCl de tiamina 10 mM, 20 g de MOPS y 1 ml de solución de elementos traza (que contenía por litro: 0,04 g de Na₂EDTA·2H₂O, 0,18 g de CoCl₂·6H₂O, ZnSO₄·7H₂O, 0,04 g de Na₂MoO₄·2H₂O, 0,01 g de H₃BO₃, 0,12 g de MnSO₄·H₂O, 0,12 g de CuCl₂·H₂O). Se ajustó el pH del medio a 7 y el medio se esterilizó mediante filtración. Se añadió cloranfenicol (Sigma) a una concentración de 25 µg/ml.

20 Condiciones de cultivo: todos los cultivos se llevaron a cabo a 37°C en un agitador rotatorio Infors operando a 170 rpm. Se cultivaron las células sobre medio mineral que contenía glucosa. Se sometió a ensayo la producción de PDO bajo dos condiciones:

(A) crecimiento sobre medio mineral que contiene glucosa en presencia de DHB 20 mM, o

(B) incubación de una suspensión celular en tampón de fosfato con DHB 20 mM.

25 Datos experimentales para la condición (A): se inocularon cultivos de durante la noche ('overnight') (3 ml de medio en probeta) a partir de stocks en glicerol y se utilizaron para ajustar una DO₆₀₀ inicial de 0,05 en cultivos de crecimiento de 100 ml cultivados en matraces de agitación de 500 ml. Se añadió IPTG a una concentración de 1 mmol/l tras alcanzar la DO₆₀₀ en los cultivos de crecimiento el valor de 1. Simultáneamente se añadió DHB a los cultivos a una concentración de 20 mM. Se analizó el sobrenadante de los cultivos tras 20 h de incubación.

35 Datos experimentales para la condición (B): se inocularon cultivos de durante la noche (3 ml de medio en probeta) a partir de stocks en glicerol y se utilizaron para ajustar una DO₆₀₀ inicial de 0,05 en cultivos de crecimiento de 100 ml cultivados en matraces de agitación de 500 ml. Se añadió IPTG a una concentración de 1 mmol/l tras alcanzar la DO₆₀₀ en los cultivos de crecimiento un valor de 1. Se recolectaron las células mediante centrifugación tras la incubación con IPTG durante 4 h. Se lavaron las células dos veces con agua destilada y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de fosfato 50 mM a pH 7 para ajustar la densidad celular a 5,5 g (peso celular seco)/l. Se añadió DHB a una concentración de 20 mM. Se cuantificó el contenido de PDO tras 20 h de incubación.

40 Estimación de la concentración de PDO mediante análisis de CL-EM: se llevó a cabo una cromatografía líquida de intercambio aniónico en un sistema ICS-3000 de Dionex (Sunnyvale, USA) dotado de un sistema generador de eluyente (KOH) automático (RFIC, Dionex) y un automuestreador (AS50, Dionex) que mantenía las muestras a 4°C. Se separaron los analitos en una columna IonPac AS11 HC (250 x 2 mm, Dionex) protegida por una precolumna AG11 HC (50 x 2 mm, Dionex). Se mantuvo la temperatura de la columna a 25°C; se fijó el caudal a 0,25 ml/min y se eluyeron los analitos aplicando el gradiente de KOH indicado anteriormente (Groussac E., Ortiz M. y Francois J.: Improved protocols for quantitative determination of metabolites from biological samples using high performance ionic-exchange chromatography with conductimetric and pulsed amperometric detection, Enzyme Microb. Technol. 26:715-723, 2000). El volumen de muestra inyectada fue de 15 µl. Para la reducción del fondo, se utilizó un supresor de aniones ASRS Ultra II (2 mm, modo de agua externa, 75 mA). Los analitos se cuantificaron utilizando un detector sensible a la masa (MSQ Plus, Thermo) operando en modo ESI (divisor de flujo: 1/3, presión de nitrógeno: 90 psi, voltaje capilar: 3,5 kV, temperatura de la sonda: 450°C).

Resultados:

55 Condición A: la concentración de PDO en el sobrenadante de las cepas ECE90 y ECE91 tras 20 h de incubación era de 0 mg/l y 0,92 mg/l, respectivamente.

60 Condición B: la concentración de PDO en el sobrenadante de las cepas ECE90 y ECE91 tras 20 h de incubación era de 0,11 mg/l y 7,56 mg/l, respectivamente.

Por lo tanto, se demostró la producción zimótica de PDO mediante la ruta sintética.

Referencias

- 5 Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W.(1995).Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*158, 9-14.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L.(2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*97, 6640-6645.
- 10 Emptage, M., Haynie, S. L., Laffend, L. A., Pucci, J. P. & Whited, G. M.(2000). process for the biological production of 1,3-propanediol with high titer.
- Hädicke, O. & Klamt, S.(2010). CASOP: a computational approach for strain optimization aiming at high productivity. *J. Biotechnol*147, 88-101.
- 15 Klamt, S., Saez-Rodriguez, J. & Gilles, E. D.(2007).Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. *BMC Syst Biol*1, 2.
- Laffend, L. A., Nagarajan, V. & Nakamura, C. E.(1995). Bioconversion of a fermentable carbon source to 1,3-propanediol by a single microorganism.
- 20 Mizoguchi, H., Tanaka-Masuda, K. & Mori, H.(2007).A simple method for multiple modification of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Biosci. Biotechnol. Biochem*71, 2905-2911.
- 25 Nakamura, C. E. & Whited, G. M.(2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol*14, 454-459.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.(1989).*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 éd. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 30 Saxena, R. K., Anand, P., Saran, S. & Isar, J.(2009). Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol. Adv*27, 895-913.
- Schuster, S., Dandekar, T. & Fell, D. A.(1999). Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends Biotechnol*17, 53-60.
- 35 Thomason, L. C., Costantino, N., Shaw, D. V. & Court, D. L.(2007). Multicopy plasmid modification with phage lambda Red recombineering. *Plasmid*58, 148-158.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> INSA		
5	<120> Microorganismo para la producción de 1,3-propanodiol		
	<130> BR079240		
	<150> 61/670389		
10	<151> 2012-07-11		
	<160> 208		
	<170> PatentIn versión 3.5		
15	<210> 1		
	<211> 56		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador de amplificación		
	<400> 1		
25	gaaggtgcg cctacactaa gcatagttgt tgatgagtgt aggctggagc tgcttc	56	
	<210> 2		
	<211> 56		
	<212> ADN		
30	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de amplificación		
35	<400> 2		
	ttaaaccagt tcgttcgggc aggttcgcc ttttcatgg gaattagcca tggctc	56	
	<210> 3		
	<211> 65		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de amplificación		
45	<400> 3		
	atggctgttta ctaatgtcgc tgaacttaac gcactcgtag agcgtgtgta ggctggagct	60	
	gcttc	65	
	<210> 4		
50	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
55	<223> Cebador de amplificación		
	<400> 4		
	ttaagcggat tttttcgctt ttttctcagc tttagccgga gcagccatat gaatatcctc	60	
60	cttag	65	
	<210> 5		
	<211> 65		
	<212> ADN		

ES 2 672 883 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 5 <400> 5
 atgtcgagta agttagtact ggttctgaac tgcggtagtt cttcagtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

<210> 6
 10 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Cebador de amplificación

<400> 6
 tcaggcagtc aggcggctcg cgtcttgccg gataaccagt tcttccatat gaatadcctc 60
 cttag 65

<210> 7
 20 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Cebador de amplificación

<400> 7
 ttactccgta tttgcataaa aaccatgcga gttacgggcc tataagtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

<210> 8
 30 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Cebador de amplificación

<400> 8
 atagattgag tgaaggtagc agtaataacg tctctgctgct gttctcatat gaatadcctc 60
 cttag 65

<210> 9
 40 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 9
 50 gtgtcccgta ttattatgct gatccctacc ggaaccagcg tcggtgtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

<210> 10
 55 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 672 883 T3

<220>
 <223> Cebador de amplificación

5 <400> 10
 ttactgctgc tgtgcagact gaatcgcagt cagcgcgatg gtgtacatat gaataccctc 60
 cttag 65

<210> 11
 <211> 65
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

15 <400> 11
 atgaaacaaa cggttgcagc ttatatcgcc aaaacactcg aatcgggtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

<210> 12
 <211> 65
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

25 <400> 12
 ttacccttagc cagtttgttt tcgccagttc gatcacttca tcaccatata gaataccctc 60
 cttag 65

<210> 13
 <211> 65
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

35 <400> 13
 atgaccatta ctccggcaac tcatgcaatt tcgataaatc ctgccgtgta ggctggagct 60
 40 gcttc 65

<210> 14
 <211> 65
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

50 <400> 14
 tcagatccgg tctttccaca ccgtctggat attacagaat tcgtgcatat gaataccctc 60
 cttag 65

<210> 15
 <211> 65
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 672 883 T3

<220>
 <223> Cebador de amplificación

 <400> 15
 atgaaactta acgacagtaa cttattccgc cagcaggcgt tgattgtgta ggctggagct 60
 5 gcttc 65

 <210> 16
 <211> 65
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de amplificación

 15 <400> 16
 ttaaagaccg atgcacatat atttgatttc taagtaatct tcgatcatat gaatatacctc 60
 cttag 65

 <210> 17
 <211> 65
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de amplificación

 25 <400> 17
 atggaccaga agctgttaac ggatttccgc tcagaactac tcgatgtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

 <210> 18
 <211> 65
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Cebador de amplificación

 <400> 18
 tcaggtgtgt ttaaagctgt tctgctgggc aataccctgc agtttcatat gaatatacctc 60
 cttag 65

 40 <210> 19
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Cebador de amplificación

 <400> 19
 atggataaga agcaagtaac ggatttaagg tcggaactac tcgatgtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

 50 <210> 20
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>

ES 2 672 883 T3

<223> Cebador de amplificación

<400> 20
tcaggtatgt ttaaagctgt tctggtgggc aataccctgc agtttcatat gaatatacctc 60

5 **cttag** 65

<210> 21
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 21
atggctacat cagtacagac aggtaaagct aagcagctca cattagtgtgta ggctggagct 60

15 **gcttc** 65

<210> 22
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador de amplificación

25 <400> 22
ttagtgtttc ttgtcattca tcacaatata gtgtggtgaa cgtgccatat gaatatacctc 60

cttag 65

30 <210> 23
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 23
atggaaccaa aaacaaaaa acagcgttcg ctttatatcc cttacgtgtgta ggctggagct 60

40 **gcttc** 65

<210> 24
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 24
ttagatggag gtacggcggg agtcgcggta ttcggcttgc cagaacatat gaatatacctc 60

50 **cttag** 65

<210> 25
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador de amplificación

ES 2 672 883 T3

<400> 25
 atggatgacc agttaaaca aagtgcactt gatttccatg aatttgtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

5 <210> 26
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 26
 ttacagcggg tgggtttgcg cttctaccac ggccagcgcc accatcatat gaatcctc 60
 cttag 65

15 <210> 27
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 27
 atgtccagaa ggcttcgcag aacaaaaatc gttaccacgt taggcgtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

25 <210> 28
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador de amplificación

35 <400> 28
 ttactctacc gttaaaatac gcgtggtatt agtagaaccc acggtcatat gaatcctc 60
 cttag 65

40 <210> 29
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 29
 atgaaaaaga ccaaaattgt ttgcaccatc ggaccgaaaa ccgaagtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

50 <210> 30
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador de amplificación

ES 2 672 883 T3

	<400> 30	
	ttacaggacg tgaacagatg cgggtgtagt agtgccgctc ggtaccatat gaatatacctc	60
	cttag	65
5	<210> 31 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de amplificación	
	<400> 31	
	atggaactga cgactcgcac tttacctgcg cggaaacata ttgcggtgta ggctggagct	60
15	gcttc	65
20	<210> 32 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación	
25	<400> 32	
	ttacttcaga cggtcgcga gataacgctg ataatcgggg atcagcatat gaatatacctc	60
	cttag	65
30	<210> 33 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación	
35	<400> 33	
	atggtcgcac ccattcccgc gaaacgcggc agaaaaccgc ccgttgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
40	<210> 34 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación	
45	<400> 34	
	tcagcgcatt ccaccgtacg ccagcgtcac ttccttcgcc gctttcatat gaatatacctc	60
	cttag	65
50	<210> 35 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador de amplificación	
	<400> 35	

ES 2 672 883 T3

	atggaaagta aagtagttgt tccggcaciaa ggcaagaaga tcaccgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
5	<210> 36 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación	
10	<400> 36 ttacatgttt tcgatgatcg cgtcaccaaa ctctgaacat ttcagcatat gaatatacctc	60
	cttag	65
15	<210> 37 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación	
20	<400> 37 atgcagaaca gcgctttgaa agcctggttg gactcttctt acctcgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
25	<210> 38 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación	
30	<400> 38 ttattcgacg ttcagcgcgt cattaaccag atcttggtgc tgtttcatat gaatatacctc	60
	cttag	65
35	<210> 39 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación	
40	<400> 39 atgagtagcg tagatattct ggtccctgac ctgcctgaat ccgtagtgta ggctggagct	60
45	gcttc	65
	<210> 40 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación	
50	<400> 40 ctacacgtcc agcagcagac gcgtcggatc ttccagcaac tctttcatat gaatatacctc	60

	cttag	65
	<210> 41	
5	<211> 65	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador de amplificación	
	<400> 41	
	gtgcaaacct ttcaagccga tcttgccatt gtaggcgccg gtggcgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
15	<210> 42	
	<211> 65	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador de amplificación	
	<400> 42	
	tcagccattc gcctttctct tcttattggc tgcttccgcc ttatccatat gaatatacctc	60
25	cttag	65
	<210> 43	
	<211> 65	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador de amplificación	
	<400> 43	
	atggctgaga tgaaaaacct gaaaattgag gtggctgcgct ataacgtgta ggctggagct	60
35	gcttc	65
	<210> 44	
	<211> 65	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de amplificación	
45	<400> 44	
	ttagcgtggt ttcagggctc cgataagaaa gtctttcgaa ctttccatat gaatatacctc	60
	cttag	65
	<210> 45	
	<211> 65	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de amplificación	
55	<400> 45	

ES 2 672 883 T3

atgacgacta aacgtaaacc gtatgtacgg ccaatgacgt ccaccgtgta ggctggagct 60
 gcttc 65
 <210> 46
 <211> 65
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 10 <400> 46
 ttaccagtac agggcaacaa acaggattac gatgggtggca accaccatat gaataticctc 60
 cttag 65
 <210> 47
 15 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador de amplificación
 <400> 47
 atgattaatc caaatccaaa gcgttctgac gaaccggat tctgggtgta ggctggagct 60
 gcttc 65
 25 <210> 48
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 48
 ttagattgta acgacaccaa tcagcgtgac aactgtcagg atagccatat gaataticctc 60
 cttag 65
 35 <210> 49
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 49
 45 atgatttcag gcatttttagc atccccgggt atcgctttcg gtaaagtgta ggctggagct 60
 gcttc 65
 <210> 50
 50 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador de amplificación
 <400> 50

ES 2 672 883 T3

	ttagcagatt gttttttctt caatgaactt gttaaccagc gtcacatata gaatatacctc	60
	cttag	65
5	<210> 51 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación	
10	<400> 51 atggttaaga atgcatttgc taacctgcaa aaggtcggta aatcgggtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
15	<210> 52 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación	
20	<400> 52 ttagtggtta cggatgtact catccatctc ggttttcagg ttatccatata gaatatacctc	60
	cttag	65
25	<210> 53 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación	
30	<400> 53 gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca gagtatgccg gtgtcgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
35	<210> 54 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador de amplificación	
	<400> 54 tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcacatata gaatatacctc	60
45	cttag	65
	<210> 55 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador de amplificación	
55	<400> 55	

ES 2 672 883 T3

atgaaaaaca tcaatccaac gcagaccgct gcctggcagg cactagtgta ggctggagct 60
 gcttc 65
 <210> 56
 <211> 65
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 10 <400> 56
 ttaaccgcgc cacgctttat agcggttaat cagaccattg gtcgacatat gaatatacctc 60
 cttag 65
 <210> 57
 <211> 65
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador de amplificación
 <400> 57
 atgaaaaact gaaaaacaag tgcagaatca atcctgacca cggcgtgta ggctggagct 60
 gcttc 65
 25 <210> 58
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 58
 35 ctcgatcggg cattttgact ttacagctt agcgccttct acagccatat gaatatacctc 60
 cttag 65
 <210> 59
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 45 <400> 59
 cgtgcccctg aatgaactgc 20
 <210> 60
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 55 <400> 60
 cagtcatagc cgaatagcct 20
 60 <210> 61

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

5 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 61
 atacgtgtcc cgagcggtag 20

10 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 62
 tacacatccc gccatcagca 20

<210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

30 <400> 63
 gaagtaaacg ggaaaatcaa 20

<210> 64
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

40 <400> 64
 agaagtggca taagaaaacg 20

<210> 65
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Cebador de amplificación

<400> 65
 ccattggctg aaaattacgc 20

55 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 66
 gttccattgc acggatcacg 20

65 <210> 67

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 67
 atgccgtaga agccgccagt 20
 10 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 68
 20 tgttggcg cagctcgaag 20
 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 30 <400> 69
 gcaaactggt tttcatcaac 20
 <210> 70
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 40 <400> 70
 tccctgcac aaaacaaagt 20
 <210> 71
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de amplificación
 <400> 71
 ggattgggt ctcgcataat 20
 55 <210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 72
 65 agcattaacg gtagggtcgt 20
 <210> 73

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 73
 gctgattctc gcgaataaac 20
 10 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 74
 20 aaaaacgttc ttgcgcgtct 20
 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 30 <400> 75
 tctgtttgtc accaccccgcc 20
 <210> 76
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 40 <400> 76
 aagccagcac ctggaagcag 20
 <210> 77
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de amplificación
 <400> 77
 aagagctgcc gcaggaggat 20
 55 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 78
 65 gccgccctct taagtcaaat 20
 <210> 79

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 79
 ggatttagc aatattcgct 20
 10 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 80
 20 cctaatagca ggaagaagac 20
 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 30 <400> 81
 gctgaactgt tgctggaaga 20
 <210> 82
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 40 <400> 82
 ggcgtgcttt tacaactaca 20
 <210> 83
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de amplificación
 <400> 83
 tagtaaataa cccaaccggc 20
 55 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 84
 65 tcagtgagcg cagtgttta 20
 <210> 85

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 85
 attaatggtg agagtttga 20
 10 <210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 86
 20 tgctttttt tattattcg 20
 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 30 <400> 87
 tttatatgcc catggttct 20
 <210> 88
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 40 <400> 88
 atctgtaga ggcggatgat 20
 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 50 <400> 89
 ctggaacgtt aaatcttga 20
 55 <210> 90
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 90
 65 ccagtttagt agcttcatt 20
 <210> 91

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 91
 gatttgtca acattaactc atcgg 25
 10 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 92
 20 tgcgattaac agacaccctt 20
 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 30 <400> 93
 tctcaggtgc tcacagaaca 20
 <210> 94
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 40 <400> 94
 tatggaagag gcgctactgc 20
 <210> 95
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de amplificación
 <400> 95
 cgacctgctg cataaacacc 20
 55 <210> 96
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 96
 65 tgaacgctaa ggtgattgca 20
 <210> 97

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 97
 acgtagacaa gagctcgcaa 20
 10 <210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 98
 20 catcacgtac gactgcgtcg 20
 <210> 99
 <211> 19
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 30 <400> 99
 tgcaacttg tgctgagca 19
 <210> 100
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 40 <400> 100
 tatcgctcc ggcattgctc 20
 <210> 101
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 50 <400> 101
 aaatgatct cgtcaaattt cagac 25
 55 <210> 102
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 102
 65 aggaaccaca aatcgccata 20
 <210> 103

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 103
 gacgtgaaga ttactacgct 20
 10 <210> 104
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 104
 20 agttcaatgc tgaaccacac 20
 <210> 105
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 30 <400> 105
 tagccgcgac cacggaaga aggag 25
 <210> 106
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 40 <400> 106
 cagcgcatca cccgaaaca 20
 <210> 107
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de amplificación
 <400> 107
 atcgtgatca ttaacctgat 20
 55 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 108
 ttacctgat aaattaccgc 20
 65 <210> 109

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 109
 gaatctggtg tatatggcga 20
 10 <210> 110
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 110
 20 tcttcgctat tacgccagct 20
 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 30 <400> 111
 ttgtcaacga tggggtcatg 20
 <210> 112
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 40 <400> 112
 aaaaatgccg acataacgtc 20
 <210> 113
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de amplificación
 <400> 113
 ccatccgttg aatgagttt 20
 55 <210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 114
 65 tgggtgtaac tggcaaatc 20
 <210> 115

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

5 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 115
 gtgactcca acggcaaaag 20

10 <210> 116
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 116
 ccggttggtt gatagcaata 20

20 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 117
 gacagacagg cgaactgacg 20

30 <210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 118
 gcgcagattt gcagattcgt 20

40 <210> 119
 <211> 978
 <212> ADN
 <213> Lactococcus lactis

45 <400> 119

ES 2 672 883 T3

atggctgata aacaacgtaa aaaagttatc cttgtaggtg acggtgctgt aggttcatca 60
 tacgcctttg ctcttgtaaa ccaagggatt gcacaagaat taggaattgt tgaccttttt 120
 aaagaaaaaa ctcaaggaga tgcagaagac ctttctcatg ccttggcatt tacttcacct 180
 aaaaagattt actctgcaga ctactctgat gcaagcgagc ctgacctcgt agtcttgact 240
 tctggtgctc cacaaaaacc aggtgaaact cgtcttgacc ttgttgaaaa aaatcttcgt 300
 atcactaaag atgttgctac taaaattggt gcttcagggt tcaaaggaat cttccttggt 360
 gctgctaacc cagttgatat cttgacatac gctacttgga aattctcagg tttccctaaa 420
 aaccgcgttg taggttcagg tacttcactt gatactgcac gtttccgtca agcattggca 480
 gaaaaagttg atgttgacgc tcgttcaatc cacgcataca tcatgggtga acacggtgac 540
 tcagaatttg ccgtttggtc acacgctaac gttgctggtg ttaaattgga acaatggttc 600
 caagaaaatg actacottaa cgaagctgaa atcgttgaat tgtttgaatc tgtacgtgat 660
 gctgcttact caatcatcgc taaaaaaggt gcaacattct atgggtgctgc tgtagctctt 720
 gctcgtatta ctaaagcaat tcttgatgat gaacatgcag tacttccagt atcagtatcc 780
 caagatggac aatatggcgt aagcgactgc taccttggtc aaccagctgt agttggtgct 840
 gaaggtggtg ttaacccaat ccacattcca ttgaatgatg ctgaaatgca aaaaatggaa 900
 gcttctggtg ctcaattgaa agcaatcatt gacgaagctt ttgctaaaga agaatttgct 960
 tctgcagtta aaaactaa 978

5 <210> 120
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Lactococcus lactis

10 <400> 120

ES 2 672 883 T3

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

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

Glu Leu Gly Ile Val Asp Leu Phe Lys Glu Lys Thr Gln Gly Asp Ala
 35 40 45

Glu Asp Leu Ser His Ala Leu Ala Phe Thr Ser Pro Lys Lys Ile Tyr
 50 55 60

Ser Ala Asp Tyr Ser Asp Ala Ser Asp Ala Asp Leu Val Val Leu Thr
 65 70 75 80

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

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

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

Thr Tyr Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Val
 130 135 140

Gly Ser Gly Thr Ser Leu Asp Thr Ala Arg Phe Arg Gln Ala Leu Ala
 145 150 155 160

Glu Lys Val Asp Val Asp Ala Arg Ser Ile His Ala Tyr Ile Met Gly
 165 170 175

Glu His Gly Asp Ser Glu Phe Ala Val Trp Ser His Ala Asn Val Ala
 180 185 190

ES 2 672 883 T3

Gly Val Lys Leu Glu Gln Trp Phe Gln Glu Asn Asp Tyr Leu Asn Glu
 195 200 205

Ala Glu Ile Val Glu Leu Phe Glu Ser Val Arg Asp Ala Ala Tyr Ser
 210 215 220

Ile Ile Ala Lys Lys Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Val Ala Val Ala Leu
 225 230 235 240

Ala Arg Ile Thr Lys Ala Ile Leu Asp Asp Glu His Ala Val Leu Pro
 245 250 255

Val Ser Val Phe Gln Asp Gly Gln Tyr Gly Val Ser Asp Cys Tyr Leu
 260 265 270

Gly Gln Pro Ala Val Val Gly Ala Glu Gly Val Val Asn Pro Ile His
 275 280 285

Ile Pro Leu Asn Asp Ala Glu Met Gln Lys Met Glu Ala Ser Gly Ala
 290 295 300

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

Ser Ala Val Lys Asn
 325

- <210> 121
- <211> 1191
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

5

<400> 121
 atgattatatt cgcagccag cgattatcgc gccgcagcgc aacgcattct gccgccgttc 60
 ctgttccact atatggatgg tgggtgcatat tctgaataca cgctgcgccg caacgtggaa 120
 gatttgtcag aagtggcgct gcgccagcgt attctgaaaa acatgtccga cttaaagcctg 180
 gaaacgacgc tgtttaatga gaaattgtcg atgccgggtg cactggctcc ggtgggtttg 240
 tgtggcatgt atgcgcgctc tggcgaagtt caggcagcca aagcggcgga cgcgcatggt 300
 attccgttta ctctctcgac ggtttccggt tgcccgattg aagaagtcgc gccagccatc 360
 aagcgcctaa tgtggttcca gctttatgta ctgcgcgatc ggggctttat gcgtaacgcg 420
 ctggagcgag caaaagcagc gggttgttcg acgctggttt tcaccgtgga tatgccgaca 480
 ccgggcgcac gctaccgtga tgcgcattca ggtatgagcg gcccgaaacgc ggcaatgcgc 540
 cgctacttgc aagcgggtgac acatccgcaa tgggcgtggg atgtgggcct gaacggtcgt 600

10

ES 2 672 883 T3

ccacatgatt taggtaatat ctcagcttat ctcgccaac cgaccggact ggaagattac 660
atcggctggc tggggaataa ctccgatccg tccatctcat ggaagacct tgaatggatc 720
cgcgatttct gggatggccc gatggtgatc aaagggatcc tcgatccgga agatgcgcgc 780
gatgcagtac gttttggtgc tgatggaatt gtggtttcta accacgggtg cgcagctg 840
gacgggtgac tctcttccgc ccgtgcaact cctgctattg cagatgcggt gaaagtgat 900
atagccattc tggcggatag cggaattcgt aacgggcttg atgtcgtgcg tatgattgcg 960
ctcggtgccg acaccgtact gctgggtcgt gctttcttgt atgcgctggc aacagcgggc 1020
caggcgggtg tagctaacct gctaaatctg atcgaaaag agatgaaagt ggcgatgacg 1080
ctgactggcg cgaatcgcg cagcgaatc acgcaagatt cgctggtgca ggggctgggt 1140
aaagattgc ctgcggcact ggctcccatg gcgaaagga atgcggcata g 1191

<210> 122
<211> 396
<212> PRT
<213> Escherichia coli

5

<400> 122
Met Ile Ile Ser Ala Ala Ser Asp Tyr Arg Ala Ala Ala Gln Arg Ile
1 5 10 15
Leu Pro Pro Phe Leu Phe His Tyr Met Asp Gly Gly Ala Tyr Ser Glu
20 25 30
Tyr Thr Leu Arg Arg Asn Val Glu Asp Leu Ser Glu Val Ala Leu Arg
35 40 45
Gln Arg Ile Leu Lys Asn Met Ser Asp Leu Ser Leu Glu Thr Thr Leu
50 55 60
Phe Asn Glu Lys Leu Ser Met Pro Val Ala Leu Ala Pro Val Gly Leu
65 70 75 80
Cys Gly Met Tyr Ala Arg Arg Gly Glu Val Gln Ala Ala Lys Ala Ala
85 90 95
Asp Ala His Gly Ile Pro Phe Thr Leu Ser Thr Val Ser Val Cys Pro
100 105 110
Ile Glu Glu Val Ala Pro Ala Ile Lys Arg Pro Met Trp Phe Gln Leu
115 120 125
Tyr Val Leu Arg Asp Arg Gly Phe Met Arg Asn Ala Leu Glu Arg Ala
130 135 140

10

ES 2 672 883 T3

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

Pro Gly Ala Arg Tyr Arg Asp Ala His Ser Gly Met Ser Gly Pro Asn
165 170 175

Ala Ala Met Arg Arg Tyr Leu Gln Ala Val Thr His Pro Gln Trp Ala
180 185 190

Trp Asp Val Gly Leu Asn Gly Arg Pro His Asp Leu Gly Asn Ile Ser
195 200 205

Ala Tyr Leu Gly Lys Pro Thr Gly Leu Glu Asp Tyr Ile Gly Trp Leu
210 215 220

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

Arg Asp Phe Trp Asp Gly Pro Met Val Ile Lys Gly Ile Leu Asp Pro
245 250 255

Glu Asp Ala Arg Asp Ala Val Arg Phe Gly Ala Asp Gly Ile Val Val
260 265 270

Ser Asn His Gly Gly Arg Gln Leu Asp Gly Val Leu Ser Ser Ala Arg
275 280 285

Ala Leu Pro Ala Ile Ala Asp Ala Val Lys Gly Asp Ile Ala Ile Leu
290 295 300

Ala Asp Ser Gly Ile Arg Asn Gly Leu Asp Val Val Arg Met Ile Ala
305 310 315 320

Leu Gly Ala Asp Thr Val Leu Leu Gly Arg Ala Phe Leu Tyr Ala Leu
325 330 335

Ala Thr Ala Gly Gln Ala Gly Val Ala Asn Leu Leu Asn Leu Ile Glu
340 345 350

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

Glu Ile Thr Gln Asp Ser Leu Val Gln Gly Leu Gly Lys Glu Leu Pro
370 375 380

Ala Ala Leu Ala Pro Met Ala Lys Gly Asn Ala Ala
385 390 395

<210> 123
<211> 939
5 <212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 123

ES 2 672 883 T3

atgaaagtcg cagtcctcgg cgctgctggc ggtattggcc aggcgcttgc actactgtta 60
 aaaacccaac tgccttcagg ttcagaactc tctctgtatg atatcgctcc agtgactccc 120
 ggtgtggctg tcgatctgag ccatatccct actgctgtga aaatcaaagg tttttctggt 180
 gaagatgcga ctccggcgct ggaaggcgca gatgctgttc ttatctctgc aggcgtagcg 240
 cgtaaaccgg gtatggatcg ttccgacctg tttaacgtta acgccggcat cgtgaaaaac 300
 ctggtacagc aagttgcgaa aacctgcccg aaagcgtgca ttggtattat cactaaccgg 360
 gttaacacca cagttgcaat tgctgctgaa gtgctgaaaa aagccgggtg ttatgacaaa 420
 aacaaactgt tcggcggttac cacgctggat atcattogtt ccaacacctt tgttgcggaa 480
 ctgaaaggca aacagccagg cgaagttgaa gtgccgggta ttggcgggtca ctctggtggt 540
 accattctgc cgctgctgtc acaggttcct ggcgttagtt ttaccgagca ggaagtggct 600
 gatctgacca aacgcatcca gaacgcgggt accgaagtgg ttgaagcgaa ggccggtggc 660
 gggctctgca ccctgtctat gggccaggca gctgcacggt ttggtctgtc tctggttcgt 720
 gcactgcagg gcgaacaagg cgttgtcgaa tgtgcctacg ttgaaggcga cggtcagtac 780
 gcccgtttct tctctcaacc gctgctgctg ggtaaaaacg gcgtggaaga gcgtaaatct 840
 atcggtagcc tgagcgcatt tgaacagaac gcgctggaag gtatgctgga tacgctgaag 900
 aaagatcgc ccctgggcga agagttcgtt aataagtaa 939

<210> 124
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 124
 Met Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ala Gly Gly Ile Gly Gln Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Leu Lys Thr Gln Leu Pro Ser Gly Ser Glu Leu Ser Leu
 20 25 30
 Tyr Asp Ile Ala Pro Val Thr Pro Gly Val Ala Val Asp Leu Ser His
 35 40 45
 Ile Pro Thr Ala Val Lys Ile Lys Gly Phe Ser Gly Glu Asp Ala Thr
 50 55 60

10

ES 2 672 883 T3

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

Arg Lys Pro Gly Met Asp Arg Ser Asp Leu Phe Asn Val Asn Ala Gly
85 90 95

Ile Val Lys Asn Leu Val Gln Gln Val Ala Lys Thr Cys Pro Lys Ala
100 105 110

Cys Ile Gly Ile Ile Thr Asn Pro Val Asn Thr Thr Val Ala Ile Ala
115 120 125

Ala Glu Val Leu Lys Lys Ala Gly Val Tyr Asp Lys Asn Lys Leu Phe
130 135 140

Gly Val Thr Thr Leu Asp Ile Ile Arg Ser Asn Thr Phe Val Ala Glu
145 150 155 160

Leu Lys Gly Lys Gln Pro Gly Glu Val Glu Val Pro Val Ile Gly Gly
165 170 175

His Ser Gly Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Pro Gly Val
180 185 190

Ser Phe Thr Glu Gln Glu Val Ala Asp Leu Thr Lys Arg Ile Gln Asn
195 200 205

Ala Gly Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Gly Gly Ser Ala Thr
210 215 220

Leu Ser Met Gly Gln Ala Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ser Leu Val Arg
225 230 235 240

Ala Leu Gln Gly Glu Gln Gly Val Val Glu Cys Ala Tyr Val Glu Gly
245 250 255

Asp Gly Gln Tyr Ala Arg Phe Phe Ser Gln Pro Leu Leu Leu Gly Lys
260 265 270

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

Gln Asn Ala Leu Glu Gly Met Leu Asp Thr Leu Lys Lys Asp Ile Ala
290 295 300

Leu Gly Glu Glu Phe Val Asn Lys
305 310

<210> 125

<211> 939

5 <212> ADN

<213> Bacillus subtilis

<400> 125

ES 2 672 883 T3

atgggaaata ctcgtaaaaa agtttctggt atcggagcag gttttaccgg agctacaact 60
gcatttttaa tcgctcaaaa agagctggca gacgttggtc ttggtgacat tccgcaattg 120
gagaaccoga caaagggaaa agcgcttgat atgcttgaag caagcccgg tcaaggcttt 180
gacgcaaaaa ttacgggaac atccaattac gaggatacag ccggctctga cattgttgtc 240
attacagccg gtatcgcaag aaaacctggt atgagcagag atgatctggt ctctacaaac 300
gaaaagatta tgagaagcgt tacgcaggaa atcgtgaaat attctctga ctctattatt 360
gtggtgctga caaatcctgt tgatgcaatg acatacggg tgtacaaaga atcaggcttc 420
cctaaagagc gtgtaatcgg ccagtcaggt gtgcttgata cggcaagatt cagaacattt 480
gtggcagagg aattaaacct gtcagtgaaa gatgtgactg gtttcgtact cggcggacac 540
ggtgacgata tggttccgct tgtgcttat tcttatgctg gcggtatccc gcttgaaact 600
cttattccga aagaacggat tgacgcaatt gtggagcgca ctagaaaagg cggaggcgaa 660
atcgtgaatc ttcttgaaa cgggaagcgc tattatgccc ctgccccttc tctgacagaa 720
atggtcgaag cgatcttgaa agatcagcgc cgcgtccttc ctacaattgc ttatcttgaa 780
ggggaatacg gctatgaagg catctacctt ggtgttcta caattgtagg cggcaacggg 840
cttgagcaaa tcattgaact tgaactgaca gactatgaaa gagcgcagct gaataaatca 900
gttgaatctg tcaaaaatgt catgaaagta ttatcctaa 939

<210> 126
<211> 312
5 <212> PRT
<213> Bacillus subtilis

<400> 126
Met Gly Asn Thr Arg Lys Lys Val Ser Val Ile Gly Ala Gly Phe Thr
1 5 10 15
Gly Ala Thr Thr Ala Phe Leu Ile Ala Gln Lys Glu Leu Ala Asp Val
20 25 30
Val Leu Val Asp Ile Pro Gln Leu Glu Asn Pro Thr Lys Gly Lys Ala
35 40 45
Leu Asp Met Leu Glu Ala Ser Pro Val Gln Gly Phe Asp Ala Lys Ile
50 55 60

10

ES 2 672 883 T3

Thr Gly Thr Ser Asn Tyr Glu Asp Thr Ala Gly Ser Asp Ile Val Val
65 70 75 80

Ile Thr Ala Gly Ile Ala Arg Lys Pro Gly Met Ser Arg Asp Asp Leu
85 90 95

Val Ser Thr Asn Glu Lys Ile Met Arg Ser Val Thr Gln Glu Ile Val
100 105 110

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

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

Val Ile Gly Gln Ser Gly Val Leu Asp Thr Ala Arg Phe Arg Thr Phe
145 150 155 160

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

Leu Gly Gly His Gly Asp Asp Met Val Pro Leu Val Arg Tyr Ser Tyr
180 185 190

Ala Gly Gly Ile Pro Leu Glu Thr Leu Ile Pro Lys Glu Arg Ile Asp
195 200 205

Ala Ile Val Glu Arg Thr Arg Lys Gly Gly Gly Glu Ile Val Asn Leu
210 215 220

Leu Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Pro Ala Ala Ser Leu Thr Glu
225 230 235 240

Met Val Glu Ala Ile Leu Lys Asp Gln Arg Arg Val Leu Pro Thr Ile
245 250 255

Ala Tyr Leu Glu Gly Glu Tyr Gly Tyr Glu Gly Ile Tyr Leu Gly Val
260 265 270

Pro Thr Ile Val Gly Gly Asn Gly Leu Glu Gln Ile Ile Glu Leu Glu
275 280 285

Leu Thr Asp Tyr Glu Arg Ala Gln Leu Asn Lys Ser Val Glu Ser Val
290 295 300

Lys Asn Val Met Lys Val Leu Ser
305 310

<210> 127

<211> 1707

5 <212> ADN

<213> Zymomonas mobilis

<400> 127

ES 2 672 883 T3

atgagttata ctgtcggtag ctatthagcg gagcggcttg tccagattgg totcaagcat 60
cacttcgcag tcgcgggoga ctacaacctc gtccttcttg acaacctgct tttgaacaaa 120
aacatggagc aggtttattg ctgtaacgaa ctgaaactgc gtttcagtgc agaaggttat 180
gctcgtgcca aaggcgcagc agcagccgtc gttacctaca gcgtcgggtgc gctttccgca 240
tttgatgcta tcggtggcgc ctatgcagaa aaccttcggg ttatcctgat ctccggtgct 300
ccgaacaaca atgatcacgc tgctgggtcac gtgttgcatc acgctcttgg caaaaccgac 360
tatcactatc agttggaaat ggccaagaac atcacggccg ccgctgaagc gatttacacc 420
ccggaagaag ctccggctaa aatcgatcac gtgattaaaa ctgctcttcg tgagaagaag 480
ccggtttatc tcgaaatcgc ttgcaacatt gcttccatgc cctgcgccgc tcctggaccg 540
gcaagcgcac tgttcaatga cgaagccagc gacgaagctt ctttgaatgc agcggttgaa 600
gaaacctga aattcatcgc caaccgcgac aaagttgccg tcctcgtcgg cagcaagctg 660
cgcgcagctg gtgctgaaga agctgctgtc aaatttgctg atgctctcgg tggcgcagtt 720
gctaccatgg ctgctgcaaa aagcttcttt ccagaagaaa acccgatta catcggcacc 780
tcatggggtg aagtcagcta tccgggcggt gaaaagacga tgaagaagc cgatgcggtt 840
atcgtctcgg ctctgtctt caacgactac tccaccactg gttggacgga tattcctgat 900
cctaagaac tggttctcgc tgaaccgctg tctgtcgtcg ttaacggcat tcgcttcccc 960
agcgtccatc tgaagacta tctgaccgct ttggctcaga aagtttcaa gaaaaccggt 1020
gcattggact tcttcaaate cctcaatgca ggtgaactga agaaagccgc tccggtgat 1080
ccgagtgctc cgttgggtcaa cgcagaaatc gcccgccaag tcgaagctct tctgaccccg 1140
aacacgacgg ttattgctga aaccgggtgac tcttggttca atgctcagcg catgaagctc 1200
ccgaaccggtg ctccggttga atatgaaatg cagtggggtc acattgggtg gtccgttctc 1260
gccgccttcg gttatgccgt cgggtgctccg gaacgtcgca acatcctcat ggttgggtgat 1320
ggttccttcc agctgacggc tcaggaagtc gctcagatgg ttcgcctgaa actgccggtt 1380
atcatcttct tgatcaataa ctatgggttac accatcgaag ttatgatcca tgatggtccg 1440
tacaacaaca tcaagaactg ggattatgcc ggtctgatgg aagtgttcaa cggtaacggt 1500
ggttatgaca gcggtgctgg taaaggcctg aaggctaaaa ccggtggcga actggcagaa 1560
gctatcaagg ttgctctggc aaacaccgac ggccaaccc tgatcgaatg cttcatcgggt 1620
cgtgaagact gcactgaaga attgggtcaa tgggtaagc gcgttgctgc cgccaacagc 1680
cgtaagcctg ttaacaagct cctctag 1707

5 <210> 128
<211> 568
<212> PRT
<213> *Zymomonas mobilis*

10 <400> 128

ES 2 672 883 T3

Met Ser Tyr Thr Val Gly Thr Tyr Leu Ala Glu Arg Leu Val Gln Ile
 1 5 10 15

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

Leu Asp Asn Leu Leu Leu Asn Lys Asn Met Glu Gln Val Tyr Cys Cys
 35 40 45

Asn Glu Leu Asn Cys Gly Phe Ser Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Lys
 50 55 60

Gly Ala Ala Ala Ala Val Val Thr Tyr Ser Val Gly Ala Leu Ser Ala
 65 70 75 80

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

Ile Ser Gly Ala Pro Asn Asn Asn Asp His Ala Ala Gly His Val Leu
 100 105 110

His His Ala Leu Gly Lys Thr Asp Tyr His Tyr Gln Leu Glu Met Ala
 115 120 125

Lys Asn Ile Thr Ala Ala Ala Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu Glu Ala
 130 135 140

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

Pro Val Tyr Leu Glu Ile Ala Cys Asn Ile Ala Ser Met Pro Cys Ala
 165 170 175

Ala Pro Gly Pro Ala Ser Ala Leu Phe Asn Asp Glu Ala Ser Asp Glu
 180 185 190

Ala Ser Leu Asn Ala Ala Val Glu Glu Thr Leu Lys Phe Ile Ala Asn
 195 200 205

ES 2 672 883 T3

Arg Asp Lys Val Ala Val Leu Val Gly Ser Lys Leu Arg Ala Ala Gly
 210 215 220

Ala Glu Glu Ala Ala Val Lys Phe Ala Asp Ala Leu Gly Gly Ala Val
 225 230 235 240

Ala Thr Met Ala Ala Ala Lys Ser Phe Phe Pro Glu Glu Asn Pro His
 245 250 255

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

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

Asp Tyr Ser Thr Thr Gly Trp Thr Asp Ile Pro Asp Pro Lys Lys Leu
 290 295 300

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

Ser Val His Leu Lys Asp Tyr Leu Thr Arg Leu Ala Gln Lys Val Ser
 325 330 335

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

Leu Lys Lys Ala Ala Pro Ala Asp Pro Ser Ala Pro Leu Val Asn Ala
 355 360 365

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

Ile Ala Glu Thr Gly Asp Ser Trp Phe Asn Ala Gln Arg Met Lys Leu
 385 390 395 400

Pro Asn Gly Ala Arg Val Glu Tyr Glu Met Gln Trp Gly His Ile Gly
 405 410 415

Trp Ser Val Pro Ala Ala Phe Gly Tyr Ala Val Gly Ala Pro Glu Arg
 420 425 430

Arg Asn Ile Leu Met Val Gly Asp Gly Ser Phe Gln Leu Thr Ala Gln
 435 440 445

Glu Val Ala Gln Met Val Arg Leu Lys Leu Pro Val Ile Ile Phe Leu
 450 455 460

ES 2 672 883 T3

Ile Asn Asn Tyr Gly Tyr Thr Ile Glu Val Met Ile His Asp Gly Pro
465 470 475 480

Tyr Asn Asn Ile Lys Asn Trp Asp Tyr Ala Gly Leu Met Glu Val Phe
485 490 495

Asn Gly Asn Gly Gly Tyr Asp Ser Gly Ala Gly Lys Gly Leu Lys Ala
500 505 510

Lys Thr Gly Gly Glu Leu Ala Glu Ala Ile Lys Val Ala Leu Ala Asn
515 520 525

Thr Asp Gly Pro Thr Leu Ile Glu Cys Phe Ile Gly Arg Glu Asp Cys
530 535 540

Thr Glu Glu Leu Val Lys Trp Gly Lys Arg Val Ala Ala Ala Asn Ser
545 550 555 560

Arg Lys Pro Val Asn Lys Leu Leu
565

- <210> 129
- <211> 1644
- <212> ADN
- <213> Lactococcus lactis

5

<400> 129
atgtataccg ttggggatta tctgctggat cgcttgcatt agttaggcat tgaagaaatt 60
ttcgcgctac ctgggtgacta taatctccag tttcttgatc agatcatctc acgcgaagat 120
atgaaatgga ttggtaatgc caatgaactg aatgccagct atatggctga cggttatgcg 180
cgtactaaga aagcggcagc ctttctgacg acctttggcg taggcgagtt aagcgcatt 240
aacggactcg ctggctccta tgetgagaac ttgccggtag tcgaaatcgt gggctctcca 300
acgtccaaag tacaaaatga cggaaaatc gtgcatcata ccctcgcgga tgggtgacttt 360
aaacacttta tgaaaatgca tgaaccggtg acagccgctg gtaccctgct gactgcgag 420
aatgcgacct acgaaattga tcgcgtttta agccagctgt taaaagaacg caaacccgctc 480
tacatcaatc tgcctggtga tgtagcagcc gctaaagctg agaaaccggc gcttagtctg 540
gaaaaggagt cgagcaccac caatacgacc gaacaagtga ttctgtccaa aattgaagaa 600
tcccttaaaa acgcacagaa accggtggtt attgccgggc atgaagtgat tagctttggg 660
ttggagaaaa ccgtcactca gttcgtcagt gaaaccaaat tgccgattac cacgctgaac 720
tttgtaaga gcgcggttga cgagagcttg ccatcgttcc tggggatcta caacgtaag 780
ctgtctgaaa tttcgctgaa gaactttgtg gaatcagcgg atttcatttt gatgctgggt 840

10

ES 2 672 883 T3

gtgaaactca cggattcttc gactggggca tttaccacc atctggacga aaacaaaatg 900
 atcagcttga acatcgacga gggcattatc ttcaacaagg tggtcgaaga tttcgatfff 960
 cgtgcagtgg tgtccagtct ctcggaactg aagggtattg aatatgaggg tcagtacatc 1020
 gataaacagt atgaagagtt catcccgtca tctgcccctc tgagccaaga ccgcctttgg 1080
 caggcagtgg aaagcctcac acagtccaat gaaacgatcg ttgcagaaca aggtactagt 1140
 ttctttggcg caagcacgat cttcctgaaa tcgaaactcac ggttcatcgg acaaccgctg 1200
 tggggcagta ttggctatac gtttccagcg gcgttaggat cacagattgc ggataaggaa 1260
 agtcgtcacc tgttattcat tggcgtgggt tctcttcaac ttacgggtcca ggaactgggc 1320
 ctgtccattc gcgagaaact gaaccgatt tgctttatca tcaacaatga cggctacaca 1380
 gtggagcgcg aaattcacgg cccgaccag agttacaatg acattcccat gtggaactac 1440
 agcaaattac cagaaacctt tgggtgccaca gaagatcgtg ttgtctctaa aatcgtgcgc 1500
 actgagaacg aatttgtttc ggttatgaaa gaagcgcgaag cggatgtgaa tcggatgtat 1560
 tggattgaac tggtcctgga gaaagaagat gcccccgaac tgctgaagaa aatgggcaaa 1620
 ctgtttgctg aacagaacaa ataa 1644

<210> 130
 <211> 547
 <212> PRT
 <213> Lactococcus lactis

5

<400> 130
 Met Tyr Thr Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Arg Leu His Glu Leu Gly
 1 5 10 15

 Ile Glu Glu Ile Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu Gln Phe Leu
 20 25 30

 Asp Gln Ile Ile Ser Arg Glu Asp Met Lys Trp Ile Gly Asn Ala Asn
 35 40 45

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

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

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

 Val Gly Ser Pro Thr Ser Lys Val Gln Asn Asp Gly Lys Phe Val His
 100 105 110

10

ES 2 672 883 T3

His Thr Leu Ala Asp Gly Asp Phe Lys His Phe Met Lys Met His Glu
 115 120 125

Pro Val Thr Ala Ala Arg Thr Leu Leu Thr Ala Glu Asn Ala Thr Tyr
 130 135 140

Glu Ile Asp Arg Val Leu Ser Gln Leu Leu Lys Glu Arg Lys Pro Val
 145 150 155 160

Tyr Ile Asn Leu Pro Val Asp Val Ala Ala Ala Lys Ala Glu Lys Pro
 165 170 175

Ala Leu Ser Leu Glu Lys Glu Ser Ser Thr Thr Asn Thr Thr Glu Gln
 180 185 190

Val Ile Leu Ser Lys Ile Glu Glu Ser Leu Lys Asn Ala Gln Lys Pro
 195 200 205

Val Val Ile Ala Gly His Glu Val Ile Ser Phe Gly Leu Glu Lys Thr
 210 215 220

Val Thr Gln Phe Val Ser Glu Thr Lys Leu Pro Ile Thr Thr Leu Asn
 225 230 235 240

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

Tyr Asn Gly Lys Leu Ser Glu Ile Ser Leu Lys Asn Phe Val Glu Ser
 260 265 270

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

Gly Ala Phe Thr His His Leu Asp Glu Asn Lys Met Ile Ser Leu Asn
 290 295 300

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

Arg Ala Val Val Ser Ser Leu Ser Glu Leu Lys Gly Ile Glu Tyr Glu
 325 330 335

Gly Gln Tyr Ile Asp Lys Gln Tyr Glu Glu Phe Ile Pro Ser Ser Ala
 340 345 350

Pro Leu Ser Gln Asp Arg Leu Trp Gln Ala Val Glu Ser Leu Thr Gln
 355 360 365

ES 2 672 883 T3

Ser Asn Glu Thr Ile Val Ala Glu Gln Gly Thr Ser Phe Phe Gly Ala
 370 375 380

Ser Thr Ile Phe Leu Lys Ser Asn Ser Arg Phe Ile Gly Gln Pro Leu
 385 390 395 400

Trp Gly Ser Ile Gly Tyr Thr Phe Pro Ala Ala Leu Gly Ser Gln Ile
 405 410 415

Ala Asp Lys Glu Ser Arg His Leu Leu Phe Ile Gly Asp Gly Ser Leu
 420 425 430

Gln Leu Thr Val Gln Glu Leu Gly Leu Ser Ile Arg Glu Lys Leu Asn
 435 440 445

Pro Ile Cys Phe Ile Ile Asn Asn Asp Gly Tyr Thr Val Glu Arg Glu
 450 455 460

Ile His Gly Pro Thr Gln Ser Tyr Asn Asp Ile Pro Met Trp Asn Tyr
 465 470 475 480

Ser Lys Leu Pro Glu Thr Phe Gly Ala Thr Glu Asp Arg Val Val Ser
 485 490 495

Lys Ile Val Arg Thr Glu Asn Glu Phe Val Ser Val Met Lys Glu Ala
 500 505 510

Gln Ala Asp Val Asn Arg Met Tyr Trp Ile Glu Leu Val Leu Glu Lys
 515 520 525

Glu Asp Ala Pro Lys Leu Leu Lys Lys Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu
 530 535 540

Gln Asn Lys
 545

- <210> 131
- <211> 27
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Cebador de amplificación
- 10
- <400> 131
- tataatcata tgaaagtcgc agtcctc 27

- <210> 132
- <211> 30
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 20 <223> Cebador de amplificación

- <400> 132
- tataatggat ccttactat taacgaactc 30

- 25 <210> 133

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 133
 tataatcata tggctgataa acaacgtaaa aaa 33

10 <210> 134
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 134
 20 tataatggat ccttagtttt taactgcaga agcaaa 36

<210> 135
 <211> 27
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 135
 30 catatgggaa atactcgtaa aaaagtt 27

<210> 136
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 136
 40 ggatccttag gataatactt tcatgac 27

<210> 137
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Cebador de amplificación

<400> 137
 catatgatta ttccgcagc cagc 24

<210> 138
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 60 <223> Cebador de amplificación

<400> 138
 65 agatctctat gccgcattcc cttc 25

<210> 139

<211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 139
 ttacagccgg tatcgagca aaaccggga tgagcagaga t 41

10 <210> 140
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 140
 20 atctctgctc atcccggtt ttgctcgat accgctgta a 41

<210> 141
 <211> 43
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n is a, c, g, or t

35 <400> 141
 ttatctctgc aggcgtagcg nnkaaaccg ggatggatcg ttc 43

<210> 142
 <211> 43
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n is a, c, g, or t

50 <400> 142
 gaacgatcca tcccggtt mnncgctacg cctgcagaga taa 43

<210> 143
 55 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 60 <223> Cebador de amplificación

<400> 143
 ttatctctgc aggcgtagcg gctaaaccg gtgaggatcg ttccgacctg 50

65 <210> 144
 <211> 50

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador de amplificación

 <400> 144
 caggtcggaa cgatcctcac ccggttagc cgctacgcct gcagagataa 50

 10 <210> 145
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador de amplificación

 <400> 145
 20 ttatctctgc aggcgtagcg gctaaaccgg gtcaggatcg ttccgacctg 50

 <210> 146
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador de amplificación

 <400> 146
 30 caggtcggaa cgatcctgac ccggttagc cgctacgcct gcagagataa 50

 <210> 147
 <211> 46
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de amplificación

 <400> 147
 40 gtcgcagtcc tcggcggcgc tggcgggtgc ggccaggcgc ttgcac 46

 <210> 148
 <211> 46
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 50
 <400> 148
 gtgcaagcgc ctggccgaca ccgccagcgg cgccgaggac tgcgac 46

 <210> 149
 55 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Cebador de amplificación

 <400> 149
 ccggttattg gcggccactc tgatgttacc attctgccgc tgctg 45

 65 <210> 150
 <211> 45

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Cebador de amplificación

<400> 150
 cagcagcggc agaatggtaa catcagagtg gccgccaata accgg 45

10 <210> 151
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 151
 20 ggcgtagcgg ctaaaccggg tatgtctcgt tccgacctg 39

<210> 152
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 152
 30 caggtcggaa cgagacatac ccggttagc cgctacgcc 39

<210> 153
 <211> 939
 <212> ADN
 35 <213> Bacillus subtilis

<400> 153
 atgggaaata ctcgtaaaaa agtttctggt atcggagcag gttttaccgg agctacaact 60
 gcatttttaa tcgctcaaaa agagctggca gacgttggtc ttggtgacat tccgcaattg 120
 gagaaccoga caaagggaaa agcgcttgat atgcttgaag caagcccggt tcaaggcttt 180
 gacgcaaaaa ttacgggaac atccaattac gaggatacag ccggctctga cattgttgtc 240
 attacagccg gtatgcgatg caaaccggc atgagcagag atgatctggt ctctacaaac 300
 gaaaagatta tgagaagcgt tacgcaggaa atcgtgaaat attctcctga ctctattatt 360
 gtggtgctga caaatcctgt tgatgcaatg acatacggg tgtacaaaga atcaggcttc 420
 octaaagagc gtgtaatcgg ccagtcaggt gtgcttgata cggcaagatt cagaacattt 480
 gtggcagagg aattaaacct gtcagtgaaa gatgtgactg gtttcgtact cggcggacac 540
 ggtgacgata tggttccgct tgtgcgttat tcttatgctg gcggtatccc gcttgaaact 600
 cttattccga aagaacggat tgacgcaatt gtggagcgca ctagaaaagg cggagcgcaa 660
 atcgtgaatc ttcttgaaa cggagcgcg tattatgctc ctgccccttc tctgacagaa 720
 atggtcgaag cgatcttgaa agatcagcgc cgcgtccttc ctacaattgc ttatcttgaa 780
 ggggaatacg gctatgaagg catctacctt ggtgttccca caattgtagg cggcaacggg 840
 cttgagcaaa tcattgaact tgaactgaca gactatgaaa gagcgcagct gaataaatca 900
 gttgaatctg tcaaaaatgt catgaaagta ttatcctaa 939

ES 2 672 883 T3

<210> 154

<211> 312

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 154

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

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

ES 2 672 883 T3

Val Leu Val Asp Ile Pro Gln Leu Glu Asn Pro Thr Lys Gly Lys Ala
 35 40 45

Leu Asp Met Leu Glu Ala Ser Pro Val Gln Gly Phe Asp Ala Lys Ile
 50 55 60

Thr Gly Thr Ser Asn Tyr Glu Asp Thr Ala Gly Ser Asp Ile Val Val
 65 70 75 80

Ile Thr Ala Gly Ile Ala Cys Lys Pro Gly Met Ser Arg Asp Asp Leu
 85 90 95

Val Ser Thr Asn Glu Lys Ile Met Arg Ser Val Thr Gln Glu Ile Val
 100 105 110

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

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

Val Ile Gly Gln Ser Gly Val Leu Asp Thr Ala Arg Phe Arg Thr Phe
 145 150 155 160

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

Leu Gly Gly His Gly Asp Asp Met Val Pro Leu Val Arg Tyr Ser Tyr
 180 185 190

Ala Gly Gly Ile Pro Leu Glu Thr Leu Ile Pro Lys Glu Arg Ile Asp
 195 200 205

Ala Ile Val Glu Arg Thr Arg Lys Gly Gly Gly Glu Ile Val Asn Leu
 210 215 220

Leu Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Pro Ala Ala Ser Leu Thr Glu
 225 230 235 240

Met Val Glu Ala Ile Leu Lys Asp Gln Arg Arg Val Leu Pro Thr Ile
 245 250 255

Ala Tyr Leu Glu Gly Glu Tyr Gly Tyr Glu Gly Ile Tyr Leu Gly Val
 260 265 270

Pro Thr Ile Val Gly Gly Asn Gly Leu Glu Gln Ile Ile Glu Leu Glu
 275 280 285

Leu Thr Asp Tyr Glu Arg Ala Gln Leu Asn Lys Ser Val Glu Ser Val
 290 295 300

Lys Asn Val Met Lys Val Leu Ser
 305 310

ES 2 672 883 T3

<211> 939
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 155
 atgaaagtcg cagtcctcgg cgctgctggc ggtattggcc aggcgcttgc actactgtta 60
 aaaacccaac tgccttcagg ttcagaactc tctctgtatg atatcgctcc agtgactccc 120
 ggtgtggctg tcgatctgag ccatatccct actgctgtga aatcaaag ttttctggt 180
 gaagatgcga ctccggcgct ggaaggcgca gatgctgttc ttatctctgc aggcgtagcg 240
 gctaaacccg gtagggatcg ttccgacctg tttaacgtta acgcccgcac cgtgaaaaac 300
 ctggtacagc aagttgcgaa aacctgcccg aaagcgtgca ttggtattat cactaacccg 360
 gttaacacca cagttgcaat tgctgctgaa gtgctgaaaa aagccggtgt ttatgacaaa 420
 aacaaactgt tcggcgttac cacgctggat atcattcggt ccaacacctt tgttgcgga 480
 ctgaaaggca aacagccagg cgaagttgaa gtgccgggta ttggcgggtca ctctggtgtt 540
 accattctgc cgctgctgtc acaggttctt ggcgtaggt ttaccgagca ggaagtggct 600
 gatctgacca aacgcatcca gaacgcgggt actgaagtgg ttgaagcgaa ggcggtggc 660
 gggctctgcaa cctctctat gggccaggca gctgcacggt ttggtctgtc tctggtctgt 720
 gcactgcagg gcgaacaagg cgttgctgaa tgtgcctacg ttgaaggcga cggtcagtac 780
 gccggtttct tctctcaacc gctgctgctg ggtaaaaacg gcgtggaaga gcgtaaatct 840
 atcggtagcc tgagcgcatt tgaacagaac gcgctggaag gtatgctgga tacgctgaag 900
 aaagatatcg ccctgggcga agagttcggt aataagtaa 939

<210> 156
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 156
 Met Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ala Gly Gly Ile Gly Gln Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Leu Lys Thr Gln Leu Pro Ser Gly Ser Glu Leu Ser Leu
 20 25 30

15

ES 2 672 883 T3

Tyr Asp Ile Ala Pro Val Thr Pro Gly Val Ala Val Asp Leu Ser His
 35 40 45
 Ile Pro Thr Ala Val Lys Ile Lys Gly Phe Ser Gly Glu Asp Ala Thr
 50 55 60
 Pro Ala Leu Glu Gly Ala Asp Val Val Leu Ile Ser Ala Gly Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Lys Pro Gly Met Asp Arg Ser Asp Leu Phe Asn Val Asn Ala Gly
 85 90 95
 Ile Val Lys Asn Leu Val Gln Gln Val Ala Lys Thr Cys Pro Lys Ala
 100 105 110
 Cys Ile Gly Ile Ile Thr Asn Pro Val Asn Thr Thr Val Ala Ile Ala
 115 120 125
 Ala Glu Val Leu Lys Lys Ala Gly Val Tyr Asp Lys Asn Lys Leu Phe
 130 135 140
 Gly Val Thr Thr Leu Asp Ile Ile Arg Ser Asn Thr Phe Val Ala Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Gly Lys Gln Pro Gly Glu Val Glu Val Pro Val Ile Gly Gly
 165 170 175
 His Ser Gly Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Pro Gly Val
 180 185 190
 Ser Phe Thr Glu Gln Glu Val Ala Asp Leu Thr Lys Arg Ile Gln Asn
 195 200 205
 Ala Gly Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Gly Gly Ser Ala Thr
 210 215 220
 Leu Ser Met Gly Gln Ala Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ser Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Gln Gly Glu Gln Gly Val Val Glu Cys Ala Tyr Val Glu Gly
 245 250 255
 Asp Gly Gln Tyr Ala Arg Phe Phe Ser Gln Pro Leu Leu Leu Gly Lys
 260 265 270
 Asn Gly Val Glu Glu Arg Lys Ser Ile Gly Thr Leu Ser Ala Phe Glu
 275 280 285
 Gln Asn Ala Leu Glu Gly Met Leu Asp Thr Leu Lys Lys Asp Ile Ala
 290 295 300
 Leu Gly Glu Glu Phe Val Asn Lys
 305 310

ES 2 672 883 T3

<211> 939
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 157
 atgaaagtcg cagtcctcgg cgctgctggc ggtattggcc aggcgcttgc actactgtta 60
 aaaacccaac tgccttcagg ttcagaactc tctctgtatg atatcgctcc agtgactccc 120
 ggtgtggctg tcgatctgag ccatatccct actgctgtga aaatcaaag ttttctggt 180
 gaagatgcga ctccggcgct ggaaggcgca gatgctgttc ttatctctgc aggcgtagcg 240
 gctaaaccgg gtcaggatcg ttccgacctg tttaacgtta acgccggcat cgtgaaaaac 300
 ctggtacagc aagttgcgaa aacctgcccg aaagcgtgca ttggtattat cactaacccg 360
 gttaaacacca cagttgcaat tgctgctgaa gtgctgaaaa aagccggtgt ttatgacaaa 420
 aacaaactgt tcggcgttac cacgctggat atcattcggt ccaacacctt tgttgcgga 480
 ctgaaaggca aacagccagg cgaagttgaa gtgccgggta ttggcgggtca ctctggtgtt 540
 accattctgc cgctgctgtc acaggttcct ggcgtaggt ttaccgagca ggaagtggct 600
 gatctgacca aacgcatcca gaacgcgggt actgaagtgg ttgaagcgaa ggcggtggc 660
 gggctctgcaa ccctgtctat gggccaggca gctgcacggt ttggtctgtc tctggtctgt 720
 gcactgcagg gcgaacaagg cgttgtcgaa tgtgcctacg ttgaaggcga cggtcagtac 780
 gccggtttct tctctcaacc gctgctgctg ggtaaaaacg gcgtggaaga gcgtaaatct 840
 atcggtagcc tgagcgcatt tgaacagaac gcgctggaag gtatgctgga tacgctgaag 900
 aaagatatcg ccctgggcga agagttcgtt aataagtaa 939

<210> 158
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 158
 Met Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ala Gly Gly Ile Gly Gln Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Leu Lys Thr Gln Leu Pro Ser Gly Ser Glu Leu Ser Leu
 20 25 30

15

ES 2 672 883 T3

Tyr Asp Ile Ala Pro Val Thr Pro Gly Val Ala Val Asp Leu Ser His
 35 40 45
 Ile Pro Thr Ala Val Lys Ile Lys Gly Phe Ser Gly Glu Asp Ala Thr
 50 55 60
 Pro Ala Leu Glu Gly Ala Asp Val Val Leu Ile Ser Ala Gly Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Lys Pro Gly Gln Asp Arg Ser Asp Leu Phe Asn Val Asn Ala Gly
 85 90 95
 Ile Val Lys Asn Leu Val Gln Gln Val Ala Lys Thr Cys Pro Lys Ala
 100 105 110
 Cys Ile Gly Ile Ile Thr Asn Pro Val Asn Thr Thr Val Ala Ile Ala
 115 120 125
 Ala Glu Val Leu Lys Lys Ala Gly Val Tyr Asp Lys Asn Lys Leu Phe
 130 135 140
 Gly Val Thr Thr Leu Asp Ile Ile Arg Ser Asn Thr Phe Val Ala Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Gly Lys Gln Pro Gly Glu Val Glu Val Pro Val Ile Gly Gly
 165 170 175
 His Ser Gly Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Pro Gly Val
 180 185 190
 Ser Phe Thr Glu Gln Glu Val Ala Asp Leu Thr Lys Arg Ile Gln Asn
 195 200 205
 Ala Gly Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Gly Gly Ser Ala Thr
 210 215 220
 Leu Ser Met Gly Gln Ala Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ser Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Gln Gly Glu Gln Gly Val Val Glu Cys Ala Tyr Val Glu Gly
 245 250 255
 Asp Gly Gln Tyr Ala Arg Phe Phe Ser Gln Pro Leu Leu Leu Gly Lys
 260 265 270
 Asn Gly Val Glu Glu Arg Lys Ser Ile Gly Thr Leu Ser Ala Phe Glu
 275 280 285
 Gln Asn Ala Leu Glu Gly Met Leu Asp Thr Leu Lys Lys Asp Ile Ala
 290 295 300
 Leu Gly Glu Glu Phe Val Asn Lys
 305 310

ES 2 672 883 T3

<211> 939
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 159
 atgaaagtcg cagtcctcgg cgctgctggc ggtattggcc aggcgcttgc actactgtta 60
 aaaacccaac tgccttcagg ttcagaactc tctctgtatg atatcgctcc agtgactccc 120
 ggtgtggctg tcgatctgag ccatatccct actgctgtga aatcaaag ttttctggt 180
 gaagatgcga ctccggcgct ggaaggcgca gatgctgttc ttatctctgc aggcgtagcg 240
 gctaaaccgg gtgaggatcg ttccgacctg tttaacgtta acgccggcat cgtgaaaaac 300
 ctggtacagc aagttgcgaa aacctgcccg aaagcgtgca ttggtattat cactaaccgg 360
 gttaacacca cagttgcaat tgctgctgaa gtgctgaaaa aagccggtgt ttatgacaaa 420
 aacaaactgt tcggcgttac cacgctggat atcattcggt ccaacacctt tgttgcgga 480
 ctgaaaggca aacagccagg cgaagttgaa gtgccgggta ttggcggtca ctctggtgtt 540
 accattctgc cgctgctgtc acaggttctt ggcgttagtt ttaccgagca ggaagtggct 600
 gatctgacca aacgcatcca gaacgcgggt actgaagtgg ttgaagcgaa gcccggtggc 660
 gggctctgcaa cctctctat gggccaggca gctgcacggt ttggtctgtc tctggtctgt 720
 gcactgcagg gcgaacaagg cgttgtcgaa tgtgcctacg ttgaaggcga cggtcagtac 780
 gcccgtttct tctctcaacc gctgctgctg ggtaaaaacg gcgtggaaga gcgtaaatct 840
 atcggtagcc tgagcgcatt tgaacagaac gcgctggaag gtatgctgga tacgctgaag 900
 aaagatatcg ccctgggcga agagttcggt aataagtaa 939

<210> 160
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 160
 Met Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ala Gly Gly Ile Gly Gln Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Leu Lys Thr Gln Leu Pro Ser Gly Ser Glu Leu Ser Leu
 20 25 30

15

ES 2 672 883 T3

Tyr Asp Ile Ala Pro Val Thr Pro Gly Val Ala Val Asp Leu Ser His
 35 40 45
 Ile Pro Thr Ala Val Lys Ile Lys Gly Phe Ser Gly Glu Asp Ala Thr
 50 55 60
 Pro Ala Leu Glu Gly Ala Asp Val Val Leu Ile Ser Ala Gly Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Lys Pro Gly Glu Asp Arg Ser Asp Leu Phe Asn Val Asn Ala Gly
 85 90 95
 Ile Val Lys Asn Leu Val Gln Gln Val Ala Lys Thr Cys Pro Lys Ala
 100 105 110
 Cys Ile Gly Ile Ile Thr Asn Pro Val Asn Thr Thr Val Ala Ile Ala
 115 120 125
 Ala Glu Val Leu Lys Lys Ala Gly Val Tyr Asp Lys Asn Lys Leu Phe
 130 135 140
 Gly Val Thr Thr Leu Asp Ile Ile Arg Ser Asn Thr Phe Val Ala Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Gly Lys Gln Pro Gly Glu Val Glu Val Pro Val Ile Gly Gly
 165 170 175
 His Ser Gly Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Pro Gly Val
 180 185 190
 Ser Phe Thr Glu Gln Glu Val Ala Asp Leu Thr Lys Arg Ile Gln Asn
 195 200 205
 Ala Gly Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Gly Gly Ser Ala Thr
 210 215 220
 Leu Ser Met Gly Gln Ala Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ser Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Gln Gly Glu Gln Gly Val Val Glu Cys Ala Tyr Val Glu Gly
 245 250 255
 Asp Gly Gln Tyr Ala Arg Phe Phe Ser Gln Pro Leu Leu Leu Gly Lys
 260 265 270
 Asn Gly Val Glu Glu Arg Lys Ser Ile Gly Thr Leu Ser Ala Phe Glu
 275 280 285
 Gln Asn Ala Leu Glu Gly Met Leu Asp Thr Leu Lys Lys Asp Ile Ala
 290 295 300
 Leu Gly Glu Glu Phe Val Asn Lys
 305 310

ES 2 672 883 T3

<211> 939
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 161
 atgaaagtcg cagtcctcgg cgctgctggc ggtgtcggcc aggcgcttgc actactgtta 60
 aaaacccaac tgccttcagg ttcagaactc tctctgtatg atatcgctcc agtgactccc 120
 ggtgtggctg tcgatctgag ccatatccct actgctgtga aaatcaaag tttttctggt 180
 gaagatgcga ctccggcgct ggaaggcgca gatgtcgttc ttatctctgc aggcgtagcg 240
 gctaaacccg ggatggatcg ttccgacctg tttaacgtta acgcccgcct cgtgaaaaac 300
 ctggtacagc aagttgcgaa aacctgcccg aaagcgtgca ttggtattat cactaacccg 360
 gttaacacca cagttgcaat tgctgctgaa gtgctgaaaa aagccggtgt ttatgacaaa 420
 aacaaactgt tcggcgttac cacgctggat atcattcggt ccaacacctt tgttgcgga 480
 ctgaaaggca aacagccagg cgaagttgaa gtgccgggta ttggcgggtca ctctggtgtt 540
 accattctgc cgctgctgct acaggttccct ggcgtaggtt ttaccgagca ggaagtggct 600
 gatctgacca aacgcatcca gaacgcgggt actgaagtgg ttgaagcgaa ggcggtggc 660
 gggctctgcaa cctctctat gggccaggca gctgcacggt ttggtctgtc tctggtctgt 720
 gcactgcagg gcgaacaagg cgttgtcgaa tgtgcctacg ttgaaggcga cggtcagtac 780
 gccggtttct tctctcaacc gctgctgctg ggtaaaaacg gcgtggaaga gcgtaaatct 840
 atcggtagcc tgagcgcatt tgaacagaac gcgctggaag gtatgctgga tacgctgaag 900
 aaagatatcg ccctgggcga agagttcgtt aataagtaa 939

<210> 162
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 162
 Met Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ala Gly Gly Val Gly Gln Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Leu Lys Thr Gln Leu Pro Ser Gly Ser Glu Leu Ser Leu
 20 25 30

15

ES 2 672 883 T3

Tyr Asp Ile Ala Pro Val Thr Pro Gly Val Ala Val Asp Leu Ser His
 35 40 45
 Ile Pro Thr Ala Val Lys Ile Lys Gly Phe Ser Gly Glu Asp Ala Thr
 50 55 60
 Pro Ala Leu Glu Gly Ala Asp Val Val Leu Ile Ser Ala Gly Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Lys Pro Gly Met Asp Arg Ser Asp Leu Phe Asn Val Asn Ala Gly
 85 90 95
 Ile Val Lys Asn Leu Val Gln Gln Val Ala Lys Thr Cys Pro Lys Ala
 100 105 110
 Cys Ile Gly Ile Ile Thr Asn Pro Val Asn Thr Thr Val Ala Ile Ala
 115 120 125
 Ala Glu Val Leu Lys Lys Ala Gly Val Tyr Asp Lys Asn Lys Leu Phe
 130 135 140
 Gly Val Thr Thr Leu Asp Ile Ile Arg Ser Asn Thr Phe Val Ala Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Gly Lys Gln Pro Gly Glu Val Glu Val Pro Val Ile Gly Gly
 165 170 175
 His Ser Gly Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Pro Gly Val
 180 185 190
 Ser Phe Thr Glu Gln Glu Val Ala Asp Leu Thr Lys Arg Ile Gln Asn
 195 200 205
 Ala Gly Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Gly Gly Ser Ala Thr
 210 215 220
 Leu Ser Met Gly Gln Ala Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ser Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Gln Gly Glu Gln Gly Val Val Glu Cys Ala Tyr Val Glu Gly
 245 250 255
 Asp Gly Gln Tyr Ala Arg Phe Phe Ser Gln Pro Leu Leu Leu Gly Lys
 260 265 270
 Asn Gly Val Glu Glu Arg Lys Ser Ile Gly Thr Leu Ser Ala Phe Glu
 275 280 285
 Gln Asn Ala Leu Glu Gly Met Leu Asp Thr Leu Lys Lys Asp Ile Ala
 290 295 300
 Leu Gly Glu Glu Phe Val Asn Lys
 305 310

ES 2 672 883 T3

<211> 939
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 163
 atgaaagtcg cagtcctcgg cgccgctggc ggtgtcggcc aggcgcttgc actactgtta 60
 aaaacccaac tgccttcagg ttcagaactc tctctgtatg atatcgctcc agtgactccc 120
 ggtgtggctg tcgatctgag ccatatccct actgctgtga aaatcaaag tttttctggt 180
 gaagatgcga ctccggcgct ggaaggcgca gatgtcgttc ttatctctgc aggcgtagcg 240
 gctaaaccgg gtcaggatcg ttccgacctg tttaacgtta acgcccggcat cgtgaaaaac 300
 ctggtacagc aagttgcgaa aacctgcccg aaagcgtgca ttggtattat cactaacccg 360
 gttaaacacca cagttgcaat tgctgctgaa gtgctgaaaa aagccggtgt ttatgacaaa 420
 aacaaactgt tcggcgttac cacgctggat atcattcggt ccaacacctt tgttgcgga 480
 ctgaaaggca aacagccagg cgaagttgaa gtgccgggta ttggcgggtca ctctggtgtt 540
 accattctgc cgctgctgtc acaggttcct ggcgttagtt ttaccgagca ggaagtggct 600
 gatctgacca aacgcatcca gaacgcgggt actgaagtgg ttgaagcgaa ggcggtggc 660
 gggctctgcaa cctctctat gggccaggca gctgcacggt ttggtctgtc tctggtctgt 720
 gcactgcagg gcgaacaagg cgttgtcgaa tgtgcctacg ttgaaggcga cggtcagtac 780
 gccggtttct tctctcaacc gctgctgctg ggtaaaaacg gcgtggaaga gcgtaaatct 840
 atcggtagcc tgagcgcatt tgaacagaac gcgctggaag gtatgctgga tacgctgaag 900
 aaagatatcg ccctgggcga agagttcgtt aataagtaa 939

<210> 164
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 164
 Met Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ala Gly Gly Val Gly Gln Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Leu Lys Thr Gln Leu Pro Ser Gly Ser Glu Leu Ser Leu
 20 25 30

15

ES 2 672 883 T3

Tyr Asp Ile Ala Pro Val Thr Pro Gly Val Ala Val Asp Leu Ser His
 35 40 45
 Ile Pro Thr Ala Val Lys Ile Lys Gly Phe Ser Gly Glu Asp Ala Thr
 50 55 60
 Pro Ala Leu Glu Gly Ala Asp Val Val Leu Ile Ser Ala Gly Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Lys Pro Gly Gln Asp Arg Ser Asp Leu Phe Asn Val Asn Ala Gly
 85 90 95
 Ile Val Lys Asn Leu Val Gln Gln Val Ala Lys Thr Cys Pro Lys Ala
 100 105 110
 Cys Ile Gly Ile Ile Thr Asn Pro Val Asn Thr Thr Val Ala Ile Ala
 115 120 125
 Ala Glu Val Leu Lys Lys Ala Gly Val Tyr Asp Lys Asn Lys Leu Phe
 130 135 140
 Gly Val Thr Thr Leu Asp Ile Ile Arg Ser Asn Thr Phe Val Ala Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Gly Lys Gln Pro Gly Glu Val Glu Val Pro Val Ile Gly Gly
 165 170 175
 His Ser Gly Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Pro Gly Val
 180 185 190
 Ser Phe Thr Glu Gln Glu Val Ala Asp Leu Thr Lys Arg Ile Gln Asn
 195 200 205
 Ala Gly Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Gly Gly Ser Ala Thr
 210 215 220
 Leu Ser Met Gly Gln Ala Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ser Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Gln Gly Glu Gln Gly Val Val Glu Cys Ala Tyr Val Glu Gly
 245 250 255
 Asp Gly Gln Tyr Ala Arg Phe Phe Ser Gln Pro Leu Leu Leu Gly Lys
 260 265 270
 Asn Gly Val Glu Glu Arg Lys Ser Ile Gly Thr Leu Ser Ala Phe Glu
 275 280 285
 Gln Asn Ala Leu Glu Gly Met Leu Asp Thr Leu Lys Lys Asp Ile Ala
 290 295 300
 Leu Gly Glu Glu Phe Val Asn Lys
 305 310

ES 2 672 883 T3

<211> 939
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 165
 atgaaagtcg cagtcctcgg cgccgctggc ggtgtcggcc aggcgcttgc actactgtta 60
 aaaacccaac tgccttcagg ttcagaactc tctctgtatg atatcgctcc agtgactccc 120
 ggtgtggctg tcgatctgag ccatatccct actgctgtga aaatcaaag tttttctggt 180
 gaagatgcga ctccggcgct ggaaggcgca gatgtcgttc ttatctctgc aggcgtagcg 240
 gctaaaccgg gtgaggatcg ttccgacctg tttaacgtta acgccggcat cgtgaaaaac 300
 ctggtacagc aagttgcgaa aacctgcccg aaagcgtgca ttggtattat cactaacccg 360
 gttaaacacca cagttgcaat tgctgctgaa gtgctgaaaa aagccggtgt ttatgacaaa 420
 aacaaactgt tcggcgttac cacgctggat atcattcggt ccaacacctt tgttgcgga 480
 ctgaaaggca aacagccagg cgaagttgaa gtgccgggta ttggcgggtca ctctggtgtt 540
 accattctgc cgctgctgtc acaggttcct ggcgtaggt ttaccgagca ggaagtggct 600
 gatctgacca aacgcatcca gaacgcgggt actgaagtgg ttgaagcgaa ggcggtggc 660
 gggctctgcaa ccctgtctat gggccaggca gctgcacggt ttggtctgtc tctggttcgt 720
 gcactgcagg gcgaacaagg cgttgtcgaa tgtgcctacg ttgaaggcga cggtcagtac 780
 gccggtttct tctctcaacc gctgctgctg ggtaaaaacg gcgtggaaga gcgtaaatct 840
 atcggtagcc tgagcgcatt tgaacagaac gcgctggaag gtatgctgga tacgctgaag 900
 aaagatatcg ccctgggcga agagttcgtt aataagtaa 939

<210> 166
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 166
 Met Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ala Gly Gly Val Gly Gln Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Leu Lys Thr Gln Leu Pro Ser Gly Ser Glu Leu Ser Leu
 20 25 30

15

ES 2 672 883 T3

Tyr Asp Ile Ala Pro Val Thr Pro Gly Val Ala Val Asp Leu Ser His
 35 40 45
 Ile Pro Thr Ala Val Lys Ile Lys Gly Phe Ser Gly Glu Asp Ala Thr
 50 55 60
 Pro Ala Leu Glu Gly Ala Asp Val Val Leu Ile Ser Ala Gly Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Lys Pro Gly Glu Asp Arg Ser Asp Leu Phe Asn Val Asn Ala Gly
 85 90 95
 Ile Val Lys Asn Leu Val Gln Gln Val Ala Lys Thr Cys Pro Lys Ala
 100 105 110
 Cys Ile Gly Ile Ile Thr Asn Pro Val Asn Thr Thr Val Ala Ile Ala
 115 120 125
 Ala Glu Val Leu Lys Lys Ala Gly Val Tyr Asp Lys Asn Lys Leu Phe
 130 135 140
 Gly Val Thr Thr Leu Asp Ile Ile Arg Ser Asn Thr Phe Val Ala Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Gly Lys Gln Pro Gly Glu Val Glu Val Pro Val Ile Gly Gly
 165 170 175
 His Ser Gly Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Pro Gly Val
 180 185 190
 Ser Phe Thr Glu Gln Glu Val Ala Asp Leu Thr Lys Arg Ile Gln Asn
 195 200 205
 Ala Gly Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Gly Gly Ser Ala Thr
 210 215 220
 Leu Ser Met Gly Gln Ala Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ser Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Gln Gly Glu Gln Gly Val Val Glu Cys Ala Tyr Val Glu Gly
 245 250 255
 Asp Gly Gln Tyr Ala Arg Phe Phe Ser Gln Pro Leu Leu Leu Gly Lys
 260 265 270
 Asn Gly Val Glu Glu Arg Lys Ser Ile Gly Thr Leu Ser Ala Phe Glu
 275 280 285
 Gln Asn Ala Leu Glu Gly Met Leu Asp Thr Leu Lys Lys Asp Ile Ala
 290 295 300
 Leu Gly Glu Glu Phe Val Asn Lys
 305 310

ES 2 672 883 T3

<211> 939
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 167
 atgaaagtcg cagtcctcgg cgctgctggc ggtattggcc aggcgcttgc actactgtta 60
 aaaacccaac tgccttcagg ttcagaactc tctctgtatg atatcgctcc agtgactccc 120
 ggtgtggctg tcgatctgag ccatatccct actgctgtga aaatcaaagg tttttctggt 180
 gaagatgcga ctccggcgct ggaaggcgca gatgtcgttc ttatctctgc aggcgtagcg 240
 gctaaacccg ggatggatcg ttccgacctg tttaacgtta acgccggcat cgtgaaaaac 300
 ctggtacagc aagttgcgaa aacctgcccg aaagcgtgca ttggtattat cactaacccg 360
 gttaacacca cagttgcaat tgctgctgaa gtgctgaaaa aagccgggtg ttatgacaaa 420
 aacaaactgt tcggcggtac cacgctggat atcattcgtt ccaacacctt tgttgcgtaa 480
 ctgaaaggca aacagccagg cgaagttgaa gtgccgggta ttggcggcca ctctgatggt 540
 accattctgc cgctgctgtc acaggttcct ggcgtagt ttaccgagca ggaagtggct 600
 gatctgacca aacgcatcca gaacgcgggt actgaagtgg ttgaagcgaa ggcggtggc 660
 gggctgcaaa ccctgtctat gggccaggca gctgcacggt ttggtctgtc tctggtctgt 720
 gcactgcagg gcgaacaagg cgttgctgaa tgtgcctacg ttgaaggcga cggtcagtac 780
 gcccgtttct tctctcaacc gctgctgctg ggtaaaaacg gcgtggaaga gcgtaaatct 840
 atcggtagcc tgagcgcatt tgaacagaac gcgctggaag gtatgctgga tacgctgaag 900
 aaagatatcg ccctgggcga agagttcgtt aataagtaa 939

<210> 168
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 168
 Met Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ala Gly Gly Ile Gly Gln Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Leu Lys Thr Gln Leu Pro Ser Gly Ser Glu Leu Ser Leu
 20 25 30

15

ES 2 672 883 T3

Tyr Asp Ile Ala Pro Val Thr Pro Gly Val Ala Val Asp Leu Ser His
 35 40 45
 Ile Pro Thr Ala Val Lys Ile Lys Gly Phe Ser Gly Glu Asp Ala Thr
 50 55 60
 Pro Ala Leu Glu Gly Ala Asp Val Val Leu Ile Ser Ala Gly Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Lys Pro Gly Met Asp Arg Ser Asp Leu Phe Asn Val Asn Ala Gly
 85 90 95
 Ile Val Lys Asn Leu Val Gln Gln Val Ala Lys Thr Cys Pro Lys Ala
 100 105 110
 Cys Ile Gly Ile Ile Thr Asn Pro Val Asn Thr Thr Val Ala Ile Ala
 115 120 125
 Ala Glu Val Leu Lys Lys Ala Gly Val Tyr Asp Lys Asn Lys Leu Phe
 130 135 140
 Gly Val Thr Thr Leu Asp Ile Ile Arg Ser Asn Thr Phe Val Ala Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Gly Lys Gln Pro Gly Glu Val Glu Val Pro Val Ile Gly Gly
 165 170 175
 His Ser Asp Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Pro Gly Val
 180 185 190
 Ser Phe Thr Glu Gln Glu Val Ala Asp Leu Thr Lys Arg Ile Gln Asn
 195 200 205
 Ala Gly Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Gly Gly Ser Ala Thr
 210 215 220
 Leu Ser Met Gly Gln Ala Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ser Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Gln Gly Glu Gln Gly Val Val Glu Cys Ala Tyr Val Glu Gly
 245 250 255
 Asp Gly Gln Tyr Ala Arg Phe Phe Ser Gln Pro Leu Leu Leu Gly Lys
 260 265 270
 Asn Gly Val Glu Glu Arg Lys Ser Ile Gly Thr Leu Ser Ala Phe Glu
 275 280 285
 Gln Asn Ala Leu Glu Gly Met Leu Asp Thr Leu Lys Lys Asp Ile Ala
 290 295 300
 Leu Gly Glu Glu Phe Val Asn Lys
 305 310

ES 2 672 883 T3

<211> 939
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 169
 atgaaagtcg cagtcctcgg cgctgctggc ggtattggcc aggcgcttgc actactgtta 60
 aaaacccaac tgccttcagg ttcagaactc tctctgtatg atatcgctcc agtgactccc 120
 ggtgtggctg tcgatctgag ccatatccct actgctgtga aaatcaaagg tttttctggt 180
 gaagatgcga ctccggcgct ggaaggcgca gatgctgttc ttatctctgc aggcgtagcg 240
 gctaaacccg ggatgtctcg ttccgacctg tttaacgtta acgcccggcat cgtgaaaaac 300
 ctggtacagc aagttgcgaa aacctgcccg aaagcgtgca ttggtattat cactaacccg 360
 gttaacacca cagttgcaat tgctgctgaa gtgctgaaaa aagccgggtg ttatgacaaa 420
 aacaaactgt tcggcggtac cacgctggat atcattcgtt ccaacacctt tgttgcgtaa 480
 ctgaaaggca aacagccagg cgaagttgaa gtgccggtta ttggcgggtca ctctggtggt 540
 accattctgc cgctgctgtc acaggttcct ggcgttagtt ttaccgagca ggaagtggct 600
 gatctgacca aacgcatcca gaacgcgggt actgaagtgg ttgaagcgaa ggccggtggc 660
 gggctctgcaa cctctctat gggccaggca gctgcacggt ttggtctgtc tctggtctgt 720
 gcactgcagg gcgaacaagg cgttgctgaa tgtgcctacg ttgaaggcga cggtcagtac 780
 gcccgtttct tctctcaacc gctgctgctg ggtaaaaacg gcgtggaaga gcgtaaatct 840
 atcggtagcc tgagcgcatt tgaacagaac gcgctggaag gtatgctgga tacgctgaag 900
 aaagatatcg ccctgggcga agagttcgtt aataagtaa 939

<210> 170
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 170
 Met Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ala Gly Gly Ile Gly Gln Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Leu Lys Thr Gln Leu Pro Ser Gly Ser Glu Leu Ser Leu
 20 25 30

15

ES 2 672 883 T3

Tyr Asp Ile Ala Pro Val Thr Pro Gly Val Ala Val Asp Leu Ser His
 35 40 45
 Ile Pro Thr Ala Val Lys Ile Lys Gly Phe Ser Gly Glu Asp Ala Thr
 50 55 60
 Pro Ala Leu Glu Gly Ala Asp Val Val Leu Ile Ser Ala Gly Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Lys Pro Gly Met Ser Arg Ser Asp Leu Phe Asn Val Asn Ala Gly
 85 90 95
 Ile Val Lys Asn Leu Val Gln Gln Val Ala Lys Thr Cys Pro Lys Ala
 100 105 110
 Cys Ile Gly Ile Ile Thr Asn Pro Val Asn Thr Thr Val Ala Ile Ala
 115 120 125
 Ala Glu Val Leu Lys Lys Ala Gly Val Tyr Asp Lys Asn Lys Leu Phe
 130 135 140
 Gly Val Thr Thr Leu Asp Ile Ile Arg Ser Asn Thr Phe Val Ala Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Gly Lys Gln Pro Gly Glu Val Glu Val Pro Val Ile Gly Gly
 165 170 175
 His Ser Gly Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Pro Gly Val
 180 185 190
 Ser Phe Thr Glu Gln Glu Val Ala Asp Leu Thr Lys Arg Ile Gln Asn
 195 200 205
 Ala Gly Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Gly Gly Ser Ala Thr
 210 215 220
 Leu Ser Met Gly Gln Ala Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ser Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Gln Gly Glu Gln Gly Val Val Glu Cys Ala Tyr Val Glu Gly
 245 250 255
 Asp Gly Gln Tyr Ala Arg Phe Phe Ser Gln Pro Leu Leu Leu Gly Lys
 260 265 270
 Asn Gly Val Glu Glu Arg Lys Ser Ile Gly Thr Leu Ser Ala Phe Glu
 275 280 285
 Gln Asn Ala Leu Glu Gly Met Leu Asp Thr Leu Lys Lys Asp Ile Ala
 290 295 300
 Leu Gly Glu Glu Phe Val Asn Lys
 305 310

ES 2 672 883 T3

<211> 939
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 171

```

atgaaagtcg cagtoctcgg cgctgctggc ggtattggcc aggcgcttgc actactgtta      60
aaaacccaac tgccttcagg ttcagaactc tctctgtatg atatcgctcc agtgactccc      120
ggtgtggctg tcgatctgag ccatatccct actgctgtga aaatcaaagg tttttctggt      180
gaagatgcga ctccggcgct ggaaggcgca gatgtcgttc ttatctctgc aggcgtagcg      240
gctaaacccg ggatgtctcg ttccgacctg tttaacgtta acgccggcat cgtgaaaaac      300
ctggtacagc aagttgcgaa aacctgcccg aaagcgtgca ttggtattat cactaacccg      360
gttaacacca cagttgcaat tgctgctgaa gtgtgaaaa aagccgggtg ttatgacaaa      420
aacaactgt  tcggcgttac cacgctggat atcatctggt ccaacacctt tgttgcgtaa      480
ctgaaaggca aacagccagg cgaagttgaa gtgccgggta ttggcggcca ctctgatggt      540
accattctgc cgctgctgtc acaggttcct ggcgtagtgg ttaccgagca ggaagtggct      600
gatctgacca aacgcatcca gaacgcgggt actgaagtgg ttgaagcgaa ggccggtggc      660
gggtctgcaa ccctgtctat gggccaggca gctgcacggt ttggtctgtc tctggttcgt      720
gcactgcagg gcgaacaagg cgttgctgaa tgtgcctacg ttgaaggcga cggtcagtac      780
gcccgtttct tctctcaacc gctgctgctg ggtaaaaacg gcgtggaaga gcgtaaatct      840
atcggtacct tgagcgcatt tgaacagaac gcgctggaag gtatgctgga tacgctgaag      900
aaagatatcg ccctgggcga agagttcgtt aataagtaa                                939
  
```

10 <210> 172
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 172
 Met Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ala Gly Gly Ile Gly Gln Ala Leu
 1 5 10 15

15 Ala Leu Leu Leu Lys Thr Gln Leu Pro Ser Gly Ser Glu Leu Ser Leu
 20 25 30

ES 2 672 883 T3

Tyr Asp Ile Ala Pro Val Thr Pro Gly Val Ala Val Asp Leu Ser His
 35 40 45
 Ile Pro Thr Ala Val Lys Ile Lys Gly Phe Ser Gly Glu Asp Ala Thr
 50 55 60
 Pro Ala Leu Glu Gly Ala Asp Val Val Leu Ile Ser Ala Gly Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Lys Pro Gly Met Ser Arg Ser Asp Leu Phe Asn Val Asn Ala Gly
 85 90 95
 Ile Val Lys Asn Leu Val Gln Gln Val Ala Lys Thr Cys Pro Lys Ala
 100 105 110
 Cys Ile Gly Ile Ile Thr Asn Pro Val Asn Thr Thr Val Ala Ile Ala
 115 120 125
 Ala Glu Val Leu Lys Lys Ala Gly Val Tyr Asp Lys Asn Lys Leu Phe
 130 135 140
 Gly Val Thr Thr Leu Asp Ile Ile Arg Ser Asn Thr Phe Val Ala Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Gly Lys Gln Pro Gly Glu Val Glu Val Pro Val Ile Gly Gly
 165 170 175
 His Ser Asp Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Pro Gly Val
 180 185 190
 Ser Phe Thr Glu Gln Glu Val Ala Asp Leu Thr Lys Arg Ile Gln Asn
 195 200 205
 Ala Gly Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Gly Gly Ser Ala Thr
 210 215 220
 Leu Ser Met Gly Gln Ala Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ser Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Gln Gly Glu Gln Gly Val Val Glu Cys Ala Tyr Val Glu Gly
 245 250 255
 Asp Gly Gln Tyr Ala Arg Phe Phe Ser Gln Pro Leu Leu Leu Gly Lys
 260 265 270
 Asn Gly Val Glu Glu Arg Lys Ser Ile Gly Thr Leu Ser Ala Phe Glu
 275 280 285
 Gln Asn Ala Leu Glu Gly Met Leu Asp Thr Leu Lys Lys Asp Ile Ala
 290 295 300
 Leu Gly Glu Glu Phe Val Asn Lys
 305 310

ES 2 672 883 T3

<211> 1191
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 173
 atgattatth cgcagccag cgattatcgc gccgcagcgc aacgcattct gccgccgttc 60
 ctgttccact atatggatgg tgggtgcatat tctgaataca cgctgcgccg caacgtggaa 120
 gatttgtcag aagtggcgct gcgccagcgt attctgaaaa acatgtccga cttaaagcctg 180
 gaaacgacgc tgtttaatga gaaattgtcg atgccgggtg cactggctcc ggtgggtttg 240
 tgtggcatgt atgcgcgtcg tggcgaagtt caggcagcca aagcggcggg cgcgcatggt 300
 attccgttta ctctgtcgac gtgttccgtt tgcccgattg aagaagtcgc gccagccatc 360
 aagcgcctaa tgtggttcca gctttatgta ctgcgcgatc gcggctttat gcgtaacgcg 420
 ctggagcggg caaaagcagc ggggtgttcg acgctggttt tcaccgtgga tatgccgaca 480
 ccgggagcac gctaccgtga tgcgcattca ggtatgagcg gcccgaaacgc ggcaatgcgc 540
 cgctacttgc aagcgggtgac acatccgcaa tggcgtggg atgtgggcct gaacggtcgt 600
 ccacatgatt taggtaatat ctacgcttat ctccgcaaac cgaccggact ggaagattac 660
 atcggctggc tggggaataa ctccgatccg tccatctcat ggaagacct tgaatggatc 720
 cgcgatttct gggatggccc gatggtgatc aaagggatcc tcgatccgga agatgcgcgc 780
 gatgcagtac gttttggtgc tgatggaatt gtggtttcta accacgggtg ccgccagctg 840
 gacgggtgac tetcttccgc ccgtgcaact cctgctattg cagatgcggt gaaaggtgat 900
 atagccattc tggcggatag cggaattcgt aacgggcttg atgtcgtgcg tatgattgcg 960
 ctccgtgccg acaccgtact gctgggtcgt gctttcttgt atgcgctggc aacagcgggc 1020
 caggcgggtg tagctaacct gctaaatctg atcgaaaag agatgaaagt ggcgatgacg 1080
 ctgactggcg cgaatcgcg cagcgaatc acgcaagatt cgctggtgca ggggctgggt 1140
 aaagagttgc ctgcggcact ggctcccatg gcgaaagga atgcggcata g 1191

<210> 174
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 174

ES 2 672 883 T3

Met Ile Ile Ser Ala Ala Ser Asp Tyr Arg Ala Ala Ala Gln Arg Ile
1 5 10 15

Leu Pro Pro Phe Leu Phe His Tyr Met Asp Gly Gly Ala Tyr Ser Glu
20 25 30

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

Gln Arg Ile Leu Lys Asn Met Ser Asp Leu Ser Leu Glu Thr Thr Leu
50 55 60

Phe Asn Glu Lys Leu Ser Met Pro Val Ala Leu Ala Pro Val Gly Leu
65 70 75 80

Cys Gly Met Tyr Ala Arg Arg Gly Glu Val Gln Ala Ala Lys Ala Ala
85 90 95

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

Ile Glu Glu Val Ala Pro Ala Ile Lys Arg Pro Met Trp Phe Gln Leu
115 120 125

Tyr Val Leu Arg Asp Arg Gly Phe Met Arg Asn Ala Leu Glu Arg Ala
130 135 140

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

Pro Gly Ala Arg Tyr Arg Asp Ala His Ser Gly Met Ser Gly Pro Asn
165 170 175

Ala Ala Met Arg Arg Tyr Leu Gln Ala Val Thr His Pro Gln Trp Ala
180 185 190

Trp Asp Val Gly Leu Asn Gly Arg Pro His Asp Leu Gly Asn Ile Ser
195 200 205

Ala Tyr Leu Gly Lys Pro Thr Gly Leu Glu Asp Tyr Ile Gly Trp Leu
210 215 220

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

Arg Asp Phe Trp Asp Gly Pro Met Val Ile Lys Gly Ile Leu Asp Pro

ES 2 672 883 T3

	245		250		255
Glu Asp Ala Arg Asp Ala Val Arg Phe Gly Ala Asp Gly Ile Val Val	260		265		270
Ser Asn His Gly Gly Arg Gln Leu Asp Gly Val Leu Ser Ser Ala Arg	275		280		285
Ala Leu Pro Ala Ile Ala Asp Ala Val Lys Gly Asp Ile Ala Ile Leu	290		295		300
Ala Asp Ser Gly Ile Arg Asn Gly Leu Asp Val Val Arg Met Ile Ala	305		310		315
Leu Gly Ala Asp Thr Val Leu Leu Gly Arg Ala Phe Leu Tyr Ala Leu		325		330	335
Ala Thr Ala Gly Gln Ala Gly Val Ala Asn Leu Leu Asn Leu Ile Glu		340		345	350
Lys Glu Met Lys Val Ala Met Thr Leu Thr Gly Ala Lys Ser Ile Ser		355		360	365
Glu Ile Thr Gln Asp Ser Leu Val Gln Gly Leu Gly Lys Glu Leu Pro		370		375	380
Ala Ala Leu Ala Pro Met Ala Lys Gly Asn Ala Ala		385		390	395

- 5 <210> 175
- <211> 26
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Cebador de amplificación
- <400> 175
- catatgtctg aaattacttt gggtaa 26
- 15 <210> 176
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Cebador de amplificación
- <400> 176
- ggatccttat tgcttagcgt tggt 24
- 25 <210> 177
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Cebador de amplificación
- <400> 177

5 catatgagtt atactgtcgg tacc 24
 <210> 178
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 10 <400> 178
 ggatccctag aggagcttgt taac 24
 <210> 179
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador de amplificación
 <400> 179
 gttattgctg aaaccggtga ctctcagttc aatgcgcagc gcatgaagc 49
 25 <210> 180
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador de amplificación
 <400> 180
 gcttcatgcg ctgcgcatg aactgagagt caccggttc agcaataac 49
 35 <210> 181
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador de amplificación
 <400> 181
 45 acggttattg ctgaaaccgg tgactcttta ttcaatgcbc agcgcgatgaa gctc 54
 <210> 182
 <211> 54
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 <400> 182
 55 gagcttcatg cgctgcbcat tgaataaaga gtcaccggtt tcagcaataa ccgt 54
 <210> 183
 <211> 48
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de amplificación
 65 <400> 183

tatgaaatgc agtgaacca cattggttg tccgtacctg cgccttc 48

<210> 184
 <211> 48
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

10 <400> 184
 gaaggcggca ggtaccgacc aaccaatgtg gttccactgc atttcata 48

<210> 185
 <211> 42
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Cebador de amplificación

<400> 185
 ggacaaccgc tgtgtccag tattgggtat acgtttccag cg 42

25 <210> 186
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 186
 35 cgctggaaac gtataccaa tactggacca cagcggttgt cc 42

<210> 187
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador de amplificación

<400> 187
 45 ttgtcttat cattaataat gacggctaca caatcgagcg cgaaattca 49

<210> 188
 <211> 49
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de amplificación

55 <400> 188
 tgaatttcgc gctcgattgt gtagccgtca ttattaatga taaagcaaa 49

<210> 189
 <211> 1707
 60 <212> ADN
 <213> Zymomonas mobilis

<400> 189

ES 2 672 883 T3

atgagttata ctgtcggtag ctatthagcg gagcggcttg tccagattgg totcaagcat 60
cacttcgcag tcgcgggoga ctacaacctc gtccttcttg acaacctgct tttgaacaaa 120
aacatggagc aggtttattg ctgtaacgaa ctgaactgcg gtttcagtgc agaaggttat 180
gctcgtgcca aaggcgcagc agcagccgtc gttacctaca gcgctcggtc gctttccgca 240
tttgatgcta tcggtggcgc ctatgcagaa aaccttccgg ttatcctgat ctccggtgct 300
ccgaacaaca atgatcacgc tgctggtcac gtgttgcatc acgctcttgg caaaaccgac 360
tatcactatc agttggaaat ggccaagaac atcacggccg ccgctgaagc gatttacacc 420
ccggaagaag ctccggctaa aatcgatcac gtgattaaaa ctgctcttcg tgagaagaag 480
ccggtttatc tcgaaatcgc ttgcaacatt gcttccatgc cctgcgccgc tcctggaccg 540
gcaagcgcac tgttcaatga cgaagccagc gacgaagctt ctttgaatgc agcggttgaa 600
gaaacctga aatcatcgc caaccgcgac aaagttgccg tcctcgtcgg cagcaagctg 660
cgcgcagctg gtgctgaaga agctgctgtc aaatttgctg atgctctcgg tggcgcagtt 720
gctaccatgg ctgctgcaaa aagcttcttt ccagaagaaa acccgcatta catcggcacc 780
tcatggggtg aagtcagcta tccgggcgtt gaaaagacga tgaaagaagc cgatgcggtt 840
atcgctctgg ctccctgtct caacgactac tccaccactg gttggacgga tattcctgat 900
cctaagaac tggttctcgc tgaaccgcgt tctgtcgtcg ttaacggcat tcgcttcccc 960
agcgtccatc tgaagacta tctgaccctg ttggctcaga aagtttcaa gaaaaccggt 1020
gcattggact tcttcaaact cctcaatgca ggtgaactga agaaagccgc tccggctgat 1080
ccgagtgctc cgttgggtcaa cgcagaaatc gcccgccaag tcgaagctct tctgaccccg 1140
aacacgacgg ttattgctga aaccgggtgac tctgacttca atgocgacgc catgaagctc 1200
ccgaacgggtg ctccggttga atatgaaatg cagtggggtc acattgggtg gtccgttctc 1260
gccgccttcg gttatgccgt cgggtgctccg gaacgtcgcac acatcctcat ggttggtgat 1320
ggttccttcc agctgacggc tcaggaagtc gctcagatgg ttcgcctgaa actgccgggt 1380
atcatcttct tgatcaataa ctatggttac accatcgaag ttatgatcca tgatggtccg 1440
tacaacaaca tcaagaactg ggattatgcc ggtctgatgg aagtgttcaa cggtaacgggt 1500
ggttatgaca gcggtgctgg taaaggcctg aaggctaaaa ccggtggcga actggcagaa 1560
gctatcaagg ttgctctggc aaacaccgac ggccaaccc tgatcgaatg cttcatcgggt 1620
cgtgaagact gactgaaga attggtcaaa tgggtaagc gcgttgctgc ccgcaacagc 1680
cgtaagcctg ttaacaaget cctctag 1707

5 <210> 190
<211> 568
<212> PRT
<213> *Zymomonas mobilis*

10 <400> 190

ES 2 672 883 T3

Met Ser Tyr Thr Val Gly Thr Tyr Leu Ala Glu Arg Leu Val Gln Ile
 1 5 10 15

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

Leu Asp Asn Leu Leu Leu Asn Lys Asn Met Glu Gln Val Tyr Cys Cys
 35 40 45

Asn Glu Leu Asn Cys Gly Phe Ser Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Lys
 50 55 60

Gly Ala Ala Ala Ala Val Val Thr Tyr Ser Val Gly Ala Leu Ser Ala
 65 70 75 80

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

Ile Ser Gly Ala Pro Asn Asn Asn Asp His Ala Ala Gly His Val Leu
 100 105 110

His His Ala Leu Gly Lys Thr Asp Tyr His Tyr Gln Leu Glu Met Ala
 115 120 125

Lys Asn Ile Thr Ala Ala Ala Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu Glu Ala
 130 135 140

ES 2 672 883 T3

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

Pro Val Tyr Leu Glu Ile Ala Cys Asn Ile Ala Ser Met Pro Cys Ala
 165 170 175

Ala Pro Gly Pro Ala Ser Ala Leu Phe Asn Asp Glu Ala Ser Asp Glu
 180 185 190

Ala Ser Leu Asn Ala Ala Val Glu Glu Thr Leu Lys Phe Ile Ala Asn
 195 200 205

Arg Asp Lys Val Ala Val Leu Val Gly Ser Lys Leu Arg Ala Ala Gly
 210 215 220

Ala Glu Glu Ala Ala Val Lys Phe Ala Asp Ala Leu Gly Gly Ala Val
 225 230 235 240

Ala Thr Met Ala Ala Ala Lys Ser Phe Phe Pro Glu Glu Asn Pro His
 245 250 255

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

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

Asp Tyr Ser Thr Thr Gly Trp Thr Asp Ile Pro Asp Pro Lys Lys Leu
 290 295 300

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

Ser Val His Leu Lys Asp Tyr Leu Thr Arg Leu Ala Gln Lys Val Ser
 325 330 335

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

Leu Lys Lys Ala Ala Pro Ala Asp Pro Ser Ala Pro Leu Val Asn Ala
 355 360 365

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

Ile Ala Glu Thr Gly Asp Ser Gln Phe Asn Ala Gln Arg Met Lys Leu
 385 390 395 400

ES 2 672 883 T3

Pro Asn Gly Ala Arg Val Glu Tyr Glu Met Gln Trp Gly His Ile Gly
 405 410 415

Trp Ser Val Pro Ala Ala Phe Gly Tyr Ala Val Gly Ala Pro Glu Arg
 420 425 430

Arg Asn Ile Leu Met Val Gly Asp Gly Ser Phe Gln Leu Thr Ala Gln
 435 440 445

Glu Val Ala Gln Met Val Arg Leu Lys Leu Pro Val Ile Ile Phe Leu
 450 455 460

Ile Asn Asn Tyr Gly Tyr Thr Ile Glu Val Met Ile His Asp Gly Pro
 465 470 475 480

Tyr Asn Asn Ile Lys Asn Trp Asp Tyr Ala Gly Leu Met Glu Val Phe
 485 490 495

Asn Gly Asn Gly Gly Tyr Asp Ser Gly Ala Gly Lys Gly Leu Lys Ala
 500 505 510

Lys Thr Gly Gly Glu Leu Ala Glu Ala Ile Lys Val Ala Leu Ala Asn
 515 520 525

Thr Asp Gly Pro Thr Leu Ile Glu Cys Phe Ile Gly Arg Glu Asp Cys
 530 535 540

Thr Glu Glu Leu Val Lys Trp Gly Lys Arg Val Ala Ala Ala Asn Ser
 545 550 555 560

Arg Lys Pro Val Asn Lys Leu Leu
 565

- <210> 191
- <211> 1707
- <212> ADN
- <213> Zymomonas mobilis

<400> 191
 atgagttata ctgtcgggtac ctatttagcg gagcggcttg tccagattgg tctcaagcat 60
 cacttcgcag tcgcggggcga ctacaacctc gtccttcttg acaacctgct tttgaacaaa 120
 aacatggagc aggtttattg ctgtaacgaa ctgaactgcg gtttcagtg cagaaggttat 180
 gctcgtgcca aaggcgcagc agcagccgtc gttacctaca gcgtcgggtgc gctttccgca 240
 tttgatgcta tcggtggcgc ctatgcagaa aaccttccgg ttatcctgat ctccggtgct 300
 ccgaacaaca atgatcacgc tgctgggtcac gtgttgcatc acgctcttgg caaaaccgac 360

5

10

ES 2 672 883 T3

tatcactatc agttggaat ggccaagaac atcacggccg ccgctgaagc gatttacacc 420
 ccggaagaag ctccggctaa aatcgatcac gtgattaaaa ctgctcttcg tgagaagaag 480
 ccggtttatc tcgaaatcgc ttgcaacatt gcttccatgc cctgcgccgc tcctggaccg 540
 gcaagcgcat tgttcaatga cgaagccagc gacgaagctt ctttgaatgc agcggttgaa 600
 gaaaccctga aattcatcgc caaccgcgac aaagttgccg tcctcgtcgg cagcaagctg 660
 cgcgcagctg gtgctgaaga agctgctgtc aaatttgctg atgctctcgg tggcgcagtt 720
 gctaccatgg ctgctgcaaa aagcttcttt ccagaagaaa acccgcatta catcggcacc 780
 tcatggggtg aagtcagcta tccgggctt gaaaagacga tgaaagaagc cgatgcggtt 840
 atcgctctgg ctctgtctt caacgactac tccaccactg gttggacgga tattcctgat 900
 cctaagaaac tggttctcgc tgaaccgcgt tctgtcgtcg ttaacggcat tcgcttcccc 960
 agcgtccatc tgaagacta tctgaccctg ttggctcaga aagtttcaa gaaaaccggt 1020
 gcattggact tcttcaaacc cctcaatgca ggtgaactga agaaagccgc tccggctgat 1080
 ccgagtgtctc cgttgggtcaa cgcagaaatc gcccgccaag tcgaagctct tctgaccccg 1140
 aacacgacgg ttattgctga aaccggtgac tctttattca atgcgacagc catgaagctc 1200
 ccgaaccggtg ctccggttga atatgaaatg cagtggggtc acattgggtg gtccgttctc 1260
 gccgccttcg gttatgccgt cgggtgctccg gaacgtcgca acatcctcat ggttggtgat 1320
 ggttctcttc agctgacggc tcaggaagtc gctcagatgg ttgcctgaa actgccggtt 1380
 atcatcttct tgatcaataa ctatggttac accatcgaag ttatgatcca tgatggtccg 1440
 tacaacaaca tcaagaactg ggattatgcc ggtctgatgg aagtgttcaa cggtaaccgtt 1500
 ggttatgaca gcggtgctgg taaaggcctg aaggctaaaa ccggtggcga actggcagaa 1560
 gctatcaagg ttgctctggc aaacaccgac ggcccaacc tgatcgaatg ctcatcgggt 1620
 cgtgaagact gcactgaaga attgggtcaa tgggtaagc gcgttgctgc cgccaacagc 1680
 cgtaagcctg ttaacaagct cctctag 1707

<210> 192

<211> 568

5 <212> PRT

<213> Zymomonas mobilis

<400> 192

Met Ser Tyr Thr Val Gly Thr Tyr Leu Ala Glu Arg Leu Val Gln Ile
 1 5 10 15

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

Leu Asp Asn Leu Leu Leu Asn Lys Asn Met Glu Gln Val Tyr Cys Cys

10

ES 2 672 883 T3

Asp Tyr Ser Thr Thr Gly Trp Thr Asp Ile Pro Asp Pro Lys Lys Leu
 290 295 300
 Val Leu Ala Glu Pro Arg Ser Val Val Val Asn Gly Ile Arg Phe Pro
 305 310 315 320
 Ser Val His Leu Lys Asp Tyr Leu Thr Arg Leu Ala Gln Lys Val Ser
 325 330 335
 Lys Lys Thr Gly Ala Leu Asp Phe Phe Lys Ser Leu Asn Ala Gly Glu
 340 345 350
 Leu Lys Lys Ala Ala Pro Ala Asp Pro Ser Ala Pro Leu Val Asn Ala
 355 360 365
 Glu Ile Ala Arg Gln Val Glu Ala Leu Leu Thr Pro Asn Thr Thr Val
 370 375 380
 Ile Ala Glu Thr Gly Asp Ser Leu Phe Asn Ala Gln Arg Met Lys Leu
 385 390 395 400
 Pro Asn Gly Ala Arg Val Glu Tyr Glu Met Gln Trp Gly His Ile Gly
 405 410 415
 Trp Ser Val Pro Ala Ala Phe Gly Tyr Ala Val Gly Ala Pro Glu Arg
 420 425 430
 Arg Asn Ile Leu Met Val Gly Asp Gly Ser Phe Gln Leu Thr Ala Gln
 435 440 445
 Glu Val Ala Gln Met Val Arg Leu Lys Leu Pro Val Ile Ile Phe Leu
 450 455 460
 Ile Asn Asn Tyr Gly Tyr Thr Ile Glu Val Met Ile His Asp Gly Pro
 465 470 475 480
 Tyr Asn Asn Ile Lys Asn Trp Asp Tyr Ala Gly Leu Met Glu Val Phe
 485 490 495
 Asn Gly Asn Gly Gly Tyr Asp Ser Gly Ala Gly Lys Gly Leu Lys Ala
 500 505 510
 Lys Thr Gly Gly Glu Leu Ala Glu Ala Ile Lys Val Ala Leu Ala Asn
 515 520 525
 Thr Asp Gly Pro Thr Leu Ile Glu Cys Phe Ile Gly Arg Glu Asp Cys
 530 535 540
 Thr Glu Glu Leu Val Lys Trp Gly Lys Arg Val Ala Ala Ala Asn Ser
 545 550 555 560
 Arg Lys Pro Val Asn Lys Leu Leu
 565

5 <210> 193
 <211> 1707
 <212> ADN

<213> Zymomonas mobilis

<400> 193

```

atgagttata ctgtcggtag ctathtagcg gagcggcttg tccagattgg tctcaagcat      60
cacttcgcag tcgcgggcga ctacaacctc gtccttcttg acaacctgct tttgaacaaa      120
aacatggagc aggtttattg ctgtaacgaa ctgaaactgc gtttcagtgc agaaggttat      180
gctcgtgccca aaggcgcagc agcagccgtc gttacctaca gcgtcgggtgc gctttccgca      240
tttgatgcta tcggtggcgc ctatgcagaa aaccttccgg ttatcctgat ctccggtgct      300
ccgaacaaca atgatcacgc tgctggtcac gtgttgcatc acgctcttgg caaaaccgac      360
tatcactatc agttggaaat ggccaagaac atcacggccg ccgctgaagc gatttacacc      420
ccggaagaag ctccggctaa aatcgatcac gtgattaaaa ctgctcttcg tgagaagaag      480
ccggtttatc tcgaaatcgc ttgcaacatt gcttccatgc cctgcgccgc tcctggaccg      540
gcaagcgcac tgttcaatga cgaagccagc gacgaagctt ctttgaatgc agcggttgaa      600
gaaaccctga aattcatcgc caaccgcgac aaagttgccg tcctcgtcgg cagcaagctg      660
cgcgcagctg gtgctgaaga agctgctgtc aaatttgctg atgctctcgg tggcgcagtt      720
gctaccatgg ctgctgcaaa aagcttcttt ccagaagaaa acccgcatta catcggcacc      780
tcatggggtg aagtcagcta tccgggcggt gaaaagacga tgaaagaagc cgatgcggtt      840
atcgctctgg ctctgtctt caacgactac tccaccactg gttggacgga tattcctgat      900
cctaagaaac tggttctcgc tgaaccgcgt tctgtcgtcg ttaacggcat tcgcttcccc      960
agcgtccatc tgaagacta tctgaccctg ttggctcaga aagtttccaa gaaaaccggt      1020
gcattggact tcttcaaadc cctcaatgca ggtgaaactg agaaagccgc tccggtgat      1080
ccgagtgctc cgttgggtcaa cgcagaaatc gcccgccaag tcgaagctct tctgaccccg      1140
aacacgacgg ttattgctga aaccggtgac tcttggttca atgctcagcg catgaagctc      1200
ccgaacggtg ctgcggttga atatgaaatg cagtggaaac acattgggtg gtcggtacct      1260
gccgccttgc gttatgccgt cgggtgctccg gaacgtcgca acatcctcat ggttggtgat      1320
ggttccttcc agctgacggc tcaggaagtc gctcagatgg ttgcgctgaa actgccggtt      1380
atcatcttct tgatcaataa ctatggttac accatcgaag ttatgatcca tgatggtccg      1440
5 tacaacaaca tcaagaactg ggattatgcc ggtctgatgg aagtgttcaa cggtaaccggt      1500
ggttatgaca gcggtgctgg taaaggcctg aaggctaaaa ccggtggcga actggcagaa      1560
gctatcaagg ttgctctggc aaacaccgac ggcccaacc tcgatcgaatg ctcatcgggt      1620
cgtgaagact gcactgaaga attggtcaaa tggggtaagc gcggtgctgc cgccaacagc      1680
cgtaagcctg ttaacaaget cctctag      1707

```

<210> 194

<211> 568

<212> PRT

<213> Zymomonas mobilis

<400> 194

10

ES 2 672 883 T3

Met Ser Tyr Thr Val Gly Thr Tyr Leu Ala Glu Arg Leu Val Gln Ile
 1 5 10 15

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

Leu Asp Asn Leu Leu Leu Asn Lys Asn Met Glu Gln Val Tyr Cys Cys
 35 40 45

Asn Glu Leu Asn Cys Gly Phe Ser Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ala Lys
 50 55 60

Gly Ala Ala Ala Ala Val Val Thr Tyr Ser Val Gly Ala Leu Ser Ala
 65 70 75 80

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

Ile Ser Gly Ala Pro Asn Asn Asn Asp His Ala Ala Gly His Val Leu
 100 105 110

His His Ala Leu Gly Lys Thr Asp Tyr His Tyr Gln Leu Glu Met Ala
 115 120 125

Lys Asn Ile Thr Ala Ala Ala Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu Glu Ala
 130 135 140

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

Pro Val Tyr Leu Glu Ile Ala Cys Asn Ile Ala Ser Met Pro Cys Ala
 165 170 175

Ala Pro Gly Pro Ala Ser Ala Leu Phe Asn Asp Glu Ala Ser Asp Glu

ES 2 672 883 T3

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

ES 2 672 883 T3

Arg Asn Ile Leu Met Val Gly Asp Gly Ser Phe Gln Leu Thr Ala Gln
 435 440 445

Glu Val Ala Gln Met Val Arg Leu Lys Leu Pro Val Ile Ile Phe Leu
 450 455 460

Ile Asn Asn Tyr Gly Tyr Thr Ile Glu Val Met Ile His Asp Gly Pro
 465 470 475 480

Tyr Asn Asn Ile Lys Asn Trp Asp Tyr Ala Gly Leu Met Glu Val Phe
 485 490 495

Asn Gly Asn Gly Gly Tyr Asp Ser Gly Ala Gly Lys Gly Leu Lys Ala
 500 505 510

Lys Thr Gly Gly Glu Leu Ala Glu Ala Ile Lys Val Ala Leu Ala Asn
 515 520 525

Thr Asp Gly Pro Thr Leu Ile Glu Cys Phe Ile Gly Arg Glu Asp Cys
 530 535 540

Thr Glu Glu Leu Val Lys Trp Gly Lys Arg Val Ala Ala Ala Asn Ser
 545 550 555 560

Arg Lys Pro Val Asn Lys Leu Leu
 565

<210> 195

<211> 1644

5 <212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 195

atgtataccg ttggggatta tctgctggat cgcttgcattg agttaggcat tgaagaaatt 60
 ttcggcgtac ctggtgacta taatctccag tttcttgatc agatcatctc acgcgaagat 120
 atgaaatgga ttggtaatgc caatgaactg aatgccagct atatggctga cggttatgcg 180
 cgtactaaga aagcggcagc ctttctgacg acctttggcg taggcgagtt aagcgccatt 240
 aacggactcg ctggctccta tgctgagaac ttgccggtag tcgaaatcgt gggctctcca 300
 acgtccaaag taaaaatga cggaaaattc gtgcatcata ccctcgcgga tgggtgacttt 360
 aaacacttta tgaaaatgca tgaaccggta acagccggcg gtaccctgct gactgcggag 420
 aatgcgacct acgaaattga tcgctgttta agccagctgt taaaagaacg caaacccgtc 480
 tacatcaatc tgctgtttga tgtagcagcc gctaaagctg agaaaccggc gcttagtctg 540
 gaaaaggagt cgagcaccac caatacgacc gaacaagtga ttctgtcaa aattgaagaa 600
 tccttaaaa acgcacagaa accggtggtt attgccgggc atgaagtgat tagctttggg 660

10

ES 2 672 883 T3

ttggagaaaa cagtcactca gttcgtcagt gaaaccaaat tgccgattac cacgctgaac 720
 tttggttaaga gcgcggttga cgagagcttg ccatcgttcc tggggatcta caacggttaag 780
 ctgtctgaaa tttcgtgtaa gaactttgtg gaatcagcgg atttcatttt gatgctgggt 840
 gtgaaactca cggattcttc gactggggca tttaccacc atctggacga aaacaaaatg 900
 atcagcttga acatcgacga gggcattatc ttcaacaagg tggtcgaaga tttcgatfff 960
 cgtgcagtgg tgtccagtct ctoggaactg aagggtattg aatatgaggg tcagtacatc 1020
 gataaacagt atgaagagtt catcccgta tctgcccctc tgagccaaga ccgcctttgg 1080
 caggcagtgg aaagcctcac acagtccaat gaaacgatcg ttgcagaaca aggtactagt 1140
 ttctttggcg caagcacgat cttcctgaaa tcgaactcac ggttcatcgg acaaccgctg 1200
 tggtcagta ttgggtatac gtttccagcg gcgttaggat cacagattgc ggataaggaa 1260
 agtcgtcacc tgttattcat tggcgtggt tctcttcaac ttacggtcca ggaactgggc 1320
 ctgtccattc gcgagaaact gaacccgatt tgctttatca tcaacaatga cggctacaca 1380
 gtggagcgg aaattcacgg cccgaccag agttacaatg acattcccat gtggaactac 1440
 agcaaattac cagaaacctt tggtgccaca gaagatcgtg ttgtctctaa aatcgtgctc 1500
 actgagaacg aatttgtttc ggttatgaaa gaagcgcaag cggatgtgaa tcggatgtat 1560
 tggattgaac tggctctgga gaaagaagat gccccgaaac tgctgaagaa aatgggcaaa 1620
 ctgtttgctg aacagaacaa ataa 1644

<210> 196
 <211> 547
 5 <212> PRT
 <213> Lactococcus lactis

<400> 196
 Met Tyr Thr Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Arg Leu His Glu Leu Gly
 1 5 10 15
 Ile Glu Glu Ile Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu Gln Phe Leu
 20 25 30
 Asp Gln Ile Ile Ser Arg Glu Asp Met Lys Trp Ile Gly Asn Ala Asn
 35 40 45
 Glu Leu Asn Ala Ser Tyr Met Ala Asp Gly Tyr Ala Arg Thr Lys Lys
 50 55 60
 Ala Ala Ala Phe Leu Thr Thr Phe Gly Val Gly Glu Leu Ser Ala Ile
 65 70 75 80

10

ES 2 672 883 T3

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

Val Gly Ser Pro Thr Ser Lys Val Gln Asn Asp Gly Lys Phe Val His
100 105 110

His Thr Leu Ala Asp Gly Asp Phe Lys His Phe Met Lys Met His Glu
115 120 125

Pro Val Thr Ala Ala Arg Thr Leu Leu Thr Ala Glu Asn Ala Thr Tyr
130 135 140

Glu Ile Asp Arg Val Leu Ser Gln Leu Leu Lys Glu Arg Lys Pro Val
145 150 155 160

Tyr Ile Asn Leu Pro Val Asp Val Ala Ala Ala Lys Ala Glu Lys Pro
165 170 175

Ala Leu Ser Leu Glu Lys Glu Ser Ser Thr Thr Asn Thr Thr Glu Gln
180 185 190

Val Ile Leu Ser Lys Ile Glu Glu Ser Leu Lys Asn Ala Gln Lys Pro
195 200 205

Val Val Ile Ala Gly His Glu Val Ile Ser Phe Gly Leu Glu Lys Thr
210 215 220

Val Thr Gln Phe Val Ser Glu Thr Lys Leu Pro Ile Thr Thr Leu Asn
225 230 235 240

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

Tyr Asn Gly Lys Leu Ser Glu Ile Ser Leu Lys Asn Phe Val Glu Ser
260 265 270

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

Gly Ala Phe Thr His His Leu Asp Glu Asn Lys Met Ile Ser Leu Asn
290 295 300

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

Arg Ala Val Val Ser Ser Leu Ser Glu Leu Lys Gly Ile Glu Tyr Glu
325 330 335

ES 2 672 883 T3

Gly Gln Tyr Ile Asp Lys Gln Tyr Glu Glu Phe Ile Pro Ser Ser Ala
340 345 350

Pro Leu Ser Gln Asp Arg Leu Trp Gln Ala Val Glu Ser Leu Thr Gln
355 360 365

Ser Asn Glu Thr Ile Val Ala Glu Gln Gly Thr Ser Phe Phe Gly Ala
370 375 380

Ser Thr Ile Phe Leu Lys Ser Asn Ser Arg Phe Ile Gly Gln Pro Leu
385 390 395 400

Trp Ser Ser Ile Gly Tyr Thr Phe Pro Ala Ala Leu Gly Ser Gln Ile
405 410 415

Ala Asp Lys Glu Ser Arg His Leu Leu Phe Ile Gly Asp Gly Ser Leu
420 425 430

Gln Leu Thr Val Gln Glu Leu Gly Leu Ser Ile Arg Glu Lys Leu Asn
435 440 445

Pro Ile Cys Phe Ile Ile Asn Asn Asp Gly Tyr Thr Val Glu Arg Glu
450 455 460

Ile His Gly Pro Thr Gln Ser Tyr Asn Asp Ile Pro Met Trp Asn Tyr
465 470 475 480

Ser Lys Leu Pro Glu Thr Phe Gly Ala Thr Glu Asp Arg Val Val Ser
485 490 495

Lys Ile Val Arg Thr Glu Asn Glu Phe Val Ser Val Met Lys Glu Ala
500 505 510

Gln Ala Asp Val Asn Arg Met Tyr Trp Ile Glu Leu Val Leu Glu Lys
515 520 525

Glu Asp Ala Pro Lys Leu Leu Lys Lys Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu
530 535 540

Gln Asn Lys
545

<210> 197

<211> 1644

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

5

<400> 197

ES 2 672 883 T3

atgtataccg ttggggatta tctgctggat cgcttgcacg agttaggcat tgaagaaatt 60
 ttcggcgtac ctggtgacta taatctccag tttcttgatc agatcatctc acgcgaagat 120
 atgaaatgga ttggtaatgc caatgaactg aatgccagct atatggctga cggttatgcg 180
 cgtactaaga aagcggcagc ctttctgacg acctttggcg taggcgagtt aagcgcatt 240
 aacggactcg ctggctccta tgctgagaac ttgccggtag tcgaaatcgt gggctctcca 300
 acgtccaaag tacaaaatga cggaaaattc gtgcatcata ccctcgcgga tggtgacttt 360
 aaacacttta tgaaaatgca tgaaccggta acagccgccc gtaccctgct gactgaggag 420
 aatgocgacct acgaaattga tcgctgttta agccagctgt taaaagaacg caaacccgtc 480
 tacatcaatc tgctgttga tgtagcagcc gctaaagctg agaaaccggc gcttagtctg 540
 gaaaaggagt cgagcaccac caatacgacc gaacaagtga ttctgtcca aattgaagaa 600
 tcccttaaaa acgcacagaa accgggtggt attgccgggc atgaagtgat tagctttggg 660
 ttggagaaaa cgtcactca gttcgtcagt gaaaccaa atgccgattac cacgctgaac 720
 tttgtaaga ggcggttga cgagagcttg ccatcgttcc tggggatcta caacgtaag 780
 ctgtctgaaa ttcgctgaa gaactttgtg gaatcagcgg atttcatttt gatgctgggt 840
 gtgaaactca cggattcttc gactggggca tttaccacc atctggacga aaacaaaatg 900
 atcagcttga acatcgacga gggcattatc ttcaacaagg tggtcgaaga tttcgatttt 960
 cgtgcagtgg tgtccagtct ctcggaactg aagggtattg aatatgaggg tcagtacatc 1020
 gataaacagt atgaagagtt catcccgta tctgccctc tgagccaaga ccgcctttgg 1080
 caggcagtgg aaagcctcac acagtccaat gaaacgatcg ttgcagaaca aggtactagt 1140
 ttccttggcg caagcacgat ctctctgaaa tcgaaactcac ggttcacgga acaaccgctg 1200
 tggggcagta ttggctatac gtttccagcg gcgttaggat cacagattgc ggataaggaa 1260
 agtcgtcacc tgttattcat tggcgatggt tctcttcaac ttacggcca ggaactgggc 1320
 ctgtccattc gcgagaaact gaaccgatt tgctttatca ttaataatga cggctacaca 1380
 atcgagcggc aaattcacgg cccgaccag agttacaatg acattcccat gtggaactac 1440
 agcaaattac cagaaacctt tggtgccaca gaagatcgtg ttgtctctaa aatcgtgccc 1500
 actgagaacg aatttgtttc gggtatgaaa gaagcgaag cggatgtgaa tcggatgtat 1560
 tggattgaac tggctcctgga gaaagaagat gccccgaaac tgctgaagaa aatgggcaaa 1620
 ctgtttgctg aacagaacaa ataa 1644

<210> 198
 <211> 547
 <212> PRT
 <213> Lactococcus lactis

 <400> 198

5

ES 2 672 883 T3

Met Tyr Thr Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Arg Leu His Glu Leu Gly
1 5 10 15

Ile Glu Glu Ile Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu Gln Phe Leu
20 25 30

Asp Gln Ile Ile Ser Arg Glu Asp Met Lys Trp Ile Gly Asn Ala Asn
35 40 45

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

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

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

Val Gly Ser Pro Thr Ser Lys Val Gln Asn Asp Gly Lys Phe Val His
100 105 110

His Thr Leu Ala Asp Gly Asp Phe Lys His Phe Met Lys Met His Glu
115 120 125

Pro Val Thr Ala Ala Arg Thr Leu Leu Thr Ala Glu Asn Ala Thr Tyr
130 135 140

Glu Ile Asp Arg Val Leu Ser Gln Leu Leu Lys Glu Arg Lys Pro Val
145 150 155 160

Tyr Ile Asn Leu Pro Val Asp Val Ala Ala Ala Lys Ala Glu Lys Pro
165 170 175

Ala Leu Ser Leu Glu Lys Glu Ser Ser Thr Thr Asn Thr Thr Glu Gln
180 185 190

Val Ile Leu Ser Lys Ile Glu Glu Ser Leu Lys Asn Ala Gln Lys Pro
195 200 205

Val Val Ile Ala Gly His Glu Val Ile Ser Phe Gly Leu Glu Lys Thr
210 215 220

Val Thr Gln Phe Val Ser Glu Thr Lys Leu Pro Ile Thr Thr Leu Asn
225 230 235 240

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

ES 2 672 883 T3

Tyr Asn Gly Lys Leu Ser Glu Ile Ser Leu Lys Asn Phe Val Glu Ser
 260 265 270
 Ala Asp Phe Ile Leu Met Leu Gly Val Lys Leu Thr Asp Ser Ser Thr
 275 280 285
 Gly Ala Phe Thr His His Leu Asp Glu Asn Lys Met Ile Ser Leu Asn
 290 295 300
 Ile Asp Glu Gly Ile Ile Phe Asn Lys Val Val Glu Asp Phe Asp Phe
 305 310 315 320
 Arg Ala Val Val Ser Ser Leu Ser Glu Leu Lys Gly Ile Glu Tyr Glu
 325 330 335
 Gly Gln Tyr Ile Asp Lys Gln Tyr Glu Glu Phe Ile Pro Ser Ser Ala
 340 345 350
 Pro Leu Ser Gln Asp Arg Leu Trp Gln Ala Val Glu Ser Leu Thr Gln
 355 360 365
 Ser Asn Glu Thr Ile Val Ala Glu Gln Gly Thr Ser Phe Phe Gly Ala
 370 375 380
 Ser Thr Ile Phe Leu Lys Ser Asn Ser Arg Phe Ile Gly Gln Pro Leu
 385 390 395 400
 Trp Gly Ser Ile Gly Tyr Thr Phe Pro Ala Ala Leu Gly Ser Gln Ile
 405 410 415
 Ala Asp Lys Glu Ser Arg His Leu Leu Phe Ile Gly Asp Gly Ser Leu
 420 425 430
 Gln Leu Thr Val Gln Glu Leu Gly Leu Ser Ile Arg Glu Lys Leu Asn
 435 440 445
 Pro Ile Cys Phe Ile Ile Asn Asn Asp Gly Tyr Thr Ile Glu Arg Glu
 450 455 460
 Ile His Gly Pro Thr Gln Ser Tyr Asn Asp Ile Pro Met Trp Asn Tyr
 465 470 475 480
 Ser Lys Leu Pro Glu Thr Phe Gly Ala Thr Glu Asp Arg Val Val Ser
 485 490 495
 Lys Ile Val Arg Thr Glu Asn Glu Phe Val Ser Val Met Lys Glu Ala

ES 2 672 883 T3

	500		505		510	
	Gln Ala Asp Val Asn Arg Met Tyr Trp Ile Glu Leu Val Leu Glu Lys					
	515		520		525	
	Glu Asp Ala Pro Lys Leu Leu Lys Lys Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu					
	530		535		540	
	Gln Asn Lys					
	545					
	<210> 199					
	<211> 34					
5	<212> ADN					
	<213> Secuencia artificial					
	<220>					
	<223> Cebador de amplificación					
10	<400> 199					
	tatcgtgcta gcatgaacaa ctftaatctg caca		34			
	<210> 200					
15	<211> 46					
	<212> ADN					
	<213> Secuencia artificial					
	<220>					
20	<223> Cebador de amplificación					
	<400> 200					
	tataatgaat tcttagcggg cggcttcgta tatacggcgg ctgaca		46			
25	<210> 201					
	<211> 67					
	<212> ADN					
	<213> Secuencia artificial					
30	<220>					
	<223> Cebador de amplificación					
	<400> 201					
35	tataatgagc tcttactt taagaaggag atatacatg aacaactta atctgcacac		60			
	ccaacc 67					
	<210> 202					
	<211> 30					
	<212> ADN					
40	<213> Secuencia artificial					
	<220>					
	<223> Cebador de amplificación					
45	<400> 202					
	tataatggat ccttagcggg cggcttcgta		30			
	<210> 203					
	<211> 52					
50	<212> ADN					
	<213> Secuencia artificial					
	<220>					
	<223> Cebador de amplificación					
55						

<400> 203
gcccgcctaag gatcctctag ggaggtctag aatgaaagtc gcagtcctcg gc 52

5 <210> 204
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador de amplificación

<400> 204
cgagcctcct tacttattaa cgaactcttc gcc 33

15 <210> 205
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador de amplificación

<400> 205
catagggagg ctcgagatgt ataccgttgg ggattatctg 40

25 <210> 206
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador de amplificación

<400> 206
cgccaaaaca gaagcttgac gtccctagagg agcttgtaa caggctt 47

35 <210> 207
<211> 1692
<212> ADN
40 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 207
atgtctgaaa ttactttggg taaatatttg ttcgaaagat taaagcaagt caacgttaac 60
accgttttcg gtttgccagg tgacttcaac ttgtccttgt tggacaagat ctacgaagtt 120
gaaggatga gatgggctgg taacgccaac gaattgaacg ctgcttacgc cgctgatggt 180
tacgctcgta tcaagggat gtcttgatc atcaccacct tcggtgctcg tgaattgtct 240

ES 2 672 883 T3

gctttgaacg gtattgccgg ttcttacgct gaacacgctg gtgttttgca cgttggtggt 300
 gtcccatcca tctctgctca agctaagcaa ttgttggtgc accacacctt gggtaacggt 360
 gacttcaactg ttttccacag aatgtctgcc aacatthctg aaaccactgc tatgatcaact 420
 gacattgcta cgcgccacg tgaattgac agatgtatca gaaccactta cgtcacccaa 480
 agaccagtct acttaggtht gccagctaac ttggtcgaact tgaacgtccc agctaagttg 540
 ttgcaaaactc caattgacat gtctttgaag ccaaacgatg ctgaatccga aaaggaagtc 600
 attgacacca tcttggtctt ggtcaaggat gctaagaacc cagttatctt ggctgatgct 660
 tgttggtcca gacacgacgt caaggctgaa actaagaagt tgattgactt gactcaattc 720
 ccagctttcg tcaccccaat gggtaagggt tccattgacg aacaacacc aagatacgggt 780
 ggtgthtacg tcggtacctt gtccaagcca gaagthaagg aagccgttga atctgctgac 840
 ttgattttgt ctgtcgggtc thtthtctt gattthaaca cggthtctt ctcttactct 900
 tacaagacca agaacattgt cgaattccac tccgaccaca tgaagatcag aaacgccact 960
 ttcccagggtg tccaaatgaa atctgthttg caaaagtht tgaacctat tgctgacgcc 1020
 gctaagggtt acaagccagt tgctgtccca gctagaactc cagthaacgc tgctgtccca 1080
 gcttctacc cattgaagca agaathgatg tggaaccaat tgggthaactt cthgcaagaa 1140
 ggtgatgtht tcattgctga aaccggtacc tccgctthtc gtatcaacca aaccactthc 1200
 ccaaacaaca cctacggtat ctctcaagtc thtthgggtt ccattggtht caccactggt 1260
 gctaccttg gtgctgctth cgtgctgaa gaaathgatc caaagaagag agthtctta 1320
 thcattggtg acgthtctt gcaathgact gthcaagaaa thtccacct gatcagatgg 1380
 ggctthgaagc catacttht cgtctthaac aacgatgtht acaccattga aaagthgatt 1440
 cacggtccaa aggtcaata caacgaaatt caagthtggg accacctatc cthgthgcca 1500
 actthcgggtg ctaaggacta tgaacccac agagthcgtc ccaccggtga atgggacaag 1560
 thgacccaag acaagthctt caacgacaac thtaagatca gaathgattga aatcatgtht 1620
 ccagthctcg atgctccaca aaactthgtht gaacaagct aghthgactgc thgctaccaac 1680
 gctaagcaat aa 1692

<210> 208
 <211> 563
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 208
 Met Ser Glu Ile Thr Leu Gly Lys Tyr Leu Phe Glu Arg Leu Lys Gln
 1 5 10 15

5

10

ES 2 672 883 T3

Val Asn Val Asn Thr Val Phe Gly Leu Pro Gly Asp Phe Asn Leu Ser
 20 25 30

Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Glu Val Glu Gly Met Arg Trp Ala Gly Asn
 35 40 45

Ala Asn Glu Leu Asn Ala Ala Tyr Ala Ala Asp Gly Tyr Ala Arg Ile
 50 55 60

Lys Gly Met Ser Cys Ile Ile Thr Thr Phe Gly Val Gly Glu Leu Ser
 65 70 75 80

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

His Val Val Gly Val Pro Ser Ile Ser Ala Gln Ala Lys Gln Leu Leu
 100 105 110

Leu His His Thr Leu Gly Asn Gly Asp Phe Thr Val Phe His Arg Met
 115 120 125

Ser Ala Asn Ile Ser Glu Thr Thr Ala Met Ile Thr Asp Ile Ala Thr
 130 135 140

Ala Pro Ala Glu Ile Asp Arg Cys Ile Arg Thr Thr Tyr Val Thr Gln
 145 150 155 160

Arg Pro Val Tyr Leu Gly Leu Pro Ala Asn Leu Val Asp Leu Asn Val
 165 170 175

Pro Ala Lys Leu Leu Gln Thr Pro Ile Asp Met Ser Leu Lys Pro Asn
 180 185 190

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

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

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

Pro Ala Phe Val Thr Pro Met Gly Lys Gly Ser Ile Asp Glu Gln His
 245 250 255

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

ES 2 672 883 T3

Lys Glu Ala Val Glu Ser Ala Asp Leu Ile Leu Ser Val Gly Ala Leu
 275 280 285
 Leu Ser Asp Phe Asn Thr Gly Ser Phe Ser Tyr Ser Tyr Lys Thr Lys
 290 295 300
 Asn Ile Val Glu Phe His Ser Asp His Met Lys Ile Arg Asn Ala Thr
 305 310 315 320
 Phe Pro Gly Val Gln Met Lys Phe Val Leu Gln Lys Leu Leu Thr Thr
 325 330 335
 Ile Ala Asp Ala Ala Lys Gly Tyr Lys Pro Val Ala Val Pro Ala Arg
 340 345 350
 Thr Pro Ala Asn Ala Ala Val Pro Ala Ser Thr Pro Leu Lys Gln Glu
 355 360 365
 Trp Met Trp Asn Gln Leu Gly Asn Phe Leu Gln Glu Gly Asp Val Val
 370 375 380
 Ile Ala Glu Thr Gly Thr Ser Ala Phe Gly Ile Asn Gln Thr Thr Phe
 385 390 395 400
 Pro Asn Asn Thr Tyr Gly Ile Ser Gln Val Leu Trp Gly Ser Ile Gly
 405 410 415
 Phe Thr Thr Gly Ala Thr Leu Gly Ala Ala Phe Ala Ala Glu Glu Ile
 420 425 430
 Asp Pro Lys Lys Arg Val Ile Leu Phe Ile Gly Asp Gly Ser Leu Gln
 435 440 445
 Leu Thr Val Gln Glu Ile Ser Thr Met Ile Arg Trp Gly Leu Lys Pro
 450 455 460
 Tyr Leu Phe Val Leu Asn Asn Asp Gly Tyr Thr Ile Glu Lys Leu Ile
 465 470 475 480
 His Gly Pro Lys Ala Gln Tyr Asn Glu Ile Gln Gly Trp Asp His Leu
 485 490 495
 Ser Leu Leu Pro Thr Phe Gly Ala Lys Asp Tyr Glu Thr His Arg Val
 500 505 510
 Ala Thr Thr Gly Glu Trp Asp Lys Leu Thr Gln Asp Lys Ser Phe Asn
 515 520 525
 Asp Asn Ser Lys Ile Arg Met Ile Glu Ile Met Leu Pro Val Phe Asp
 530 535 540
 Ala Pro Gln Asn Leu Val Glu Gln Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Asn
 545 550 555 560
 Ala Lys Gln

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo modificado para la producción de 1,3-propanodiol (PDO) a partir de un sustrato de carbono en el que el microorganismo comprende:
- 5
- una ruta para la síntesis de 2,4-dihidroxi-butirato (DHB) a partir de malato, y
 - una ruta metabólica de tres etapas que comprende las etapas siguientes:
- 10
- una primera etapa de convertir el DHB para obtener 2-oxo-4-hidroxi-butirato (OHB) mediante un enzima que presenta una actividad de 2,4-DHB deshidrogenasa, y
 - una segunda etapa de descarboxilar el OHB para obtener 3-hidroxi-propionaldehído mediante un enzima que presenta una actividad de 2-oxo-4-hidroxi-butirato descarboxilasa, y
- 15
- una tercera etapa de reducir el 3-hidroxi-propionaldehído obtenido para obtener el PDO con un enzima que presenta una actividad de 3-hidroxi-propionaldehído reductasa.
2. Microorganismo modificado según la reivindicación 1, en el que el microorganismo ha sido modificado además mediante la introducción de genes que codifican:
- 20
- una malato cinasa que cataliza la transformación del malato en 4-fosfo-malato,
 - una malato semialdehído deshidrogenasa que cataliza la transformación del 4-fosfo-malato en malato-4-semialdehído,
- 25
- una malato semialdehído reductasa que cataliza la transformación del malato-4-semialdehído en 2,4-DHB.
3. Microorganismo según la reivindicación 1 o 2, en el que los enzimas son codificados por un gen endógeno o heterólogo.
- 30
4. Organismo modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el enzima que presenta una actividad de 2,4-DHB deshidrogenasa se selecciona de entre enzimas que presentan una actividad de lactato deshidrogenasa o de malato deshidrogenasa.
- 35
5. Organismo modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el enzima que presenta una actividad de 2,4-DHB deshidrogenasa se obtiene mediante por lo menos una mutación de dicho enzima, mejorando dicha mutación la actividad y/o la afinidad de sustrato del enzima mutado para DHB.
- 40
6. Organismo modificado según la reivindicación 4 o 5, en el que el enzima es un producto génico codificado por genes seleccionados de entre *ldhA* de *Lactococcus lactis*, *lldD* de *Escherichia coli*, *lldD* de *E. coli* que porta una mutación en la posición V108 (en referencia a la SEC ID nº 122), *mdh* de *E. coli* o de *Bacillus subtilis*, o *mdh* de *E. coli* que porta mutaciones en por lo menos una de las posiciones siguientes (en referencia a la SEC ID nº 124): Ile12, Arg81, Lys82, Met85, Asp86, Val93, Ile117, Gly179, Thr211 o Met227 (en referencia a la SEC ID nº 126).
- 45
7. Organismo modificado según la reivindicación 6, en el que el enzima es
- codificado por un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que comprende SEC ID nº 119, SEC ID nº 121, SEC ID nº 153, SEC ID nº 155, SEC ID nº 157, SEC ID nº 159, SEC ID nº 161, SEC ID nº 163, SEC ID nº 165, SEC ID nº 167, SEC ID nº 169, SEC ID nº 171 o SEC ID nº 173 o cualquier secuencia que comparte una homología de por lo menos 50% con dichas secuencias,
 - un polipéptido seleccionado de entre el grupo que comprende SEC ID nº 120, SEC ID nº 122, SEC ID nº 154, SEC ID nº 156, SEC ID nº 158, SEC ID nº 160, SEC ID nº 162, SEC ID nº 164, SEC ID nº 166, SEC ID nº 168, SEC ID nº 170, SEC ID nº 172 o SEC ID nº 174 o cualquier secuencia que comparte una homología de por lo menos 50% con dichas secuencias.
- 50
- 55
8. Organismo modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el enzima que presenta una actividad de 2-oxo-4-hidroxi-butirato descarboxilasa es un enzima que presenta una actividad de 2-cetoácido descarboxilasa.
- 60
9. Organismo modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el enzima que presenta una actividad de 2-oxo-4-hidroxi-butirato descarboxilasa se obtiene mediante por lo menos una mutación de dicho enzima, mejorando dicha mutación la actividad y/o la afinidad de sustrato del enzima mutado para OHB.
- 65

10. Organismo modificado según la reivindicación 8 o 9, en el que el enzima es un producto génico codificado por genes seleccionados de entre los genes *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10*, *THI3* de *Saccharomyces cerevisiae*, los genes *kivD*, *kdcA* de *Lactococcus lactis*, el gen *pdv* de *Clostridium acetobutylicum*, los genes *PDC2* y *PDC3* de *Arabidopsis thaliana*, los genes *PDC1*, *PDC2* y *ARO10* de *Pichia stipitis*, el gen *pdv* de *Zymomonas mobilis*, el gen *sucA* de *Escherichia coli*, el gen *dxs* de *Escherichia coli*, el gen *pdv* de *Z. mobilis* que porta una mutación en por lo menos una de las posiciones siguientes: Tyr290, Trp392, Gly413 o Ile476 (en referencia a la SEC ID nº 128), el gen *kdcA* de *L. lactis* que porta una mutación en por lo menos una de las posiciones siguientes: Gln377, Phe381, Phe382, Gly402, Val461, Ile465 o Phe542 (en referencia a la SEC ID nº 130).
11. Organismo modificado según la reivindicación 10, en el que el enzima es
- codificado por un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que comprende SEC ID nº 129, SEC ID nº 127, SEC ID nº 207, SEC ID nº 189, SEC ID nº 191, SEC ID nº 193, SEC ID nº 195 o SEC ID nº 197 o cualquier secuencia que comparte una homología de por lo menos 50% con dichas secuencias,
 - un polipéptido seleccionado de entre el grupo que comprende SEC ID nº 130, SEC ID nº 128, SEC ID nº 208, SEC ID nº 190, SEC ID nº 192, SEC ID nº 194, SEC ID nº 196 o SEC ID nº 198 o cualquier secuencia que comparte una homología de por lo menos 50% con dichas secuencias.
12. Organismo modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el enzima que presenta una actividad de 3-hidroxi propionaldehído reductasa se selecciona de entre enzimas que presentan una actividad de hidroxialdehído reductasa, una actividad de alcohol deshidrogenasa, una actividad de lactaldehído reductasa o una actividad de metilglioxal reductasa.
13. Organismo modificado según la reivindicación 12, en el que el enzima es un producto génico codificado por genes seleccionados de entre los genes *yqhD*, *fucO*, *dkgA*, *dkgB* de *Escherichia coli*, el gen *dhaT* de *K. pneumoniae*, o los genes *ADH1* y *ADH2* de *Saccharomyces cerevisiae* o un enzima que presenta una actividad de 3-hidroxi propionaldehído reductasa obtenido mediante por lo menos una mutación de dicho enzima, mejorando dicha mutación la actividad y/o la afinidad de sustrato del enzima mutado para 3-HPA.
14. Organismo modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la producción del PDO es aumentada.
15. Organismo modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que las actividades de 2,4-dihidroxi butirato deshidrogenasa, de 2-oxo-4-hidroxi butirato descarboxilasa y/o de 3-hidroxi propionaldehído reductasa y/o las actividades de enzimas que permiten la síntesis de DHB son aumentadas.
16. Microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es una bacteria, seleccionada preferentemente de entre *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomyetaceae*, *Streptococcaceae*, *Methylobacteriaceae*, y *Corynebacteriaceae*, más preferentemente *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Methylobacterium extorquens*, o *Lactococcus lactis*, una levadura seleccionada preferentemente de entre *Saccharomycetaceae*, *Pichiaceae*, y *Schizosaccharomycetaceae*, más preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia jadinii*, *Pichia stipitis*, o *Pichia pastoris* o un hongo seleccionado preferentemente de entre los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y más particularmente *Aspergillus flavus*, *Chrysosporium* o *Trichoderma*.
17. Microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la expresión de por lo menos una de las actividades enzimáticas seleccionadas de entre fosfoenolpiruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, isocitrato liasa, piruvato carboxilasa y permeasa simportadora de hexosa es aumentada, y/o por lo menos una de las actividades enzimáticas seleccionadas de entre lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, acetato cinasa, fosfato acetiltransferasa, piruvato oxidasa, isocitrato liasa, fumarasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa, piruvato cinasa, enzima málico, fosfoglucosa isomerasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, piruvato-formato liasa, semialdehído succínico deshidrogenasa, fosfotransferasa que transporta azúcares, cetohidroxi glutarato aldolasa, homoserina-O-succinil transferasa, homoserina cinasa, diaminopimelato descarboxilasa y/o metilglioxal sintasa es reducida.
18. Microorganismo según la reivindicación 16 o 17 que es *Escherichia coli* que sobreexpresa por lo menos uno de los genes seleccionados de entre *ppc*, *pck*, *aceA*, *galP*, *asd*, *thrA*, *metL*, *lysC*, todos de *E. coli*; *pycA* de *L. lactis*, y/o que presenta por lo menos uno de los genes eliminados seleccionados de entre *ldhA*, *adhE*, *ackA*, *pta*, *poxB*, *focA*, *pflB*, *sad*, *gabABC*, *sfcA*, *maeB*, *ppc*, *pykA*, *pykF*, *mgsA*, *sucAB*, *ptsI*, *ptsG*, *pgi*, *fumABC*, *aldA*, *lld*, *iclR*, *metA*, *thrB*, *lysA*, *eda*.
19. Procedimiento de producción de PDO que comprende las etapas de
- poner en contacto el microorganismo modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 con un

sustrato de carbono en un medio de cultivo apropiado,

- recuperar el PDO a partir del medio de cultivo.

5 20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que el PDO es purificado además.

21. Utilización según cualquiera de los enzimas que presentan una actividad de 2,4-dihidroxi-
butirato deshidrogenasa, de 2-oxo-4-hidroxi-
butirato descarboxilasa y de 3-hidroxi-
propionaldehído reductasa para
transformar el DHB en PDO.

10

22. Utilización según cualquiera de los enzimas que presentan una actividad de malato
cinasa, de malato
semialdehído deshidrogenasa, de malato
semialdehído reductasa, de 2,4-dihidroxi-
butirato deshidrogenasa, de 2-
oxo-4-hidroxi-
butirato descarboxilasa y de 3-hidroxi-
propionaldehído reductasa para transformar el malato en PDO.

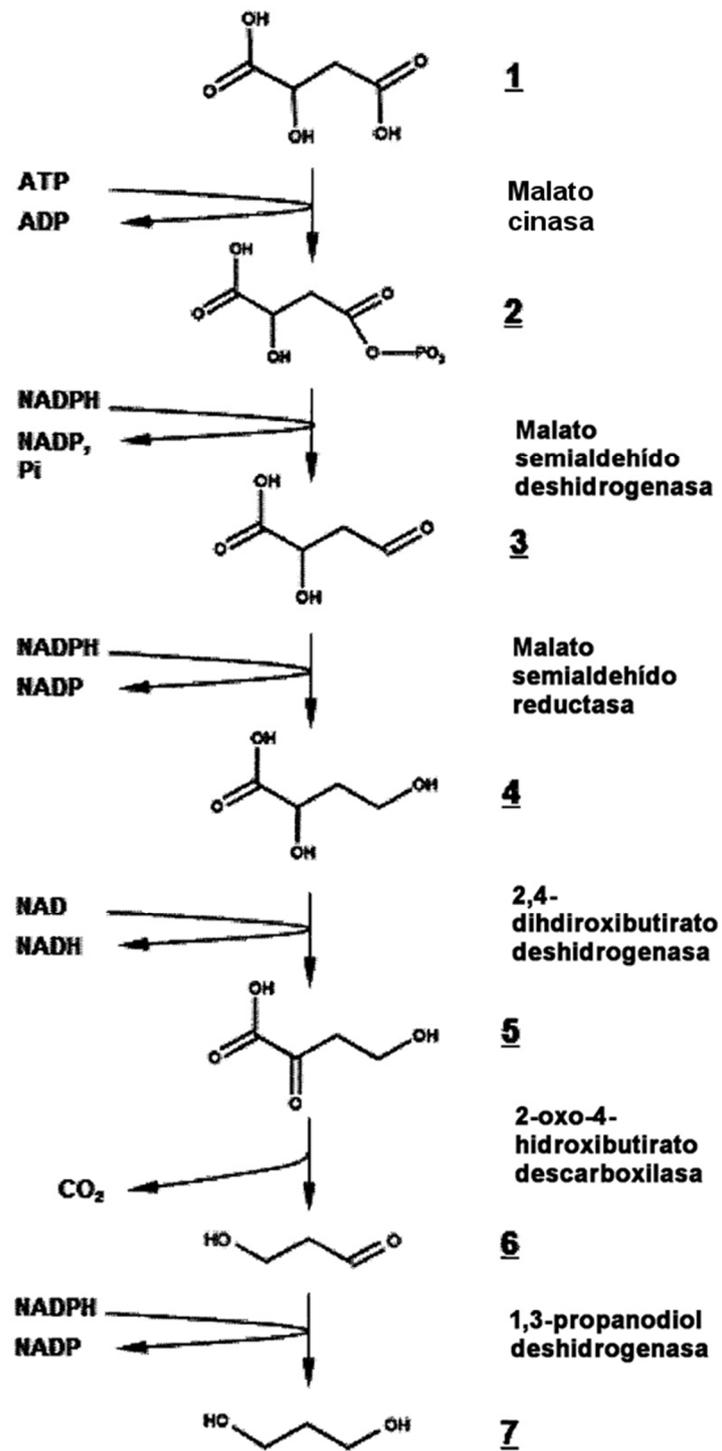


Figura 1

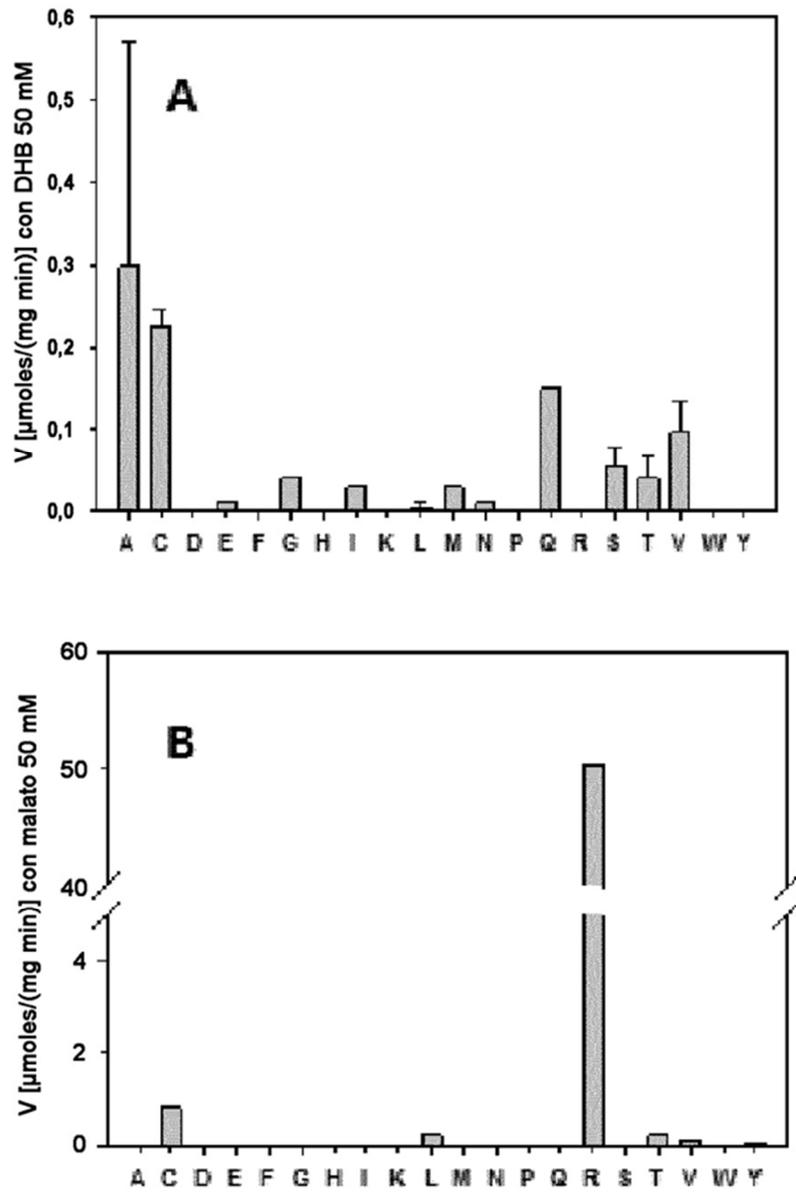


Figura 2

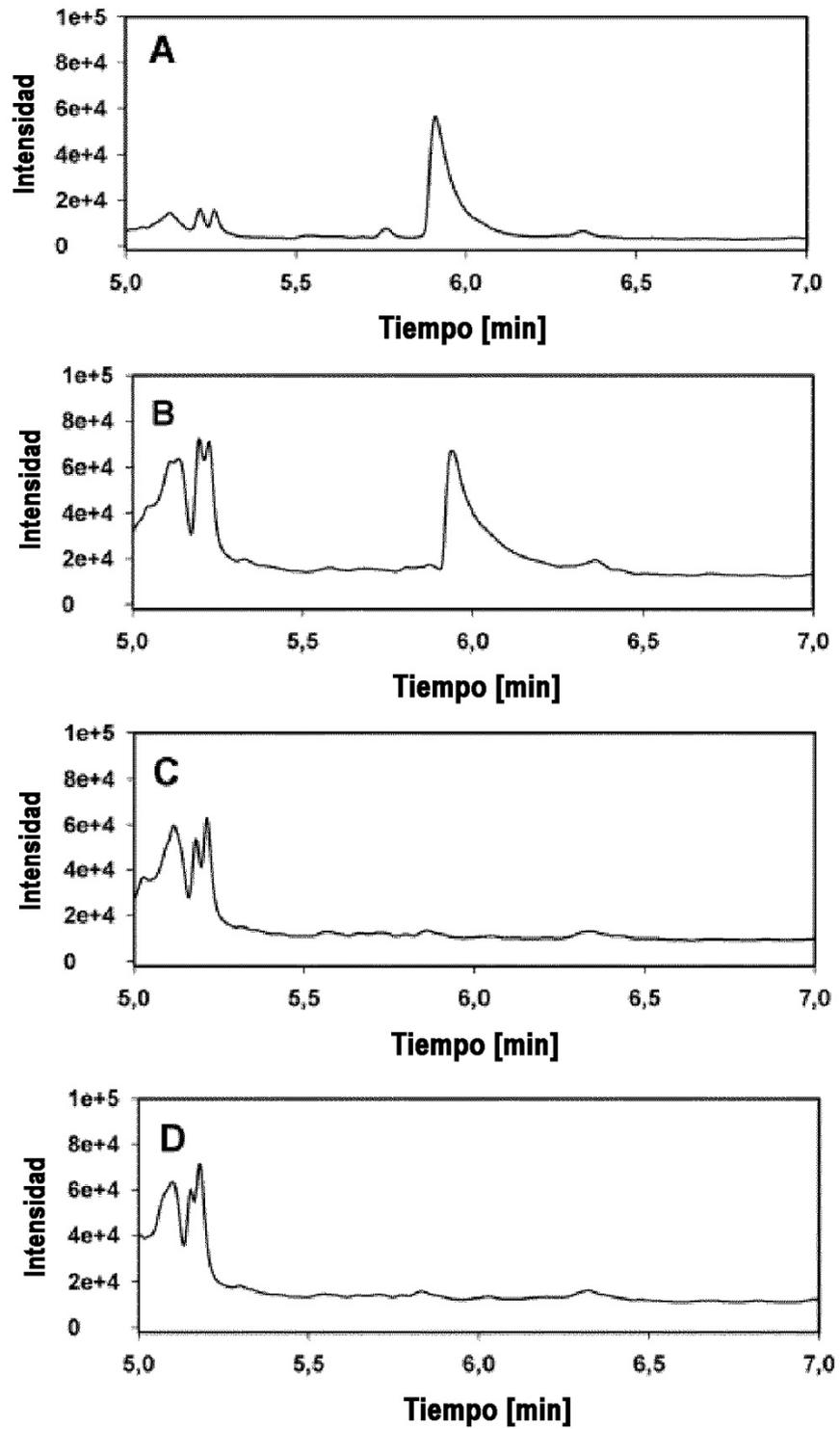


Figura 3

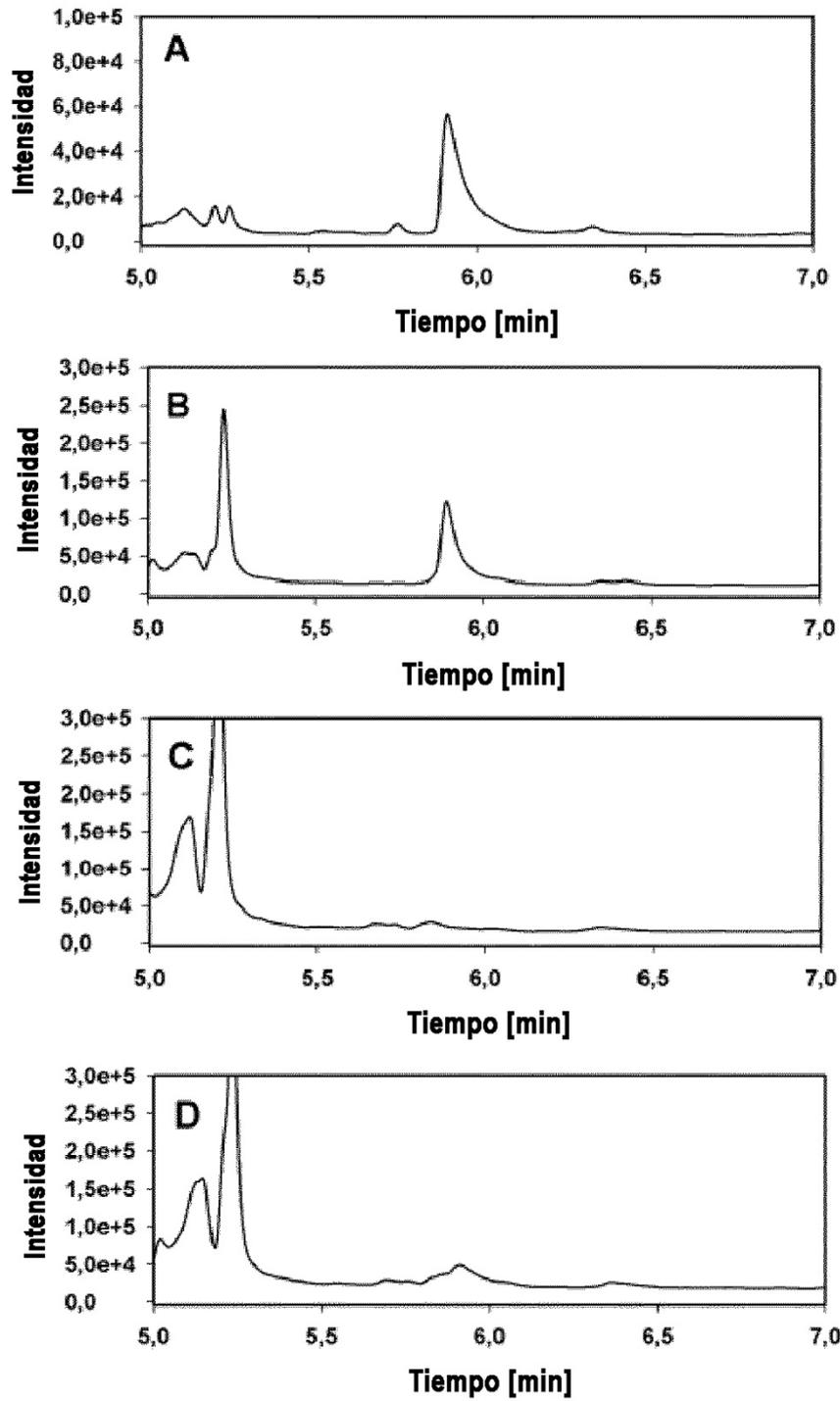


Figura 4